

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036577

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.25

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)

(21) Номер заявки
201690803

(22) Дата подачи заявки
2014.11.04

(54) ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРЕОРИЕНТИРУЮЩИХ Т-КЛЕТКИ ГЕТЕРОДИМЕРНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

(31) 13191386.5

(56) EP-A1-2522724

(32) 2013.11.04

WO-A2-2012131555

(33) ЕР

WO-A2-2010075548

(43) 2016.09.30

ROBEN P. W. ET AL.: "VH3 family antibodies bind domain D of staphylococcal protein A", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 154, no. 12, 15 June 1995 (1995-06-15), pages 6437-6445, XP002508063, ISSN: 0022-1767, abstract

(86) PCT/EP2014/073738

POTTER K. N. ET AL.: "Staphylococcal protein A binding to VH3 encoded immunoglobulins", INTERNATIONAL REVIEWS OF IMMUNOLOGY, HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS, LONDON, GB, vol. 14, no. 4, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 291-308, XP008116757, ISSN: 0883-0185, abstract

(87) WO 2015/063339 2015.05.07

GRAILLE M. ET AL.: "Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 97, no. 10, 9 May 2000 (2000-05-09), pages 5399-5404, XP002284947, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.97.10.5399, abstract, figure 1; table 1

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИКНОС САЙЕНСИЗ СА (CH)

ALMAGRO JUAN C. ET AL.: "Humanization of antibodies", FRONTIERS IN BIOSCIENCE, FRONTIERS IN BIOSCIENCE, ALBERTSON, NY, US, vol. 13, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1619-1633, XP009126790, ISSN: 1093-9946, p. 1624 right-hand col. 3rd paragraph - p. 1625 right-hand col. 2nd paragraph

WO-A1-2010151792

WO-A1-2014049003

(72) Изобретатель:
Блейн Станислас, Оллиер Ромейн,
Хоу Самюэль, Скегро Дарко (CH)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

B1

036577

(57) В изобретении описаны новые гетеродимерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые связываются с CD3 и ассоциированным с заболеванием антигеном. Указанные гетеродимерные иммуноглобулины были сконструированы таким образом, чтобы способствовать образованию гетеродимеров при экспрессировании, и могут быть очищены до высокой степени очистки с применением техники дифференциального очищения с белком А.

036577 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к гетеродимерным иммуноглобулинам, нацеленным как на компонент антигена CD3 человека, так и на ассоциированный с заболеванием антиген, и способам их получения.

Уровень техники

Перенаправленный Т-клеточный киллинг представляет собой подходящий механизм действия для многих терапевтических областей. Биспецифические антитела различных форматов, как было показано в доклинических и клинических исследованиях, опосредуют перенаправление Т-клеток (May C et al., (2012) *Biochem Pharmacol*, 84(9): 1105-12; Frankel SR & Baauerle PA, (2013) *Curr Opin Chem Biol*, 17(3): 385-92). Все переориентирующие Т-клетки биспецифические антитела или их фрагменты сконструированы таким образом, чтобы содержать по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, при этом один сайт связывает поверхностный антиген на целевой клетке, а другой сайт связывает Т-клеточный поверхностный антиген. Среди Т-клеточных поверхностных антигенов для перенаправления Т-клеточного киллинга наибольшее внимание уделялось эпсилон-субъединице CD3 человека из белкового комплекса TCR.

Многие форматы биспецифических антител использовались для перенаправления Т-клеточного киллинга; главным образом они включают структуры на основе тандема scFv-фрагментов и диател, и описано лишь несколько примеров антител биспецифического формата на основе Fc (Moore PA et al., (2011) *Blood*, 117(17): 4542-51; May C. et al., (2012) выше., Frankel SR & Baauerle PA, (2013), выше). Биспецифические форматы, включающие область Fc человека, отличаются более продолжительными периодами полужизни в кровотоке, что может обеспечивать повышенную эффективность и/или позволять использование режимов с менее частым дозированием. Среди возможных биспецифических форматов на основе Fc одним из предпочтительных форматов для перенаправления Т-клеточного киллинга является формат так называемых гетеродимеров тяжелых цепей. Указанный формат представляет особый интерес, поскольку не позволяет происходить агрегации множественных копий молекул CD3 человека на поверхности Т-клеток, предотвращая таким образом любую инактивацию Т-клеток (Klein C et al., (2012) *MAbs*, 4(6): 653-63).

Первым описанным способом конструирования гетеродимеров тяжелых цепей является способ, известный как метод "выступ-во-впадину" (публикация РСТ № WO 199627011; Merchant AM et al., (1998) *Nat Biotechnol*, 16(7): 677-81). Недавно был описан химический способ, известный как метод замены FAB-фрагментов, в котором два антитела комбинируют в одно биспецифическое антитело путем усечения и перестановки *in vitro* половин иммуноглобулинов (публикации РСТ №№ WO 2008119353 (Schuurman J et al.) и WO 2013060867 (Grumer M. et al.); Labrijn AF et al., (2013) *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(13): 5145-50).

Оба имеющихся в настоящее время способа и их производные не подходят для получения антител на основе Fc биспецифического формата в клетках-хозяевах млекопитающих. При экспрессировании гетеродимеров тяжелых цепей типа "выступ-во-впадину" в клетках-хозяевах млекопитающих выделению биспецифических антител мешает присутствие гомодимеров (Jackman J et al., (2010) *J Biol Chem*, 285(27): 20850-9; Klein C. et al., выше). Способ с заменой FAB-фрагментов и его производные страдает тем же недостатком, и, кроме того, связан с дополнительной проблемой, заключающейся в необходимости исходного получения по отдельности двух "моноспецифических" антител.

При разработке биспецифических антител, перенаправляющих Т-клеточный киллинг путем задействования субъединицы CD3, критически важно отсутствие в готовом лекарственном продукте гомодимеров, специфических для указанной субъединицы CD3. В случае нацеливания на эпсилон-субъединицу CD3 примеси антител против CD3-эпсилон человека (моноспецифических и бивалентных антител к антигену CD3-эпсилон человека) могут запускать транзиентную активацию Т-клеток и высвобождение цитокинов с последующим Т-клеточным апоптозом, взаимодействуя таким образом для обеспечения контролируемой специфической активации Т-клеток. Получение стабильных и безопасных биспецифических антител на основе Fc, эффективно перенаправляющих Т-клеточный киллинг, остается трудной задачей для фармацевтической промышленности в отношении выхода и чистоты. Соответственно существует потребность в технологии для эффективного получения гетеродимеров тяжелых цепей на основе антител против CD3 человека, не содержащих гомодимеров антител против CD3 человека, отличающейся тем, что секреируемый продукт - биспецифическое антитело может быть легко выделен из клеточно-го культурального супернатанта рекомбинантных линий клеток-хозяев млекопитающих.

Были описаны техники очищения гетеродимеров тяжелых цепей от гомодимеров, основанные на дифференциальной аффинности в отношении определенного реагента. Первый пример известной техники очищения на основе дифференциальной аффинности включал применение двух разных тяжелых цепей двух разных видов животных, одна из которых не связывала аффинный реагент - белок A (Lindhofer H et al., (1995) *J Immunol*, 155(1): 219-225). Те же авторы также описали применение двух разных тяжелых цепей, происходящих из двух разных изотипов иммуноглобулинов человека (IGHG1 и IGHG3), одна из которых не связывает аффинный реагент - белок A (IGHG3; см. US 6551592, Lindhofer H et al.). Позже Davis S с коллегами описали вариант указанной техники (публикация РСТ № WO 2010151792) и использу-

зование двух замен аминокислот H435R и Y436F, описанных Jendeberg (1997) (Jendeberg L. et al. (1997) J Immunol Methods, 201(1): 25-34) для устранения сродства к реагенту - белку A одной из тяжелых цепей гетеродимера.

Предпочтительная известная техника дифференциальной аффинной очистки с белком A согласно настоящему изобретению соответствует технике, при которой общее число сайтов связывания белка A всех трех компонентов, т.е. двух гомодимерных компонентов и представляющего интерес гетеродимера, отличается по меньшей мере на 1, и при этом один из указанных двух гомодимерных компонентов не содержит сайта связывания белка A и таким образом не связывает белок A (как показано на фиг. 1).

Стабильность лекарственного средства представляет собой важный аспект успешной фармацевтической разработки, и иммуноглобулины на основе VH3 или их фрагменты имеют важное значение для индустрии биологических лекарственных средств. Терапевтические антитела на основе подкласса VH3 были объектом интенсивных разработок, поскольку указанные структуры связывают белок A и облегчают тестирование фрагментов антител перед их введением в состав иммуноглобулинов; например, многие библиотеки синтетических антител на основе фагового дисплея, используемые для поиска антител, основаны на подклассе VH3. Кроме того, антитела на основе VH3 часто выбираются ввиду хороших показателей экспрессии и стабильности по сравнению с другими известными подклассами вариабельных доменов тяжелых цепей.

Хотя домен VH3 содержит только один сайт связывания белка A с более слабой аффинностью по сравнению с областью Fc, содержащей два сайта с более сильной аффинностью (Roben PW et al., (1995) J Immunol, 154(12): 6437-45), его аффинность достаточна для взаимодействия при использовании известных техник дифференциального аффинного очищения с белком A. При очищении гетеродимеров тяжелых цепей, отличающихся тем, что тяжелая цепь, сконструированная таким образом, чтобы в области Fc не происходило связывания с белком A, включает один антигенсвязывающий сайт на основе VH3, связывание с белком A восстанавливается за счет домена VH3, и предпочтительная технология, описанная на фиг. 1 и выше, уже не подходит для применения (фиг. 2A). В указанном случае устранение связывания с белком A антигенсвязывающего сайта на основе VH3 обеспечивает простое решение и позволяет сохранить исходный дизайн требуемого гетеродимера (фиг. 2B). Как вариант, гетеродимер тяжелых цепей может быть реконструирован таким образом, чтобы содержать антигенсвязывающий сайт на основе VH3, расположенный на тяжелой цепи, которая связывает белок A в области Fc (фиг. 2C; отметим, что домен VH3 отличается более слабой аффинностью в отношении белка A по сравнению с мономером Fc, поэтому представляющий интерес гетеродимер все же элюирует при значении pH, отличном от значения для других гомодимерных видов, как правило, при pH 4, тогда как гомодимерный вид, связывающий белок A, в данном случае включает два дополнительных сайта связывания белка A и элюирует при показателях pH ≤ 3).

Что еще более важно, при очищении гетеродимеров тяжелых цепей, в тех случаях, когда обе тяжелые цепи включают антигенсвязывающий сайт на основе VH3, описанная выше стратегия перестановок может подходить только частично (фиг. 2D и 1B). Дифференциальное очищение на основе белка A возможно только в случае, когда связывание с белком A устранено по меньшей мере в одном (фиг. 2E) или обоих (фиг. 2F) антигенсвязывающих сайтах на основе VH3.

Соответственно, существует потребность в устранении связывания с белком A в доменах VH3 при получении гетеродимеров тяжелых цепей, включающих указанный подкласс вариабельных доменов.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложены новые биспецифические антитела против CD3 человека, содержащие второй связывающий фрагмент, способный распознавать и связывать ассоциированный с заболеванием антиген.

В контексте настоящего изобретения ассоциированный с заболеванием антиген означает любой антиген или эпитоп, связанный с патологическим состоянием, такой как онкогенний маркер или маркер какой-либо другой метаболической или иммунологической дисфункции. Кроме того, маркер заболевания может также относиться к инфекционному заболеванию, например, к патогенному вирусу или бактерии.

В соответствии с настоящим изобретением каждый из двух связывающих фрагментов биспецифических антител против CD3 человека содержит константную область иммуноглобулина, при этом первый фрагмент или полипептид связывается с белком A, а второй фрагмент или полипептид не связывается с белком A.

В соответствии с настоящим изобретением связывание первого полипептида с белком A и отсутствие связывания второго полипептида с белком A не означает, что указанному второму полипептиду не может быть свойственна некоторая степень остаточного связывания с белком A; на самом деле предполагается, что указанный второй полипептид связывается с белком A менее выраженно по сравнению с первым фрагментом.

В соответствии с настоящим изобретением указанные первый и второй полипептиды гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента содержат сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированной областью CH3, имеющей белок-белковый интерфейс, благоприятствующий образованию гетеродимеров, а не гомодимеров. Согласно предпочтительному варианту реализации

в настоящем изобретении предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, в котором первый и второй полипептиды содержат сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированным доменом СН3, имеющим белок-белковый интерфейс, при этом указанный белок-белковый интерфейс первого полипептида содержит замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90 (нумерация IMGT®), а белок-белковый интерфейс второго полипептида содержит замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 и 90 (нумерация IMGT®).

Предпочтительно белок-белковый интерфейс второго полипептида содержит замену аминокислоты в положении 84.4 и по меньшей мере одну дополнительную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90 (нумерация IMGT®).

Согласно дополнительному варианту реализации в настоящем изобретении предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, в котором первый и второй полипептиды содержат сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированным доменом СН3, имеющим белок-белковый интерфейс, при этом белок-белковый интерфейс первого полипептида содержит замену аминокислоты в положении 88 и в положении, выбранном из группы, состоящей из 3; 5; 7; 20; 22; 26; 27; 79; 81; 84; 84.2; 85.1; 86 и 90 (нумерация IMGT®), а белок-белковый интерфейс второго полипептида содержит замену аминокислоты в положении 85.1 и/или 86, и в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5; 7; 20; 22; 26; 27; 79; 81; 84; 84.2; 84.4; 88 и 90 (нумерация IMGT®).

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения область связывания эпитопа первого полипептида связывает белковый комплекс CD3, а область связывания эпитопа второго полипептида связывает ассоциированный с заболеванием антиген, или область связывания эпитопа первого полипептида связывает ассоциированный с заболеванием антиген, а область связывания эпитопа второго полипептида связывает белковый комплекс CD3 и

при этом область связывания эпитопа, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит тяжелую цепь CDR1, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 194, тяжелую цепь CDR2, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 195, и тяжелую цепь CDR3, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 196, и легкую цепь CDR1, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 197, легкую цепь CDR2, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 198, и легкую цепь CDR3, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 199; или при этом область связывания эпитопа, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит тяжелую цепь CDR1, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 200, тяжелую цепь CDR2, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 201, и тяжелую цепь CDR3, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 202, и легкую цепь CDR1, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 203, легкую цепь CDR2, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 204, и легкую цепь CDR3, содержащую последовательности аминокислот: SEQ ID NO: 205; или при этом область связывания эпитопа, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит тяжелую цепь CDR1, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 352, тяжелую цепь CDR2, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 353, и тяжелую цепь CDR3, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 354, и легкую цепь CDR1, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 355, легкую цепь CDR2, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 356, и легкую цепь CDR3, содержащую последовательности аминокислот, соответствующие последовательности SEQ ID NO: 357.

Применение указанных новых биспецифических антител против CD3 человека включает, не ограничиваясь перечисленным, лечение различных раковых заболеваний человека и аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Специфическое разрушение раковых клеток, а не здоровых клеток и тканей представляет собой главную цель в области онкологии. Терапевтические средства, способные безопасно перенаправлять Т-клеточный киллинг на поверхностные антигены ассоциированных с опухолью клеток, могут обеспечивать повышенную клиническую эффективность. Известные области онкологии, в которых существуют неудовлетворенные клинические потребности, включают, не ограничиваясь перечисленными, рак молочной железы, метастатический рак молочной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак легкого, лимфомы и множественную миелому.

Элиминация болезнетворных Т-клеток может быть более целесообразной, чем подавление Т-клеточной дифференцировки, при лечении аутоиммунных и воспалительных заболеваний, таких как псориаз, рассеянный склероз и диабет.

Предпочтительный набор ассоциированных с заболеванием антигенов происходит из продуктов ге-

нов CD33, TROP2, CD105, GD2, GD3, CEA, VEGFR1, VEGFR2, NCAM, CD133, CD123, ADAM17, MCSP, PSCA, FOLR1, CD19, CD20, CD38, EpCAM, HER2, рЭФР, ПСМА, IgE, интегрина а4б1, CCR5, LewisY, FAP, MUC-1, Wue-1, MSP, EGFRvIII (рецептор эпидермального фактора роста, вариант III), Р-гликопротеина, АФП (альфа-фетопротеина), ALK, белков BAGE, CD30, CD40, CTLA4, ErbB3, ErbB4, мезотелин, OX40, CA125, CAIX, CD66e, сMet, EphA2, HGF/SF, MUC1, фосфатидилсерина, TAG-72, TPBG, β-катенина, brc-ab1, BRCA1, BORIS, CA9, каспазы-8, CDK4, циклина-B1, CYP1B1, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, GAGE-1, GAGE-2, GloboH, глипикана-3, GM3, gp100, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MAGE1, MAGE2, MAGE3, MAGE4, MAGE6, MAGE12, MART-1, ML-IAP, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR-85, NY-ESO1, p15, p53, PAP, PAX3 PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, белков RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивина, TAG-72, TRP-β, TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, тирозиназы, уроплакина-3.

Гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, отличающийся тем, что указанная область связывания эпитопа, которая связывает ассоциированный с заболеванием антиген, содержит последовательности аминокислот CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и последовательности аминокислот CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, выбранные из группы, состоящей из:

- i) последовательностей SEQ ID NO: 206-211;
- ii) последовательностей SEQ ID NO: 212-217;
- iii) последовательностей SEQ ID NO: 218-223;
- iv) последовательностей SEQ ID NO: 224-229;
- v) последовательностей SEQ ID NO: 230-235;
- vi) последовательностей SEQ ID NO: 236-241;
- vii) последовательностей SEQ ID NO: 242-247;
- viii) последовательностей SEQ ID NO: 248-253;
- ix) последовательностей SEQ ID NO: 254-259;
- x) последовательностей SEQ ID NO: 260-265;
- xi) последовательностей SEQ ID NO: 266-271 и
- xii) последовательностей SEQ ID NO: 272-277.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения константная область второго полипептида гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента содержит область CH3 IgG3.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения константная область второго полипептида гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента содержит область CH3, не принадлежащую IgG, и указанная не принадлежащая IgG3 область CH3 содержит по меньшей мере одну замену, уменьшающую/удаляющую связывание с белком A.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения область связывания эпитопа второго полипептида гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента содержит область VH3, содержащую по меньшей мере одну модификацию, которая уменьшает связывание с белком A.

Авторы настоящего изобретения показали, что антигенсвязывающие сайты на основе VH3 могут быть легко получены и очищены с высокой степенью чистоты за один этап хроматографии с белком A. Помимо простоты получения указанные антитела могут демонстрировать более высокую эффективность по сравнению с существующими методами терапии.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения биспецифических гетеродимеров тяжелых цепей антител против CD3 человека, содержащих по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт на основе VH3 из клеток-хозяев рекомбинантной линии клеток млекопитающих, отличающийся тем, что продукт - биспецифическое антитело может быть легко выделен после одного этапа хроматографии с белком A с высокой степенью чистоты.

В частности, модифицированная область VH3 содержит замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 57, 65, 81, 82а и комбинации 19/57/59 (нумерация Kabat); еще более предпочтительно указанная модифицированная область VH3 содержит замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 57А, 57Е, 65С, 81Е, 82аС и комбинация 19G/57A/59A (нумерация Kabat).

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент может содержать дополнительные замены, при этом каркасная область вариабельного домена тяжелой цепи содержит замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из I34M, V48I, A49G, R58N/Y, I69L, A71T и T73K (нумерация Kabat), а каркасная область вариабельного домена легкой цепи содержит замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, T51A, R66G, F71Y и P96F (нумерация Kabat); или при этом каркасная область вариабельного домена тяжелой цепи содержит замены аминокислот 134M, A49G и A71T (нумерация Kabat), а каркасная область вариабельного домена легкой цепи содержит замены аминокислот M4L, L46R, L47W и F71Y (нумерация Kabat).

Согласно дополнительному варианту реализации область связывания эпитопа, которая связывается с белковым комплексом CD3, содержит каркасную область вариабельного домена тяжелой цепи, пред-

ставляющую собой продукт или происходит из подкласса VH3 человека. Предпочтительно каркасная область вариабельного домена тяжелой цепи представляет собой продукт или происходит изIGHV3-23 человека. Более предпочтительно каркасная область вариабельного домена тяжелой цепи представляет собой продукт или происходит изIGHV3-23*04 человека (SEQ ID NO: 22). Каркасная область вариабельного домена тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию соответствующей каркасной области вариабельной области тяжелой цепи соответствующего антитела мыши, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 60.

Согласно предпочтительному варианту реализации область связывания эпитопа первого полипептида, которая связывается с белковым комплексом CD3, содержит каркасную область вариабельного домена легкой цепи, представляющую собой продукт или происходит из подкласса VK1 человека или подкласса VK3 человека. Предпочтительно каркасная область вариабельного домена легкой цепи представляет собой продукт или происходит из VK1-39 или VK3-20 человека. Более предпочтительно каркасная область вариабельного домена легкой цепи представляет собой продукт или происходит из IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 23) или IGKV3-20*01 человека (SEQ ID NO: 24). Каркасная область вариабельного домена легкой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию соответствующей каркасной области вариабельной области легкой цепи соответствующего антитела мыши, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 61.

Согласно предпочтительному варианту реализации область связывания эпитопа, которая связывается с белковым комплексом CD3, содержит гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из: I34M, V48I, A49G, R58N/Y, I69L, A71T и T73K (нумерация Kabat), и гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, содержащий обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, R66G, F71Y и P96F (нумерация Kabat). Более предпочтительно область связывания эпитопа, которая связывается с белковым комплексом CD3, содержит гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий обратные мутации 134M, A49G и A71T (нумерация Kabat), и гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, содержащий обратные мутации M4L, L46R, L47W и F71Y (нумерация Kabat).

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения область связывания эпитопа, которая связывает белковый комплекс CD3 гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 48, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 51; или где область связывания эпитопа, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 49, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 51; или

где область связывания эпитопа, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 358, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 51; или

где область связывания эпитопа, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 101, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 105; или

где область связывания эпитопа, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 103, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 106; или

где область связывания эпитопа, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 104, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 106.

Белковый комплекс CD3 содержит ряд субъединиц, например дельта, эпсилон и гамма. Согласно предпочтительному варианту реализации область связывания эпитопа, которая связывается с белковым комплексом CD3, связывается с эпсилон-субъединицей CD3.

Область связывания эпитопа, как описано в настоящем документе, включает комбинацию одного или более вариабельных доменов тяжелых цепей и одного или более дополняющих вариабельных доменов легких цепей, вместе образующих связывающий сайт, обеспечивающий специфическое связывание гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента с одним или более эпитопами. Согласно варианту реализации настоящего изобретения область связывания эпитопа первого полипептида содержит FAB, а область связывания эпитопа второго полипептида содержит scFv. Как вариант, область связывания эпи-

тока первого полипептида содержит scFv, а область связывания эпитопа второго полипептида содержит FAB.

Согласно одному варианту реализации область связывания эпитопа, которая связывает ассоциированный с заболеванием антиген, связывается с HER2. Указанная область связывания эпитопа содержит каркасную область вариабельного домена тяжелой цепи, представляющую собой продукт или происходящую из подкласса VH3 человека, предпочтительно VH3-23 человека, более предпочтительно IGHV3-23*04 человека (SEQ ID NO: 22), и каркасную область вариабельного домена легкой цепи, представляющую собой продукт или происходящую из подкласса VK1 человека, предпочтительно VK1-39 человека, более предпочтительно IGKV1-39*01 человека (SEQ ID NO: 23).

Согласно предпочтительному варианту реализации область связывания эпитопа, которая связывает ассоциированный с заболеванием антиген HER2, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 20, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 21. Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации область связывания эпитопа, которая связывает HER2, может содержать вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, соединенные линкером G4S с образованием scFv-фрагмента, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 107. Предпочтительно вариабельный домен scFv-фрагмента содержит модификацию для устранения связывания с белком A, при этом происходит замена аминокислоты 65S (нумерация Kabat) и указанный scFv-фрагмент содержит последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 109, или происходит замена аминокислоты 82aS (нумерация Kabat) и указанный scFv-фрагмент содержит последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 111.

В частности, указанный связывающий фрагмент герцептина содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую SEQ ID NO: 20, и вариабельную область легкой цепи, кодируемую SEQ ID NO: 21.

Согласно другому варианту реализации область связывания эпитопа, которая связывает ассоциированный с заболеванием антиген, связывается с CD38. Указанная область связывания эпитопа содержит каркасную область вариабельного домена тяжелой цепи, представляющую собой продукт или происходящую из подкласса VH3 человека, предпочтительно VH3-23 человека, более предпочтительно IGHV3-23*04 человека (SEQ ID NO: 22). Каркасная область вариабельного домена тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию соответствующей каркасной области вариабельной области тяжелой цепи соответствующего антитела мыши, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 112, или 114, или 122. Указанная область связывания эпитопа также содержит каркасную область вариабельного домена легкой цепи, представляющую собой продукт или происходящую из подкласса VK1 человека, предпочтительно VK1-39 человека, более предпочтительно IGKV1-39*01 человека (SEQ ID NO: 23). Каркасная область вариабельного домена легкой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию соответствующей каркасной области вариабельной области легкой цепи соответствующего антитела мыши, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 113, или 115, или 123.

В частности, связывающий CD38 полипептид содержит пару, состоящую из вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностями SEQ ID NO: 116/117, 129/130, 133/134 и 135/136.

Согласно одному варианту реализации область связывания эпитопа, которая связывает ассоциированный с заболеванием антиген, связывается с OX40. Указанная область связывания эпитопа содержит каркасную область вариабельного домена тяжелой цепи, представляющую собой продукт или происходящую из подкласса VH3 человека, предпочтительно VH3-23 человека, более предпочтительно IGHV3-23*04 человека (SEQ ID NO: 22). Каркасная область вариабельного домена тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию соответствующей каркасной области вариабельной области тяжелой цепи соответствующего антитела мыши, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 139. Указанная область связывания эпитопа также содержит каркасную область вариабельного домена легкой цепи, представляющую собой продукт или происходящую из подкласса VK1 человека, предпочтительно VK1-39 человека, более предпочтительно IGKV1-39*01 человека (SEQ ID NO: 23). Каркасная область вариабельного домена легкой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию соответствующей каркасной области вариабельной области легкой цепи соответствующего антитела мыши, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 140.

Наиболее предпочтительно, гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи содержит модификацию для устранения связывания с белком A, включающую замену G65S или замену N82aS (нумерация Kabat).

В частности, связывающий OX40 полипептид содержит пару, состоящую из вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностями SEQ ID NO: 141/142, 278/280 и 279/281.

аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 298, или соответствующего антитела мыши, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 304. Указанная область связывания эпитопа также содержит каркасную область вариабельного домена легкой цепи, представляющую собой продукт или происходящую из подкласса VK1 человека, предпочтительно VK1-39 человека, более предпочтительно IGKV1-39*01 человека (SEQ ID NO: 23). Каркасная область вариабельного домена легкой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию соответствующей каркасной области вариабельной области легкой цепи соответствующего гуманизированного антитела, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 299, или соответствующего антитела мыши, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 305.

Наиболее предпочтительно вариабельный домен тяжелой цепи содержит модификацию для устранения связывания с белком А, включающую замену G65S или замену N82aS (нумерация Kabat).

В частности, связывающий IgE полипептид содержит пару, состоящую из вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностями SEQ ID NO: 298/299, 300/302, 301/303, 304/305, 306/308, 307/309.

Антитела против CD3, как было обнаружено, обуславливают токсичность за счет как прямых, так и непрямых механизмов. Непрямые механизмы опосредованы областью Fc антитела к CD3, которая действует на экспрессирующие Fc-рецепторы иммунные клетки и вызывает транзиентную активацию Т-клеток и высвобождение цитокинов. Соответственно, для повышения безопасности гетеродимерных иммуноглобулинов или их фрагментов согласно описанию в настоящем документе, константная область иммуноглобулина первого и/или второго полипептида в меньшей степени связывается или не связывается с эффекторными иммунными клетками и/или компонентом комплемента C1q. Предпочтительно, константную область иммуноглобулина конструируют таким образом, чтобы устраниить связывание Fc-рецептора в нижней шарнирной области. Более предпочтительно, константная область иммуноглобулина первого и/или второго полипептида содержит замену(ы) L234A и/или L235A (нумерация EU). Наиболее предпочтительно, константная область иммуноглобулина первого и/или второго полипептида содержит замены L234A и L235A (нумерация EU).

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении также раскрыт гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, отличающийся тем, что область связывания эпитопа связывается с эпилон-субъединицей CD3 белкового комплекса CD3 и содержит FAB, отличающейся термостабильностью FAB, превосходящей термостабильность FAB гибридного ОКТ3, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 25, и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 26, по оценке с применением дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) согласно описанию на фиг. 9.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что одна область связывания эпитопа связывается с эпилон-субъединицей CD3 белкового комплекса CD3, а другая область связывания эпитопа, которая связывает ассоциированный с заболеванием антиген, связывает HER2. Эффективность такого гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента для перенаправления Т-клеточного киллинга может быть измерена в анализе *in vitro* с применением метода проточной цитометрии (RDL-FACS) или колориметрического метода (RDL-MTS) на линиях клеток, экспрессирующих HER2, таких как JIMT-1, BT-474 и MDA-MB-231, согласно описанию в примерах.

Согласно одному варианту реализации гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, который связывается с CD3-эпилон и HER2, приводит к гибели клеток JIMT-1 с эффективностью, соответствующей 21 пМ или менее. Как вариант, указанный гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент также приводит к гибели клеток BT-474 с эффективностью, соответствующей 2 пМ или менее. Кроме того, указанный гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент также приводит к гибели клеток MDA-MB-231 с эффективностью, соответствующей 0,2 нМ или менее. Цитотоксичность для всех линий клеток измеряли в анализе RDL, проводимом на МКПК человека при соотношении эффекторных к целевым клеткам, составляющем 10:1, на протяжении 48 ч. Кроме того, указанный гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент демонстрирует выраженный противоопухолевый эффект при тестировании *in vivo* в модели ксенотрансплантата JIMT-1/МКПК. Предпочтительно, гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент приводит к гибели клеток JIMT-1 при концентрации 0,05 мг/кг в ксенотранспланте клеток JIMT-1.

Согласно предпочтительному варианту реализации в настоящем изобретении предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, связывающийся с: i) белковым комплексом CD3 и HER2, при этом первый полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 159, соединен с легкой цепью последовательности аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 47, и связывает CD3-эпилон, а второй полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 160, и связывает HER2;

ii) белковым комплексом CD3 и HER2, при этом первый полипептид имеет последовательность

рой полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 311, и связывает CD3-эпсилон;

белковым комплексом CD3 и IgE, при этом первый полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 336, соединен с легкой цепью последовательности аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 337, и связывает IgE, а второй полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 311, и связывает CD3-эпсилон;

белковым комплексом CD3 и IgE, при этом первый полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 338, соединен с легкой цепью последовательности аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 339, и связывает IgE, а второй полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 311, и связывает CD3-эпсилон;

белковым комплексом CD3 и OX40, при этом первый полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 340, соединен с легкой цепью последовательности аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 173 и связывает OX40, а второй полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 311, и связывает CD3-эпсилон;

белковым комплексом CD3 и CD20, при этом первый полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 341, соединен с легкой цепью последовательности аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 181, и связывает CD20, а второй полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 311, и связывает CD3-эпсилон;

белковым комплексом CD3 и рЭФР, при этом первый полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 342, соединен с легкой цепью последовательности аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 175, и связывает рЭФР, а второй полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 311, и связывает CD3-эпсилон;

белковым комплексом CD3 и рЭФР, при этом первый полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 343, соединен с легкой цепью последовательности аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 344, и связывает рЭФР, а второй полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 311, и связывает CD3-эпсилон;

белковым комплексом CD3 и IgE, при этом первый полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 345, соединен с легкой цепью последовательности аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 346, и связывает IgE, а второй полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 311, и связывает CD3-эпсилон;

белковым комплексом CD3 и IgE, при этом первый полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 347, соединен с легкой цепью последовательности аминокислот, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 348, и связывает IgE, а второй полипептид имеет последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 311, и связывает CD3-эпсилон.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, отличающийся тем, что указанный связывающий CD3 полипептид содержит по меньшей мере одну вариабельную область или комбинацию вариабельных областей тяжелых и легких цепей, выбранных из группы последовательностей SEQ ID NO: 48/51, 49/51, 101/105, 103/106, 104/106, 358/51, и указанный связывающий ассоциированный с заболеванием антиген полипептид содержит по меньшей мере одну вариабельную область или комбинацию вариабельных областей тяжелых и легких цепей, выбранных из группы последовательностей SEQ ID NO: 20/21, 116/117, 129/130, 133/134, 135/136, 139/140, 141/142, 278/280, 279/281, 143/144, 282/284, 283/285, 296/297, 145/146, 286/288, 287/289, 290/291, 292/294, 293/295, 298/299, 300/302, 301/303, 304/305, 306/308, 307/309.

Согласно приведенному выше обсуждению получения биспецифических антител существует потребность в эффективном получении гетеродимеров тяжелых цепей на основе антител против CD3 человека, не содержащих гомодимеров антител против CD3 человека, отличающихся тем, что секреируемый продукт - биспецифическое антитело может легко быть выделен из клеточного культурального супернатанта клеток-хозяев рекомбинантной линии клеток млекопитающих. С этой целью для выделения гетеродимерных иммуноглобулинов или их фрагментов, включающих подкласс вариабельных доменов VH3, может применяться техника дифференциального очищения на основе белка А, при этом устраняется сайт связывания белка А по меньшей мере одной, но предпочтительно обеих областей связывания эпитопа на основе VH3. Соответственно, согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ получения *in vitro* гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента согласно описанию в настоящем документе, включающий следующие этапы:

ia) получение ДНК-вектора, кодирующего тяжелую цепь первого полипептида, и ДНК-вектора, кодирующего тяжелую цепь второго полипептида, при этом один или оба ДНК-вектора или третий ДНК-вектор необязательно кодируют общую легкую цепь, или легкую цепь, соединяемую с тяжелой цепью указанных первого или второго полипептидов; или

ib) получение одного ДНК-вектора, кодирующего тяжелые цепи указанных первого и второго полипептидов, при этом указанный ДНК-вектор необязательно кодирует общую легкую цепь или легкую цепь, соединяемую с тяжелой цепью указанных первого или второго полипептидов; и

при этом указанные ДНК-векторы подходят для транзиентной или стабильной экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего;

ii) трансфекция или совместная трансфекция ДНК-вектором(ами) по (i) в клетках-хозяевах линии клеток млекопитающих;

iii) культивирование трансфицированной клеточной линии или ее стабильно селектируемого клона и сбор клеточного культурального супернатанта;

iv) приведение в контакт клеточного культурального супернатанта со смолой для аффинной хроматографии с белком A;

v) элюирование и сбор представляющего интерес гетеродимерного иммуноглобулина.

Предпочтительно чистота гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента, обнаруживаемого в очищенном материале этапа (v), составляет по меньшей мере 95%. Более предпочтительно чистота гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента, обнаруживаемого в очищенном материале этапа (v), составляет по меньшей мере 96%. Еще более предпочтительно чистота гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента, обнаруживаемого в очищенном материале этапа (v), составляет по меньшей мере 97%. Чистота гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента, обнаруживаемого в очищенном материале, может быть измерена с помощью капиллярного электрофореза.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий по меньшей мере одну область CDR из групп последовательностей SEQ ID NO: 224-229, 230-235 и 352-357; или комбинаций пар вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, выбранных из группы последовательностей SEQ ID NO: 122/123, 124/125, 129/130, 135/136, 133/134, 104/106; и пару последовательностей тяжелой и легкой цепи, выбранную из группы: 126/127 или 128, 131/132, 137/138, 359/360.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Принципиальная схема предпочтительных техник очищения на основе дифференциальной аффинной хроматографии с применением белка A. Ни одна из тяжелых цепей не включает антигенсвязывающий сайт на основе VH3. Условные обозначения: [(A+)] означает функциональный сайт связывания белка A, и [(A-)] означает нефункциональный сайт связывания белка A. Указано значение pH для элюции.

Фиг. 2А-Ф: Принципиальные схемы, иллюстрирующие проблемы, возникающие при очищении гетеродимеров тяжелых цепей, содержащих один или более доменов VH3 с применением дифференциальной хроматографии с белком A. Показаны примеры решений на основе мутаций сайта связывания белка A в составе по меньшей мере одного домена VH3 указанного гетеродимера. Фиг. 2А: Проблема, возникающая в том случае, если гетеродимер тяжелых цепей включает домен VH3 в составе тяжелой цепи, который не связывает белок A в Fc-области. Фиг. 2В: Решение проблемы очищения, описанной на фиг. 2А; тяжелая цепь гетеродимера, который не связывает белок A в области Fc, включает домен VH3, в который была введена мутация для устранения сайта связывания белка A. Фиг. 2С: Альтернативное решение проблемы, описанной на фиг. 2А; гетеродимер включает только один домен VH3; указанный гетеродимер сконструирован таким образом, что домен VH3 расположен на тяжелой цепи, которая связывает белок A в области Fc (стратегия перестановки домена VH3 в качестве решения). Фиг. 2Д: Проблема, возникающая в случае, если обе тяжелых цепи гетеродимера включают домен VH3. Фиг. 2Е: Решение проблемы очищения описанной на фиг. 2Д; тяжелая цепь гетеродимера, который не связывает белок A в области Fc, включает домен VH3, в который была введена мутация для устранения сайта связывания белка A. Фиг. 2Ф: Альтернативное решение проблемы очищения, описанной на фиг. 2Д; устранены сайты связывания белка A всех доменов VH3. Заключенные в рамку компоненты совместно элюируют в процессе дифференциальной хроматографии с белком A. Показатели pH A и B отличаются приблизительно на одну единицу pH и обеспечивают эффективное отделение компонента, который связывает белок A. Как правило, показатели pH A и pH B соответствуют 4 и 3, соответственно. Условные обозначения для всех фигур: [(A+)] означает функциональный сайт связывания белка A, и [(A-)] означает нефункциональный сайт связывания белка A.

Фиг. 3: Графики результатов градиентной хроматографии с белком A Fc 133 (колонка с белком A HiTrapTM MabSelect SuReTM). Графики зависимости поглощения при 280 нм от общего объема подвижной фазы показаны сплошной линией. Графики для подвижной фазы pH и процента элюирующего буфера (B), присутствующего в подвижной фазе, показаны пунктирной и точечно-пунктирной линиями соответственно.

Фиг. 4А-С: Графики результатов градиентной хроматографии с белком A. Графики зависимости по-

глощения при 280 нм от общего объема подвижной фазы показаны сплошной линией. Графики для подвижной фазы pH и процента элюирующего буфера (B), присутствующего в подвижной фазе, показаны пунктирной и точечно-пунктирной линиями соответственно. Фиг. 4A: FAB против HER2 - Fc 133 (колонка с белком A HiTrap™ MabSelect SuRe™). Фиг. 4B: scFv-Fc против HER2 133 (колонка с белком A HiTrap™ MabSelect SuRe™). Фиг. 4C: FAB против HER2 (колонка с белком A HiTrap™ MabSelect SuRe™ и колонка с белком A HiTrap™ MabSelect™).

Фиг. 5: Репрезентативные последовательности аминокислот каркасных областей каждого из семи подклассов VH человека. Последовательности выравнивали в соответствии с нумерацией Kabat. Положения в каркасных областях подкласса VH3-23 человека, взаимодействующие с доменом D белка A, выделены жирным шрифтом.

Фиг. 6A-Г: Графики результатов градиентной хроматографии с белком A (колонка с белком A HiTrap™ MabSelect™). Графики зависимости поглощения при 280 нм от общего объема подвижной фазы показаны сплошной линией. Графики для подвижной фазы pH и процента элюирующего буфера (B), присутствующего в подвижной фазе, показаны пунктирной и точечно-пунктирной линиями соответственно. Фиг. 6A: FAB против HER2. Фиг. 6Б: FAB против HER2 с T57A. Фиг. 6С: FAB против HER2 с T57E. Фиг. 6Д: FAB против HER2 с G65S. Фиг. 6Е: FAB против HER2 с R66Q. Фиг. 6Ф: FAB против HER2 с T68V. Фиг. 6Г: FAB против HER2 с Q81E. Фиг. 6Н: FAB против HER2 с N82aS. Фиг. 6I: FAB против HER2 с R19G/T57A/Y59A.

Фиг. 7: Константы равновесной диссоциации (KD) выбранных вариантов FAB против HER2 для антитела HER2.

Фиг. 8А-Д: Графики результатов градиентной хроматографии с белком A (колонка с белком A HiTrap™ MabSelect SuRe™). Графики зависимости поглощения при 280 нм от общего объема подвижной фазы показаны сплошной линией. Графики для подвижной фазы pH и процента элюирующего буфера (B), присутствующего в подвижной фазе, показаны пунктирной и точечно-пунктирной линиями соответственно. Фиг. 8А: scFv против HER2 (G65S)-Fc 133. Фиг. 8Б: scFv против HER2 (N82aS)-Fc 133. Фиг. 8С: FAB против HER2 (G65S)-Fc 133. Фиг. 8Д: FAB против HER2 (N82aS)-Fc 133.

Фиг. 9А-Г: Все указанные фигуры относятся к гуманизации ОКТ3 на стабильных каркасных областях человека. Фиг. 9А-С: Обзор гуманизированных кандидатов, полученных в форме антител IgG1 человека. Окрашивание FIPB-ALL при взаимодействии с гибридным антителом ОКТ3: (-) обозначает отсутствие связывания, (+) более слабое связывание, (++) умеренное связывание и (+++) аналогичное связывание. Фиг. 9Д: Профили ДСК выбранных антител или кандидатов. Фиг. 9Е: Обзор гуманизированных кандидатов, полученных в форме гибридолов scFv-Fc. Окрашивание HPB-ALL при взаимодействии с гибридным антителом ОКТ3: (-) обозначает отсутствие связывания, (+) более слабое связывание, (++) умеренное связывание и (+++) аналогичное связывание. Фиг. 9Г: Профили ДСК выбранных кандидатных scFv-Fc.

Фиг. 10А-В: Все указанные фигуры относятся к гуманизации SP34 на стабильных каркасных областях человека. Фиг. 10А: Обзор гуманизированных кандидатов, полученных в форме антител IgG1 человека. Фиг. 10Б: Обзор гуманизированных кандидатов, полученных в форме гибридных белков scFv-Fc (Fc изотипа IgG1 человека). ППР-данные по гибридному антителу SP34 для гибридных белков 1-26_Fc с CD3-эпилон человека и яванского макака: (-) обозначает отсутствие связывания, (+) более слабое связывание, (++) умеренное связывание, сильное, но не аналогичное связывание (+++), и (++++) аналогичное связывание.

Фиг. 11А-Ж: Все указанные фигуры относятся к антителам против CD38 человека. Фиг. 11А: Взаимодействие антитело-антитела, измеренное посредством ППР, между гибридным антителом HB-7 и антигеном CD38 человека. Сенсорный чип CM5 ковалентно связывали с белком G и захватывали 200 RU гибридного антитела HB-7. Белок CD38 человека (внеклеточный домен CD38 человека с полигистидиновой меткой) вводили в концентрации 125; 31; 7,8; 3,9; 1,9; 1 и 0,5 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P. Фиг. 11Б: Взаимодействие антитело-антитела, измеренное посредством ППР, между гуманизированным оптимальным антителом HB-7 и антигеном CD38 человека. Сенсорный чип CM5 ковалентно связывали с белком G и захватывали 200 RU гуманизированного оптимального антитела HB-7. Белок CD38 человека (внеклеточный домен CD38 человека с полигистидиновой меткой) вводили в концентрации 50; 25; 12,5; 6,25 и 0,39 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P. Фиг. 11С: Взаимодействие антитело-антитела, измеренное посредством ППР, между гуманизированным оптимальным антителом 9G7 и антигеном CD38 человека. Сенсорный чип CM5 ковалентно связывали с белком G и захватывали 200 RU гуманизированного оптимального антитела 9G7. Белок CD38 человека (внеклеточный домен CD38 человека с полигистидиновой меткой) вводили в концентрации 25, 12,5, 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19 и 0,1 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P. Фиг. 11Д: Взаимодействие антитело-антитела, измеренное посредством ППР, между гуманизированным антителом 9G7 с оптимальной каркасной частью и антигеном CD38 человека. Сенсорный чип CM5 ковалентно связывали с белком G и захватывали 200 RU гуманизированного антитела 9G7 с оптимальной каркасной частью. Белок CD38 человека (внеклеточный домен CD38 человека с полигистидиновой меткой) вводили в концентрации 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56;

0,78; 0,39; 0,19 и 0,1 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P. Фиг. 11Е: Взаимодействие антитело-антитела, измеренное посредством ППР, между антителом 767 человека и антигеном CD38 человека. Сенсорный чип CM5 ковалентно связывали с белком G и захватывали 200 RU антитела 767 человека. Белок CD38 человека (внеклеточный домен CD38 человека с полигистидиновой меткой) вводили в концентрации 500; 250; 125; 62,5; 31,25; и 15,6 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P. Аффинность определяли по графику зависимости равновесной реакции (Req) от концентрации аналита (C) в соответствии со следующим уравнением: $Req=KA^*C^*Rmax/(KA^*C^*n+1)$, KD представляет собой концентрацию при 50% насыщении. Все ППР-данные выражают в виде числа резонансных единиц (сокращенно RU; ось Y) от времени (ось X). Фиг. 11F: Профили ДСК гибридного HB-7 и гуманизированных оптимальных антител HB-7. Фиг. 11G: Профили ДСК гибридного 9G7 и гуманизированных оптимальных антител 9G7. Фиг. 11H: Профили ДСК гуманизированного антитела 9G7 с оптимальной каркасной частью. Фиг. 11I: Профили ДСК клона антитела 767. Фиг. 11J: сводная таблица для гуманизированных антител 9G7.

Фиг. 12А-С: Принципиальная схема альтернативных форматов антител BEAT к HER2/CD3. Фиг. 12А: антитела BEAT к HER2/CD3-1 (структура А) и BEAT к HER2/CD3-2 (структура В). Фиг. 12В: антитела BEAT к HER2/CD3-3 (структура С) и BEAT к HER2/CD3(SP34) (структура D). Фиг. 12С: антитело BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-1) (структура Е). Условные обозначения: [(A+)] означает функциональный сайт связывания белка A. [(A-)] означает нефункциональный сайт связывания белка A.

Фиг. 13: Профиль очищения с белком A антитела BEAT к HER2/CD3-1 (Регистрация поглощения при 280 нм). Колонка: 1 мл MabSelect SuRe. Скорость потока: 1 мл/мин. Подвижный буфер: 0,2 М NaH_2PO_4 pH 6. Элюирующий буфер №1: 20 mM Ацетат Na, pH 4 (20 мл). Элюирующий буфер №2: 0,1 М глицина pH 3 (20 мл). Нейтрализация: 1/10 по объему 1M Tris, pH 8.

Фиг. 14: Полученный методом капиллярного электрофореза профиль составов с антителом BEAT к HER2/CD3-1.

Фиг. 15А: ДСН-ПААГ-анализ антитела BEAT к HER2/CD3-1с заменой N82aS. Фиг. 15В: ДСН-ПААГ-анализ варианта антитела BEAT к HER2/CD3-1 без замены N82aS. Условные обозначения: [(A+)] означает функциональный сайт связывания белка A, и [(A-)] означает нефункциональный сайт связывания белка A. Указано значение pH для элюции.

Фиг. 16А: Взаимодействие антитело-антитела, измеренное посредством ППР, между антителом BEAT к HER2/CD3-1 и антигеном CD3-эпсилон человека. Сенсорный чип CM5 ковалентно связывали с 7400 RU гибридного белка гамма-эпсилон CD3 человека + Fc. Антитело BEAT к HER2/CD3-1 вводили в концентрации 5000; 2500; 1250; 625; 312,5 и 156,25 нМ при скорости потока 10 мкл/мин в HBS-P. Данные выражают в виде числа резонансных единиц (сокращенно RU; ось Y) от времени (ось X). Аффинность определяли по графику зависимости равновесной реакции (Req) от концентрации аналита (C) в соответствии со следующим уравнением: $Req=KA^*C^*Rmax/(KA^*C^*n+1)$, KD представляет собой концентрацию при 50% насыщении. Фиг. 16Б: Взаимодействие антитело-антитела, измеренное посредством ППР, между антителом BEAT к HER2/CD3-1 и антигеном HER2 человека. Сенсорный чип CM5 ковалентно связывали с белком G и захватывали 150 RU антитела BEAT к HER2/CD3-1. HER2-his вводили в концентрации 1000; 333; 111; 37; 12; 4,1; 1,4; 0,5 и 0,15 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P. Данные выражают в виде числа резонансных единиц (сокращенно RU; ось Y) от времени (ось X). Фиг. 16С: Профили ДСК антител BEAT к HER2/CD3-1 и -2 показаны на профилях А и В соответственно.

Фиг. 17А-Г: Примеры перенаправленного антителами BEAT к HER2/CD3 Т-клеточного киллинга.

Считывание: метод RDL-MTS. Эффекторные клетки: клетки МКПК человека. Соотношение эффекторных и целевых клеток: 10:1. Средние значения для трех доноров при 48-часовой инкубации. Концентрации антител приведены в нМ. Фиг. 17А: антитела BEAT к HER2/CD3-1 и BEAT к HER2/CD3-2, целевые клетки: BT-474. Фиг. 17В: антитела BEAT к HER2/CD3-1 и BEAT к HER2/CD3-2, целевые клетки: JIMT-1. Фиг. 17С: антитела BEAT к HER2/CD3-1 и BEAT к HER2/CD3-2, целевые клетки: MDA-MB-231. Фиг. 17Д: антитело BEAT к HER2/CD3(SP34), целевые клетки: NCI-N87. Фиг. 17Е: антитело BEAT к HER2/CD3(SP34), целевые клетки: HT-1080. Фиг. 17F: антитело BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-1), целевые клетки: NCI-N87. Фиг. 17G: антитело BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-1), целевые клетки: HT-1080.

Фиг. 18А-С: ксенотрансплантаты JIMT-1 с добавлением МКПК человека. Фиг. 18А: Клетки МКПК человека не влияют на рост опухоли. Фиг. 18В-С: Объемы опухолей (mm^3) у получавших и не получавших лечение BEAT к HER2/CD3-1 мышей; четыре донора МКПК человека, когорты по пять мышей.

Фиг. 19: Принципиальная схема антител BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3 (структура А) и BEAT к CD38-767/CD3 (структура В). [(A+)] означает функциональный сайт связывания белка A. [(A-)] означает нефункциональный сайт связывания белка A.

Фиг. 20А: Взаимодействие антитело-антитела, измеренное посредством ППР, между антителом BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3 и антигеном CD38 человека. Сенсорный чип CM5 ковалентно связывали с белком G и захватывали 200 RU антитела BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3. Белок CD38 человека (меченный полигистидиновой меткой) вводили в концентрации 50; 25; 12,5; 6,25 и 0,39 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P.

Данные выражают в виде числа резонансных единиц (сокращенно RU; ось Y) от времени (ось X). Фиг. 20В: ДСК-профиль антитела BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3.

Фиг. 21: Пример перенаправленного антителом BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3 Т-клеточного киллинга. Считывание: метод RDL-FACS. Эффекторные клетки: очищенные Т-клетки человека. Соотношение эффекторных и целевых клеток: 10:1. Среднее для двух доноров при 48-часовой инкубации. Целевые клетки: RPMI 8226. Концентрация антител приведена в нМ.

Фиг. 22: Пример перенаправленного антителом BEAT к CD38-767/CD3(SP34) Т-клеточного киллинга. Считывание: метод RDL-FACS. Эффекторные клетки: клетки МКПК человека. Соотношение эффекторных и целевых клеток: 10:1. Среднее для трех доноров при 24-часовой инкубации. Целевые клетки: Daudi. Концентрация антител приведена в нМ.

Фиг. 23: Принципиальная схема антитела BEAT к OX40/CD3. Условные обозначения: [(A+)] означает функциональный сайт связывания белка A. [(A-)] означает нефункциональный сайт связывания белка A.

Фиг. 24: Пример перенаправленного антителом BEAT к OX40/CD3 Т-клеточного киллинга. Считывание: метод RDL-MTS. Эффекторные клетки: Клетки МКПК человека. Соотношение эффекторных и целевых клеток: 20:1. Среднее для трех доноров при 48-часовой инкубации. Целевые клетки: рекомбинантные стабильные клетки CHO[OX40]. Концентрация антител приведена в нМ.

Фиг. 25: Принципиальная схема антитела BEAT к рЭФР/CD3. Условные обозначения: [(A+)] означает функциональный сайт связывания белка A. [(A-)] означает нефункциональный сайт связывания белка A.

Фиг. 26: Пример перенаправленного Т-клеточного киллинга антителом BEAT к рЭФР/CD3. Считывание: метод RDL-MTS. Эффекторные клетки: Клетки МКПК человека. Соотношение эффекторных и целевых клеток: 10:1. Среднее для четырех доноров при 48-часовой инкубации. Целевые клетки: клетки HT-29. Концентрация антител приведена в нМ.

Фиг. 27: Принципиальная схема антител BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3(SP34) (структура А) и BEAT к CD38-9G7(ОПТ)/CD3(SP34-каппа-2) (структура В). [(A+)] означает функциональный сайт связывания белка A.

Фиг. 28: Пример перенаправленного Т-клеточного киллинга антителом BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3(SP34). Считывание: метод RDL-FACS. Эффекторные клетки: Клетки МКПК человека. Соотношение эффекторных и целевых клеток: 10:1. Среднее для трех доноров при 24-часовой инкубации. Целевые клетки: клетки Daudi. Концентрация антител приведена в нМ.

Фиг. 29: Взаимодействие антитело-антиген, измеренное посредством ППР, между антителом BEAT к CD38-9G7(ОПТ)/CD3(SP34-каппа-2) и гибридным белком CD3-эпсилон человека с 1-26_Fc. Сенсорный чип CM5 ковалентно связывали с 500 RU гибридного белка CD3-эпсилон человека + 1-26_Fc. Антитело BEAT к CD38-9G7(ОПТ)/CD3(SP34-каппа-2) вводили в концентрации 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 0,8 и 0,4 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P. Данные выражают в виде числа резонансных единиц (сокращенно RU; ось Y) от времени (ось X).

Фиг. 30: Пример перенаправленного Т-клеточного киллинга антителом BEAT к CD38/CD3(SP34-каппа-2). Считывание: метод RDL-FACS. Эффекторные клетки: Клетки МКПК человека. Соотношение эффекторных и целевых клеток: 10:1. Среднее для трех доноров при 24-часовой инкубации. Целевые клетки: клетки Daudi. Концентрация антител приведена в нМ.

Фиг. 31: Принципиальная схема антитела BEAT к CD20/CD3(SP34). [(A+)] означает функциональный сайт связывания белка A.

Фиг. 32: Пример перенаправленного антителом BEAT к CD20/CD3(SP34) Т-клеточного киллинга. Считывание: метод RDL-FACS. Эффекторные клетки: Клетки МКПК человека. Соотношение эффекторных и целевых клеток: 10:1. Среднее для трех доноров при 24-часовой инкубации. Целевые клетки: клетки Daudi. Концентрация антител приведена в нМ.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится в целом к новым гетеродимерным иммуноглобулинам, которые связываются с белковым комплексом CD3 и ассоциированным с заболеванием антигеном. Кроме того, для указанных гетеродимерных иммуноглобулинов характерно уменьшение или отсутствие связывания с белком A и, соответственно, они могут быть очищены до очень высокой степени чистоты с применением аффинной хроматографии.

Для разъяснения указанного описания применяются приведенные ниже определения; в соответствующих случаях термины, используемые в единственном числе, также включают множественное число, и наоборот. Следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, приведена с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

Термины "полипептид" и "белок" относятся к полимеру, состоящему из остатков аминокислот, при этом аминокислоты скомбинированы посредством пептидных связей с образованием цепи аминокислот, связанных друг с другом посредством дегидратационного синтеза. Полипептиды и белки могут быть синтезированы посредством химического синтеза или рекомбинантной экспрессии и не ограничены минимальной длиной аминокислотной последовательности.

В соответствии с настоящим изобретением группа полипептидов содержит "белки" при условии, что указанные белки состоят из одной полипептидной цепи. Полипептиды могут дополнительно образо-

вывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и высшие олигомеры, т.е. состоящие из более чем одной полипептидной молекулы. Полипептидные молекулы, образующие такие димеры, тримеры и т.п. могут быть идентичными или неидентичными. Структуры высшего порядка, соответствующие таким мультимерам называют, соответственно, гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и так далее. Примером гетеромультимера является молекула антитела, которая, во встречающейся в природе форме, состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей. Термины "полипептид" и "белок" также относятся к природным модифицированным полипептидам/белкам, отличающимся тем, что указанная модификация осуществляется, например, путем посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Такие модификации хорошо известны в данной области техники. Кроме того, для целей настоящего изобретения "полипептид" относится к белку, который включает модификации, такие как удаления, добавления и замены (которые могут быть консервативными по природе) относительно нативной последовательности. Указанные модификации могут быть определенными, например, при сайт-специфическом мутагенезе, или могут быть случайными, как при мутациях у хозяев, продуцирующих указанные белки, или при ошибках в ходе ПЦР-амплификации.

Термин "CD3-комплекс" в настоящем документе относится к белковому комплексу, известному как корецептор CD3 (клuster дифференцировки 3) Т-клеточного рецептора (Wucherpfennig KW et al., (2010) Cold Spring Harb Perspect Biol, 2(4): a005140). Белковый комплекс CD3 состоит из четырех отдельных цепей. У млекопитающих указанный комплекс содержит цепь CD3 γ , цепь CD3 δ и две цепи CD3 ϵ . Указанные цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), и (ζ -цепью с получением сигнала активации в Т-лимфоцитах (van der Merwe PA & Dushek O (2011) Nat Rev Immunol, 11(1): 47-55). TCR, ζ -цепь, и молекулы CD3 вместе составляют комплекс TCR. Цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ представляют собой близкородственные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащие единственный внеклеточный домен иммуноглобулина. Внутриклеточные "хвосты" молекул CD3 содержат единственный консервативный мотив, известный как тирозинсодержащий активирующий мотив иммунорецепторов, или, коротко, ITAM, критически важный для сигнальной способности TCR. Поскольку CD3 требуется для активации Т-клеток, лекарственные средства (часто - моноклональные антитела), нацеленные на CD3, исследовались и продолжают быть объектом исследований в качестве иммунодепрессивных терапевтических средств.

Термин "ассоциированный с заболеванием антиген" в настоящем документе относится к молекулам, вовлеченным в болезненный процесс. Примеры ассоциированных с заболеванием антигенов обнаруживаются в разнообразных терапевтических областях, например при воспалении, раковых и аутоиммунных заболеваниях. В онкологии ассоциированные с заболеванием антигены представлены молекулами, подходящими для широкого использования при скрининге, и/или мониторинге, и/или терапевтическом нацеливании при раковых заболеваниях в популяции пациентов, как, например, антиген ЕрСАМ при раке предстательной железы. Опухолевые антигены могут продуцироваться непосредственно опухолью или неопухолевыми клетками в ответ на присутствие опухоли; предпочтительные опухолевые антигены представляют собой молекулы клеточной поверхности. Известны ассоциированные с воспалительными заболеваниями антигены, включающие, не ограничиваясь перечисленными, провоспалительные цитокины, такие как ФНО- α и ИЛ-1. Также известны ассоциированные с аутоиммунными заболеваниями антигены; примеры указанных антигенов включают, не ограничиваясь перечисленными, антитела против двухцепочечной ДНК при системной красной волчанке и пептид бета-амилоид при болезни Альцгеймера.

Термин "иммуноглобулин" в настоящем документе может использоваться взаимозаменяющими с термином "антитело". Иммуноглобулины включают полноразмерные антитела и любые их антигенсвязывающие фрагменты или одиночные цепи. Иммуноглобулины могут быть гомодимерными или гетеродимерными. Иммуноглобулины и, частности, встречающиеся в природе антитела представляют собой гликопroteины, существующие в виде одной или более копий Y-образной единицы, состоящей из четырех полипептидных цепей. Каждая "Y"-образная единица содержит две идентичных копии тяжелой (H) цепи и два идентичных копии легкой (L) цепи, названные так на основании их относительных молекулярных масс. Каждая легкая цепь образует пару с тяжелой цепью, и каждая тяжелая цепь образует пару с другой тяжелой цепью. Ковалентные межцепочечные дисульфидные связи и нековалентные взаимодействия соединяют цепи вместе. Иммуноглобулины и, частности, встречающиеся в природе антитела содержат вариабельные области, представляющие собой две копии антигенсвязывающего сайта. Папаин, протеолитический фермент, расщепляет "Y"-образную единицу на три отдельных молекулы, два так называемых "Fab"-, или "FAB"-фрагмента (Fab = антигенсвязывающий фрагмент) и один так называемый "Fc"-фрагмент, или "Fc-область" (Fc = кристаллизующийся фрагмент). FAB-фрагмент состоит из полной легкой цепи и части тяжелой цепи. Тяжелая цепь содержит одну вариабельную область (VH) и либо три, либо четыре константные области (CH1, CH2, CH3 и CH4, в зависимости от класса или изотипа антитела). Область между областями CH1 и CH2 называют шарнирной областью; она обеспечивает гибкость между двумя Fab-фрагментами Y-образной молекулы антитела, что позволяет им открываться и закрываться.

ваться для адаптации к связыванию с двумя антигенными детерминантами, расположенными на фиксированном расстоянии. "Шарнирная область" в настоящем документе представляет собой последовательность области длиной 6-62 аминокислоты, присутствующую только в IgA, IgD и IgG, которая охватывает остатки цистеина, соединяющие две тяжелые цепи. Каждая из тяжелых цепей IgA, IgD и IgG содержит четыре области, т.е. одну вариабельную и четыре константные области (CH1-3). IgE и IgM содержат одну вариабельную и четыре константных области (CH1-4) на тяжелой цепи. Константные области иммуноглобулинов могут опосредовать связывание с тканями или факторами хозяина, в том числе различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классического пути системы комплемента. Каждая легкая цепь обычно связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью. Каждая легкая цепь содержит одну вариабельную область (VL) и одну константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа, в настоящем документе обозначаемую как IGKC, или представляет собой константную область легкой цепи лямбда, в настоящем документе обозначаемую как IGLC. IGKC используется в настоящем документе как эквивалент Сκ или СΚ и имеет такое же значение. IGLC используется в настоящем документе как эквивалент Сλ или CL и имеет такое же значение. Термин "область IGLC" в настоящем документе относится ко всем константным областям легких цепей лямбда, например ко всем константным областям легких цепей лямбда, выбранным из группы, состоящей из IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 и IGLC7. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR или FW). Каждая область VH и VL состоит из трех областей CDR и четырех областей FR, расположенных в направлении от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат эпитопсвязывающую область, взаимодействующую с антигеном.

Сконструированные иммуноглобулины могут включать области связывания эпитопа разных форматов, такие как фрагменты scFv, FAB или dAb. Указанные фрагменты обычно собирают в антитело-подобную структуру путем генетического слияния с областью Fc IgG. Сконструированные иммуноглобулины могут быть сконструированы в виде гомо- или гетеродимеров с применением или без применения усиливающих гетеродимеризацию техник, и могут обладать моно- или биспецифическими связывающими характеристиками.

Термин "полноразмерное антитело" в настоящем документе включает структуру, которая представляет собой естественную биологическую форму антитела, включающую вариабельные и константные области. Например, у большинства млекопитающих, в том числе у человека и у мыши, полноразмерное антитело класса IgG представляет собой тетramer и состоит из двух идентичных пар двух цепей иммуноглобулина; каждая пара содержит одну легкую и одну тяжелую цепь, каждая легкая цепь содержит области иммуноглобулина VL и константную область легкой цепи, и каждая тяжелая цепь, содержит области иммуноглобулина VH, CH1 ($C\gamma_1$), CH2 ($C\gamma_2$), CH3 ($C\gamma_3$) и CH4 ($C\gamma_4$), в зависимости от класса или изотипа антитела). У некоторых млекопитающих, например, у верблюдов и лам, антитела IgG могут состоять всего из двух тяжелых цепей, при этом каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область, присоединенную к области Fc.

Антитела сгруппированы в классы, также называемые изотипами, определяемыми генетически константной областью. Константные области легких цепей человека классифицируют как легкие цепи каппа (Сκ) и лямбда (Сλ). Тяжелые цепи классифицируют как мю (μ), дельта (δ), гамма (γ), альфа (α) или эпсилон (ϵ), а изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. Соответственно "изотип" в настоящем документе означает любой из классов и/или подклассов иммуноглобулинов, определяемый химическими и антигенными характеристиками их константных областей. Известные изотипы иммуноглобулинов человека представлены IGHG1 (IgG1), IGHG2 (IgG2), IGHG3 (IgG3), IGHG4 (IgG4), IGHA1 (IgA1), IGHA2 (IgA2), IGHM (IgM), IGHD (IgD) и IGHE (IgE). Так называемый псевдоген иммуноглобулина гамма человека IGHGP представляет собой дополнительный ген константной области тяжелой цепи человека иммуноглобулина, который был секвенирован, однако не кодирует белок из-за изменения в области переключения (Bensman M et al., (1988) Nucleic Acids Res, 16(7): 3108). Несмотря на измененную область переключения, псевдоген иммуноглобулина гамма человека IGHGP содержит открытые рамки считывания для всех константных областей тяжелых цепей (CH1-CH3) и шарнира. Все открытые рамки считывания для константных областей его тяжелых цепей кодируют области белка, хорошо выравнивающиеся со всеми константными областями иммуноглобулинов человека с предсказанными структурными особенностями. Указанный дополнительный изотип псевдо-гамма в настоящем документе называется IgGP или IGHGP. Были описаны другие псевдоиммуноглобулиновые гены, такие как псевдогены константных областей тяжелых цепей эпсилон Р1 и Р2 иммуноглобулина человека (IGHEP1 и IGHEP2). Класс IgG чаще всего используют в терапевтических целях. У человека указанный класс включает подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. У мыши указанный класс включает подклассы IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c и IgG3.

Термин "фрагменты иммуноглобулина" в настоящем документе включают, не ограничиваясь перечисленными, (i) область, включающую, например, область CH1, CH2 или CH3, (ii) FAB-фрагмент, состоящий из областей VL, VH, CL или CK и CH1, в том числе Fab' и Fab'-SH, (iii) Fd-фрагмент, состоящий из областей VH и CH1, (iii) dAb-фрагмент (Ward ES et al., (1989) *Nature*, 341(6242): 544-6), который состоит из одной вариабельной области (iv) фрагменты F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два соединенных FAB-фрагмента (v) одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), где область VH и область VL соединены пептидным линкером, что позволяет двум областям связываться с образованием антигенсвязывающего сайта (Bird RE et al., (1988) *Science*, 242(4877): 423-6; Huston JS et al., (1988) *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(16): 5879-83), (vi) "диатела" или "триатела", поливалентные или мультиспецифические фрагменты, сконструированные путем слияния генов (Holliger P et al., (1993) *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(14): 6444-8; Tomlinson I & Holliger P, (2000) *Methods Enzymol*, 326:461-79), (vii) scFv, диатело или область антитела, соединенное(ая) с областью Fc и (viii) scFv, соединенный с тем же или с другим антителом.

Термин "вариабельная область" относится к областям или доменам, опосредующим связывание антигена и определяющим специфичность конкретного антитела в отношении конкретного антигена. Во встречающихся в природе антителах антигенсвязывающий сайт состоит из двух вариабельных областей, определяющих специфичность: одна расположена на тяжелой цепи и называется в настоящем документе вариабельной областью тяжелой цепи (VH), а другая расположена на легкой цепи и называется в настоящем документе вариабельной областью легкой цепи (VL). У человека вариабельная область тяжелой цепи (VH) может быть подразделена на семь подгрупп или подклассов: VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6 и VH7. В некоторых случаях специфичность может быть основана исключительно на одной из указанных двух областей, как в однодоменных антителах, происходящих из состоящих из тяжелых цепей антител, обнаруживаемых у верблюдов. Длина областей V составляет обычно приблизительно 110 аминокислот; они состоят из относительно инвариантных отрезков последовательностей аминокислот, называемых каркасными областями (FR, или "не являющиеся CDR области") длиной 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями чрезвычайной вариабельности, называемых "гипервариабельными областями", длина которых составляет 7-17 аминокислот. Вариабельные домены природных тяжелых и легких цепей содержат четыре области FR, в основном принимающих конформацию бета-листа, соединенных тремя гипервариабельными областями, образующими петли. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости друг от друга за счет областей FR и вместе с гипервариабельными областями другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat EA et al., выше). Термин "гипервариабельная область" в настоящем документе относится к остаткам аминокислот антитела, отвечающим за связывание антигена. Указанная гипервариабельная область обычно содержит остатки аминокислот из "определяющей комплементарность области" или "CDR", при этом последняя отличается максимальной вариабельностью последовательностей и/или вовлечена в распознавание антигена. Для всех вариабельных областей использована нумерация в соответствии с Kabat (Kabat EA et al., выше.).

Используется ряд определений CDR, и такие определения охвачены настоящим описанием. Определение по Kabat основано на вариабельности последовательностей и является наиболее часто используемым (Kabat EA et al., выше.). В отличие от этого, определение по Chothia основано на расположении структурных петель (Chothia & Lesk J. (1987) *Mol Biol*, 196: 901-917). Определение AbM представляет собой компромисс между определениями Kabat и Chothia и используется в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular (Martin ACR et al., (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9268-9272; Martin ACR et al., (1991) *Methods Enzymol*, 203: 121-153; Pedersen JT et al., (1992) *ImmunoMethods*, 1: 126-136; Rees AR et al., (1996) In Stemberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172). Недавно было введено контактное определение (MacCallum RM et al., (1996) *J Mol Biol*, 262: 732-745), основанное на анализе доступных комплексных структур из базы данных Protein Databank. Определение CDR согласно IMGT®, международной информационной системе ImMunoGeneTics® (<http://www.imgt.org>) основано на нумерации IMGT для всех V-областей иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов всех видов (IMGT®, международная информационная система ImMunoGeneTics®; Lefranc MP et al., (1999) *Nucleic Acids Res*, 27(1): 209-12; Ruiz M et al., (2000) *Nucleic Acids Res*, 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res*, 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res*, 31(1): 307-10; Lefranc MP et al., (2005) *Dev Comp Immunol*, 29(3): 185-203; Kaas Q et al., (2007) *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 6(4): 253-64). Все определяющие комплементарность области (области CDR) в настоящем описании определены предпочтительно следующим образом (нумерация в соответствии с Kabat EA et al., выше): LCDR1: 24-34, LCDR2: 50-56, LCDR3: 89-98, HCDR1: 26-35, HCDR2: 50-65, HCDR3: 95-102.

"Не являющиеся CDR области" вариабельного домена известны как каркасные области (FR). "Не являющиеся CDR области" VL в настоящем документе содержат последовательности аминокислот: 1-23 (FR1), 35-49 (FR2), 57-88 (FR3) и 99-107 (FR4). "Не являющиеся CDR области" VH в настоящем документе содержат последовательности аминокислот: 1-25 (FR1), 36-49 (FR2), 66-94 (FR3) и 103-113 (FR4).

Области CDR согласно настоящему изобретению могут содержать «дополненные области CDR» на

основе вышеупомянутых определений, содержащие следующие остатки вариабельных доменов: LCDR1: 24-36, LCDR2: 46-56, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-35, HCDR2: 47-65, HCDR3: 93-102. Для указанных дополненных областей CDR также используется нумерация в соответствии с Kabat et al., выше. "Недополненные области CDR" VL в настоящем документе содержат последовательности аминокислот: 1-23 (FR1), 37-45 (FR2), 57-88 (FR3) и 98 - приблизительно 107 (FR4). "Недополненные области CDR" VH в настоящем документе содержит последовательности аминокислот: 1-25 (FR1), 37-46 (FR2), 66-92 (FR3) и 103 - приблизительно 113 (FR4).

Термин "Fab", или "FAB", "область Fab", или "область FAB" в настоящем документе включает полипептиды, которые содержат константные области VH, CH1, VL и легких цепей иммуноглобулинов. Fab может относиться к указанной области в отдельности, или к указанной области в контексте полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

Термин "Fc", или "Fc-область", в настоящем документе включает полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи антитела, за исключением первой константной области иммуноглобулина. Соответственно Fc относится к последним двум константным областям иммуноглобулина IgA, IgD и IgG, или к последним трем константным областям иммуноглобулина IgE и IgM, и гибкому шарниру в направлении N-конца от указанных областей. В случае IgA и IgM Fc может включать цепь J. В случае IgG Fc содержит области иммуноглобулина С-гамма-2 и С-гамма-3 ($C\gamma_2$ и $C\gamma_3$), и шарнир между С-гамма-1 ($C\gamma_1$) и С-гамма-2 ($C\gamma_2$). Хотя границы области Fc могут варьировать, область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определена таким образом, чтобы включать остатки C226 или P230 на карбоксильном конце, при этом используется нумерация в соответствии с индексом EU. Fc может относиться к указанной области в отдельности, или к указанной области в контексте полипептида Fc, например, антитела.

Термин "константная область иммуноглобулина" в настоящем документе относится к константным областям тяжелых цепей иммуноглобулина или антитела человека или животных и охватывает все изотипы. Предпочтительно, константные области иммуноглобулинов происходят от человека и выбраны из группы, включающей, не ограничиваясь перечисленным:IGHG1 CH1, IGHG2 CH1, IGHG3 CH1, IGHG4 CH1, IGHA1 CH1, IGHA2 CH1, IGHE CH1, IGHEP1 CH1, IGHM CH1, IGHD CH1, IGHGP CH1, IGHG1 CH2, IGHG2 CH2, IGHG3 CH2, IGHG4 CH2, IGHA1 CH2, IGHA2 CH2, IGHE CH2, IGHEP1 CH2, IGHM CH2, IGHD CH2, IGHGP CH2, IGHG1 CH3, IGHG2 CH3, IGHG3 CH3, IGHG4 CH3, IGHA1 CH3, IGHA2 CH3, IGHE CH3, IGHEP1 CH3, IGHM CH3, IGHD CH3, IGHGP CH3, IGHE CH4 и IGHM CH4. Предпочтительные "константные области иммуноглобулина" выбраны из группы, состоящей из IGHE CH2, IGHM CH2, IGHG1 CH3, IGHG2 CH3, IGHG3 CH3, IGHG4 CH3, IGHA1 CH3, IGHA2 CH3, IGHE CH3, IGHM CH3, IGHD CH3 и IGHGP CH3 человека. Более предпочтительные "константные области иммуноглобулина" выбраны из группы, состоящей из IGHG1 CH3, IGHG2 CH3, IGHG3 CH3, IGHG4 CH3, IGHA1 CH3, IGHA2 CH3, IGHE CH3, IGHM CH3, IGHD CH3 и IGHGP CH3 человека.

Термин "область связывания эпитопа" включает полипептид или его фрагмент, содержащий минимальную последовательность аминокислот, обеспечивающую специфическое связывание молекулы иммуноглобулина с одним или более эпитопов. Встречающиеся в природе антитела содержат две области связывания эпитопа, также известные как антигенсвязывающие или комбинирующие сайты, или паратопы. Области связывания эпитопа во встречающихся в природе антителах ограничены областями CDR доменов VH и/или VL, при этом найдены аминокислоты, опосредующие связывание эпитопа. Помимо встречающихся в природе антител могут быть сконструированы искусственные домены VH или домены VL, или их фрагменты и комбинации, для получения областей связывания эпитопа (Holt LJ et al., (2003) Trends Biotechnol, 21(11): 484-490; Polonelli L et al., (2008) PLoS ONE, 3(6): e2371). Примерами основанных не на иммуноглобулинах областей связывания эпитопа могут быть искусственные белковые домены, используемые в качестве "скаффолда" для сконструированных областей связывания эпитопа (Bini HK et al., (2005) Nat Biotechnol, 23(10): 1257-1268) или пептидомиметиков (Murali R & Greene MI (2012) Pharmaceuticals, 5(2): 209-235). Предпочтительно термин "область связывания эпитопа" включает комбинацию одного или более вариабельных доменов тяжелой цепи и одного или более дополняющих вариабельных доменов легких цепей, вместе образующих связывающий сайт, обеспечивающий специфическое связывание молекулы иммуноглобулина с одним или более эпитопов. Примеры области связывания эпитопа, представленные в настоящем изобретении, включают scFv и FAB.

В настоящем документе термин "эпитоп" включает фрагмент полипептида или белка, или небелковую молекулу, обладающую антигенной или иммуногенной активностью у животного, предпочтительно у млекопитающего и наиболее предпочтительно у человека. Эпитоп, обладающий иммуногенной активностью, представляет собой фрагмент полипептида или белка, вызывающий образование антител у животного. Эпитоп, обладающий иммуногенной активностью, представляет собой фрагмент полипептида или белка, с которым специфически связывается антитело или полипептид, согласно оценке с применением любого способа, общезвестного специалисту в данной области техники, например, посредством иммуноанализа. Антигенные эпитопы не обязательно должны быть иммуногенными. Предпочтительно термин "эпитоп" в настоящем документе относится к полипептидной последовательности длиной по меньшей мере приблизительно 3-5, предпочтительно приблизительно 5-10 или 15 и не более чем прибли-

зительно 1000 аминокислот (или любое целочисленное значение в интервале между указанными значениями), определяющих последовательность, которая сама по себе или в виде части большей последовательности связывается с антителом, синтезируемым в ответ на такую последовательность. Не существует критической верхней границы для длины фрагмента, который может содержать практически полноразмерную белковую последовательность, или даже гибридный белок, содержащий один или более эпитопов. Эпитоп для применения в настоящем изобретении не ограничен полипептидом, имеющим точную последовательность части исходного белка, из которого он происходит. Соответственно, термин «эпитоп» охватывает последовательности, идентичные природной последовательности, а также модификации природной последовательности, такие как удаления, добавления и замены (обычно консервативные по природе). Эпитопы белковых антигенов разделены на две категории, конформационные эпитопы и линейные эпитопы, на основе их структуры и взаимодействия со связывающим эпитоп сайтом (Goldsby R et al., (2003) "Antigens (Chapter 3)" Immunology (Fifth edition ed.), New York: W. H. Freeman and Company, pp. 57-75, ISBN 0-7167-4947-5). Конформационный эпитоп состоит из дискретных участков последовательности аминокислот антигена. Указанные эпитопы взаимодействуют с паратопом на основании свойств трехмерной поверхностной структуры и формы или третичной структуры антигена. Большинство эпитопов являются конформационными. В противоположность этому, линейные эпитопы взаимодействуют с паратопом на основании их первичной структуры. Линейный эпитоп образован непрерывной последовательностью аминокислот антигена.

Термин "гетеродимерный иммуноглобулин" или "гетеродимерный фрагмент" или "гетеродимер" или "гетеродимер тяжелых цепей" в настоящем документе включает молекулу иммуноглобулина или ее часть, содержащую, по меньшей мере, первый и второй полипептид, в качестве первой и второй области, при этом последовательность аминокислот указанного второго полипептида отличается от последовательности указанного первого полипептида. Предпочтительно гетеродимерный иммуноглобулин содержит две полипептидные цепи, отличающиеся тем, что первая цепь содержит по меньшей мере одну неидентичную вторую цепь области и при этом обе цепи соединяются, т.е. взаимодействуют, через неидентичные области. Более предпочтительно гетеродимерный иммуноглобулин отличается связывающей специфичностью в отношении по меньшей мере двух разных лигандов, антигенов или связывающих сайтов, т.е. является биспецифическим. Гетеродимерный иммуноглобулин в настоящем документе включает, не ограничиваясь перечисленным, полноразмерные биспецифические антитела, биспецифический Fab, биспецифический F(ab')₂, биспецифический scFv, соединенный с Fc-областью, диатело, соединенное с Fc-областью, и доменное антитело, соединенное с Fc-областью.

Термин "гомодимерный иммуноглобулин", или "гомодимерный фрагмент", или "гомодимер", или "гомодимер тяжелых цепей" в настоящем документе включает молекулу иммуноглобулина или ее часть, содержащую, по меньшей мере, первый и второй полипептид в качестве первой и второй области, при этом последовательность аминокислот указанного второго полипептида идентична последовательности указанного первого полипептида. Предпочтительно гомодимерный иммуноглобулин содержит две полипептидные цепи, отличающиеся тем, что первая цепь содержит по меньшей мере одну идентичную вторую цепь области, и обе цепи соединяются, т.е. взаимодействуют, через идентичные области. Предпочтительно фрагмент гомодимерного иммуноглобулина содержит по меньшей мере две области, отличающиеся тем, что первая область, идентичная второй области, и обе области соединяются, т.е. взаимодействуют через их белковые интерфейсы.

Для всех константных областей иммуноглобулина, включенных в настоящее изобретение, может использоваться нумерация в соответствии с IMGT® (IMGT®, выше).

Для всех константных областей тяжелых цепей CH1, CH2, CH3 иммуноглобулинов человека, выбранных из группы, состоящей изIGHG1, IGHG2, IGHG3 и IGHG4, может использоваться нумерация в соответствии с "системой нумерации EU" (Edelman GM et al., (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Полное описание константных областей CH1, шарнира, CH2 и CH3 IGHG1 человека можно найти в базе данных IMGT (IMGT®, выше).

Для константной области легкой цепи каппа иммуноглобулина человека (IGKC) может использоваться нумерация в соответствии с "системой нумерации EU" (Edelman GM et al., выше). Полное описание области СК человека можно найти в базе данных IMGT (IMGT®, выше).

Для константных областей легких цепей лямбда иммуноглобулина человека (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 и IGLC7) может быть использована нумерация, соответствующая "системе нумерации Kabat" (Kabat EA et al., выше). Полное описание областей IGLC человека можно найти в базе данных IMGT (IMGT; выше).

Константные области тяжелых цепей иммуноглобулина человека IGHG1 в настоящем документе отличаются следующими границами областей: область CH1 (нумерация EU: 118-215), область шарнира γ1 (нумерация EU: 216-230), область CH2 (нумерация EU: 231-340) и область CH3 (нумерация EU: 341-447). Упоминаемая в настоящем документе область СК человека охватывает остатки 108-214 (нумерация EU). Упоминаемые в настоящем документе области IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 и IGLC7 человека охватывают остатки 108-215 (нумерация Kabat).

Термины "аминокислота" или "остаток аминокислоты" в настоящем документе включает природные аминокислоты, а также не встречающиеся в природе аминокислоты. Предпочтительно включены природные аминокислоты. Термин "модификация" или "аминокислотная модификация" в настоящем документе включает замену, вставку и/или удаление аминокислоты в полипептидной последовательности. Термины "замена", или "замена аминокислоты", или "замена остатка аминокислоты" в настоящем документе относятся к замене первого остатка аминокислоты в последовательности аминокислот вторым остатком аминокислоты, при этом указанный первый остаток аминокислоты отличается от второго остатка аминокислоты, т.е. заменяющий остаток аминокислоты отличается от аминокислоты, которая была заменена. Например, замена R94K относится к варианту полипептида, в котором аргинин в положении 94 заменен на лизин. Например, 94K означает замену в положении 94 на лизин. Для целей настоящего изобретения несколько замен, как правило, разделены наклонной чертой или запятой. Например, "R94K/L78V" или "R94K, L78V" относится к двойному варианту, включающему замены R94K и L78V. "Вставка аминокислоты" или "вставка" в настоящем документе означает добавление аминокислоты в конкретном положении исходной полипептидной последовательности. Например, вставка -94 означает вставку в положении 94. "Удаление аминокислоты" или "удаление" в настоящем документе означает удаление аминокислоты в конкретном положении в исходной полипептидной последовательности. Например, R94- означает удаление аргинина в положении 94.

Согласно некоторым вариантам реализации термины "уменьшать", "снижать" или "снижение" связывания с белком А относятся к общему уменьшению по меньшей мере на 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 или 99 и до 100% (элиминация) связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с белком А, детектируемому с применением стандартных известных в данной области техники способов, таких как описанные в настоящем документе, по сравнению с исходным, т.е. немодифицированным иммуноглобулином, или IgG дикого типа, или IgG, содержащим Fc-область IgG человека дикого типа. Согласно конкретным вариантам реализации указанные термины, как вариант, могут относиться к общему 10-кратному уменьшению (т.е. на 1 логарифмическую единицу), 100-кратному (на 2 логарифмических единицы), 1000-кратному (или на 3 логарифмических единицы), 10 000-кратному (или на 4 логарифмических единицы), или 100 000-кратному (или на 5 логарифмических единиц) уменьшению.

Термины "элиминировать", "устранять", "элиминация или "устранение" связывания с белком А относятся к общему уменьшению 100% связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с белком А, т.е. полной утрате связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с белком А, детектируемой с применением стандартных известных в данной области техники способов, таких как описанные в настоящем документе, по сравнению с исходным, т.е. связыванием немодифицированного иммуноглобулина, или IgG дикого типа, или IgG, содержащего Fc-область IgG человека дикого типа.

Аналогичным образом, термины "уменьшать", "снижать" или "снижение" связывания с аффинным реагентом относятся к общему уменьшению по меньшей мере на 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 или 99 и до 100% (элиминация) связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с аффинным реагентом, детектируемому с применением стандартных известных в данной области техники способов, таких как описанные в настоящем документе, по сравнению с исходным, т.е. немодифицированным иммуноглобулином, или IgG дикого типа, или IgG, содержащим Fc-область IgG человека дикого типа. Согласно конкретным вариантам реализации указанные термины, как вариант, могут относиться к общему 10-кратному уменьшению (т.е. на 1 логарифмическую единицу), 100-кратному (на 2 логарифмических единицы), 1000-кратному (или на 3 логарифмических единицы), 10 000-кратному (или на 4 логарифмических единицы), или 100 000-кратному (или на 5 логарифмических единиц) уменьшению.

Термины "элиминировать", "устранять", "элиминация" или "устранение" связывания с аффинным реагентом относятся к общему уменьшению 100% связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с аффинным реагентом, т.е. полной утрате связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с аффинным реагентом, детектируемой с применением стандартных известных в данной области техники способов, таких как описанные в настоящем документе, по сравнению с исходным, т.е. немодифицированным иммуноглобулином, или IgG дикого типа, или IgG, содержащим Fc-область IgG человека дикого типа.

"Биспецифические антитела" представляют собой моно克лональные антитела, способные специфически связывать по меньшей мере два разных антигена. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифические антитела представляют собой биспецифические антитела, содержащие одну или более аминокислотных модификаций в области VH относительно исходного антитела. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифические антитела могут представлять собой антитела человека или гуманизированные антитела. Биспецифические антитела могут также применяться для направления цитотоксических агентов в клетки, экспрессирующие целевой антиген. Указанные антитела содержат связывающий целевой антиген фрагмент, и фрагмент, который связывает цитотоксический агент, например сапорин, анти-интерферон- α , алкалоид барвинка, А-цепь рицина, метотрексат или радиоактивный изотоп гаптена. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагмен-

тов антител. Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники. Традиционно рекомбинантное получение биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелой цепи/легкой цепи иммуноглобулина, при этом две тяжелые цепи отличаются разной специфичностью (Milstein and Cuello, (1983) *Nature*, 305: 537-40). В результате случайного выбора тяжелых и легких цепей иммуноглобулина указанные гибридомы (квадромы) потенциально продуцируют смесь молекул разных антител, из которых только одно имеет корректную биспецифическую структуру. Очищение корректной молекулы, которое обычно выполняется посредством проведения этапов аффинной хроматографии, является достаточно громоздким процессом, и выход продукта незначителен. Аналогичные процедуры раскрыты в WO 1993/08829 и в Traunecker et al., (1991) *EMBO J*, 10: 3655-9. В соответствии с другим подходом вариабельные области антитела с нужными вариантами специфичности связывания (антитело-антigen комбинирующие сайты) соединены с последовательностями константных областей иммуноглобулина. Например, существует гибрид с константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий по меньшей мере часть областей шарнира, CH2 и CH3. Согласно некоторым вариантам реализации первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствует по меньшей мере в одном из гибридолов. ДНК, кодирующие гибриды тяжелых цепей иммуноглобулина и, при необходимости, легких цепей иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессионные векторы и совместно трансфицируют подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает гибкость при корректировке соотношений трех полипептидных фрагментов во вариантах реализации в тех случаях, когда использование при конструировании неравных пропорций указанных трех полипептидных цепей обеспечивает оптимальный выход. Вместе с тем, возможно встраивание кодирующих последовательностей двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессионный вектор, в тех случаях, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных пропорциях обеспечивает высокие выходы, или в тех случаях, когда пропорции не имеют большого значения.

Биспецифические антитела включают связанные перекрестными связями или «гетероконъюгатные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть соединено с avidinом, а другое с биотином. Такие антитела были, например, предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (US 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 1991/00360, WO 1992/00373 и EP 03089). Гетероконъюгатные антитела могут быть получены с применением любого удобного способа перекрестного шиваания. Подходящие перекрестно-шивущие агенты хорошо известны в данной области техники (см. US 4676980) наряду с рядом техник перекрестного шиваания. Также включены антитела, отличающиеся более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифические антитела (см. Tutt A et al. (1991) *J. Immunol.* 147: 60-9).

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен биспецифический гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент или биспецифическое полноразмерное антитело, которое связывается с CD3 и ассоциированными с заболеванием антигенами, выбранными из групп: опухолевых антигенов, цитокинов, факторов роста сосудов и лимфоангиогенных факторов роста. Предпочтительно, биспецифический гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, или биспецифическое антитело связывается с CD3 и ассоциированным с заболеванием антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD33, TROP2, CD105, GD2, GD3, CEA, VEGFR1, VEGFR2, NCAM, CD133, CD123, ADAM17, MCSP, PSCA, FOLR1, CD19, CD20, CD38, EpCAM, HER2, HER3, pЭФР, ПСМА, IgE, интегрина a4b1, CCR5, LewisY, FAP, MUC-1, Wue-1, MSP, EGFRvIII, Р-гликопротеина, АФП (альфа-фетопротеина), ALK, белков BAGE, CD30, CD40, CTLA4, ErbB3, ErbB4, мезотелина, OX40, CA125, CAIX, CD66e, cMet, EphA2, HGF/SF, MUC1, фосфатидилсерина, TAG-72, TPBG, β-катенина, brc-ab1, BRCA1, BORIS, CA9, каспазы-8, CDK4, циклина-B1, CYP1B1, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, GAGE-1, GAGE-2, GloboH, глипикана-3, GM3, gp100, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MAGE1, MAGE2, MAGE3, MAGE4, MAGE6, MAGE12, MART-1, ML-IAP, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Mucl6, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR-85, NY-ESO1, pl5, p53, PAP, PAX3 PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, белков RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвибина, TAG-72, TRФ-β, TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, тирозиназы, уроплакина-3, ПСМА. Предпочтительно биспецифическое гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, или биспецифическое антитело связывается с CD3 и HER2, или CD3 и CD38, или CD3 и OX40.

Белок А:

Белок А представляет собой продуцируемый несколькими штаммами компонент клеточной стенки *Staphylococcus aureus*, который состоит из одной полипептидной цепи. Генный продукт белка А состоит из пяти гомологичных повторов, прикрепленных в последовательном порядке к клеточной стенке патогена. Длина указанных пяти доменов составляет приблизительно 58 аминокислот; они называются ED-ABC и каждый из них проявляет связывающую активность в отношении иммуноглобулинов (Tashiro M & Montelione GT (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5(4): 471-481). Пять гомологичных иммуноглобулин-связывающих доменов укладываются в трехспиральный пучок. Каждый домен способен связывать белки многих видов млекопитающих, в первую очередь IgG (Hober S et al., (2007) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 848(1): 40-47). Белок А связывает тяжелую цепь большинства иммуноглобу-

линов в области Fc, а также области Fab в случае семейства VH3 человека (Jansson B et al, (1998) FEMS Immunol. Med. Microbiol., 20(1): 69-78). Белок A связывает IgG различных видов, включая человека, мышь, кролика и морскую свинку, но не связывает человека IgG3 (Hober S. et al., (2007) выше). Неспособность IgG3 человека связывать белок A может объясняться заменами H435R и Y436F в области Fc IgG3 человека (нумерация EU, Jendeberg et al., (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34). Помимо IgG, белок A также взаимодействует с IgM и IgA.

Среди подклассов VH человека VH3 является единственным подклассом, связывающим белок A (Graille M et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(10): 5399-5404), и известно, что все пять доменов белка A связывают указанный подкласс вариабельных доменов (Jansson B et al, (1998) FEMS Immunol. Med. Microbiol., 20(1): 69-78.) Иммуноглобулины на основе VH3 или их фрагменты имеют важное значение для биотехнологической промышленности. Молекулы на основе VH3 интенсивно разрабатывались, поскольку способность связывать белок A облегчает их предварительный функциональный скрининг, и, соответственно, многие синтетические или донорные библиотеки фагового дисплея или технологии на основе трансгенных животных, используемые для поиска антител, основаны на подклассе VH3. Кроме того, молекулы на основе VH3 часто выбирают ввиду хорошей экспрессии и стабильности по сравнению с другими известными подклассами вариабельных доменов тяжелых цепей.

Способность белка A связывать антитела с такой высокой аффинностью является движущим мотивом для использования в промышленном масштабе при производстве биологических лекарственных средств. Белок A, используемый для получения антител для биофармацевтических средств, обычно получают рекомбинантным путем с применением *E. coli*; и он функционирует по существу так же, как и природный белок A (Liu HF et al., (2010) MAbs, 2(5): 480-499).

Чаще всего для очищения антител рекомбинантный белок A связывают со стационарной фазой на хроматографической смоле. Оптимальное связывание происходит при pH8,2, хотя связывание также эффективно происходит в нейтральных или физиологических условиях (pH 7,0-7,6). Элюирование обычно обеспечивается за счет сдвига pH в сторону кислотных значений pH (глицин-HCl, pH2,5-3,0). При этом происходит эффективная диссоциация большинства связывающих взаимодействий белок-белок и анти-тело-антigen без необратимого изменения белковой структуры. Тем не менее, некоторые антитела и белки повреждаются при низких значениях pH, и оптимальной является нейтрализация непосредственно после восстановления путем добавления 1/10 по объему щелочного буфера, например, 1M Tris-HCl с pH 8,0 для минимизации продолжительности периода условий, отличающегося низкими значениями pH.

Существуют различные коммерчески доступные хроматографические смолы с белком A. Основные отличия между указанными средами заключаются в типе поддерживающей матрицы, модификациях лиганда - белка A, размере пор и размере частиц. Различия указанных параметров приводят к различиям в сжимаемости, химической и физической устойчивости, сопротивления диффузии и связывающей способности адсорбентов (Hober S et al., (2007), выше). Примеры хроматографических смол белка A включают, не ограничиваясь перечисленными, смолу с белком A MabSelect SuRe™ и смолу с белком A Mab Select™ от GE Healthcare, используемые в примерах.

Термин "хроматография" относится к жидкостной хроматографии белков и включает жидкостную экспресс-хроматографию белков (FPLC/ЖЭХБ), которая представляет собой форму жидкостной хроматографии, часто используемую для анализа или очищение смесей белков. Как и при других видах хроматографии, возможность разделения обеспечивается тем, что разные компоненты смеси обладают разным сродством в отношении двух материалов, потока жидкости (подвижная фаза), который проходит через пористое твердое вещество (неподвижная фаза). В методе FPLC подвижная фаза представляет собой водный раствор, или "буфер". Скорость потока буфера может обеспечиваться действием силы тяжести или контролироваться плунжерным насосом, как правило, обеспечивающим постоянную скорость, при этом состав буфера может быть различным, посредством втягивания жидкостей в разных пропорциях из двух или более внешних резервуаров. Неподвижная фаза представляет собой смолу, состоящую из гранул, обычно из сшитой перекрестными связями агарозы, которыми заполнена цилиндрическая стеклянная или пластиковая колонка. Доступны смолы для FPLC с разнообразными размерами гранул и поверхностных лигандов в зависимости от применения.

Процесс "аффинной хроматографии" включает применение аффинного реагента в качестве лигандов, которые связаны перекрестными связями с неподвижной фазой и имеют сродство к связыванию в отношении специфических молекул или класса молекул. Лиганды могут представлять собой биомолекулы, например, белковые лиганды, или могут представлять собой синтетические молекулы. Оба типа лигандов, как правило, имеют выраженную специфичность. Наиболее часто используемым в производстве белковым лигандом является аффинный реагент белок A. В аффинной хроматографии, в тех случаях, когда раствор (например, неочищенный клеточный супернатант, содержащий представляющий интерес белок) загружают на колонку, целевой белок обычно адсорбируется, а загрязняющие примеси (другие белки, липиды, углеводы, ДНК, пигменты и т.п.) проходят через колонку. Собственно адсорбентом обычно наполняют колонку для хроматографии; хотя этап адсорбции может выполняться с применением адсорбента в виде перемешиваемой суспензии в периодическом режиме связывания. Следующим этапом

после адсорбции является этап промывки, на котором адсорбент промывают для удаления остаточных загрязняющих веществ. Связанный белок затем элюируют в получистой или чистой форме. Элюирование обычно достигается путем замены буфера или солевого состава таким образом, чтобы указанный белок уже не был способен взаимодействовать с иммобилизованным лигандом и происходило его высвобождение. В некоторых случаях представляющий интерес белок может не связываться с аффинной смолой и аффинная хроматография используется для связывания нежелательных загрязняющих примесей, и, соответственно, для выделения представляющего интерес белка собирают несвязанную фракцию. Аффинная хроматография может выполняться в неподвижном слое или в псевдоожиженном слое.

Термин "градиентная хроматография" относится к хроматографическому методу, отличающемуся тем, что доля "элюирующего" буфера (буфер В) увеличивается от 0 до 100% плавно или пошагово.

Термины "хроматография в режиме захвата/элюирования" или "режим очищения с захватом/элюированием" или "очищение с захватом/элюированием" относится к хроматографическому методу, отличающемуся тем, что доля "элюирующего" буфера (буфер В) не увеличивается от 0 до 100% плавно или пошагово; 100% элюирующего буфера применяется непосредственно после захвата, и, необязательно, проводится этап отмычки подвижным буфером (буфер А).

Разработка гетеродимерных иммуноглобулинов, нацеленных на CDS в настоящем изобретении предложена область связывания эпитопа, которая связывает белковый комплекс CD3, содержащий области CDR тяжелых и легких цепей согласно описанию выше и дополнительно содержащий каркасную область вариабельного домена тяжелой цепи, представляющую собой продукт или происходящую из гена человека IGHV3-23*04 (SEQ ID NO: 22). Каркасная область вариабельного домена тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию соответствующей каркасной области вариабельной области тяжелой цепи соответствующего антитела мыши ОКТ3, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 18. Предпочтительно указанная аминокислотная модификация представляет собой замену аминокислоты. Как правило, осуществляется не более чем семь, предпочтительно не более чем шесть, предпочтительно не более чем пять, предпочтительно не более чем четыре, более предпочтительно не более чем три, еще более предпочтительно не более чем два, наиболее предпочтительно не более чем одна аминокислотная модификация в составе каркасной области. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена область связывания эпитопа, которая связывается с белковым комплексом CD3, при этом аминокислотная модификация каркасных областей вариабельной области тяжелой цепи включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: 34, 48, 49, 58, 69, 71 и 73; при этом положение аминокислоты каждого члена группы обозначено в соответствии с нумерацией Kabat. Предпочтительно замены аминокислот каркасных областей вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из I34M, V48I, A49G, R58N, R58Y, I69L, A71T и T73K. Предпочтительными являются замены аминокислот каркасных областей вариабельной области тяжелой цепи в положениях аминокислот, выбранных из группы, состоящей из 34, 49 и 71. Более предпочтительные замены аминокислот каркасных областей вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из I34M, A49G и A71T.

Согласно дополнительному аспекту область связывания эпитопа первого полипептида, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит каркасную область вариабельного домена легкой цепи, представляющую собой продукт или происходящую из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 23) и IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 24). Каркасная область вариабельного домена легкой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию соответствующей каркасной области вариабельной области легкой цепи соответствующего антитела мыши ОКТ3, содержащего последовательность аминокислот, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 19. Предпочтительно указанная аминокислотная модификация представляет собой замену аминокислоты. Как правило, в состав каркасной области вводят не более чем восемь, предпочтительно не более чем семь, предпочтительно не более чем шесть, предпочтительно не более чем пять, предпочтительно не более чем четыре, более предпочтительно не более чем три, еще более предпочтительно не более чем две, наиболее предпочтительно не более чем одну аминокислотную модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена область связывания эпитопа, которая связывается с белковым комплексом CD3, при этом аминокислотная модификация каркасных областей последовательности вариабельной области легкой цепи содержит замену аминокислоты в положении аминокислоты, выбранном из группы, состоящей из: 4, 33, 34, 46, 47, 66, 71 и 96. Предпочтительно замены аминокислот каркасных областей вариабельной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, R66G, F71Y и P96F. Предпочтительные замены аминокислот каркасных областей вариабельной области легкой цепи расположены в положениях аминокислот, выбранных из группы, состоящей из 4, 46 и 47. Более предпочтительные замены аминокислот каркасных областей вариабельной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из M4L, L46R, L47W и F71Y. Согласно некоторым вариантам реализации область связывания эпитопа первого полипептида, которая связывается с белковым комплексом CD3, может содержать аминокислотные модификации каркасных областей последовательности вариабельной области тяжелой цепи, описанные выше, и аминокислотные модификации кар-

касных областей последовательности вариабельной области легкой цепи, описанные выше.

В настоящем изобретении также предложено антитело или его фрагмент, которое(ый) связывается с белковым комплексом CD3, содержащим последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 27-38, 64-68 и 359, предпочтительно состоящей из последовательности SEQ ID NO: 359. В настоящем изобретении также предложено антитело или его фрагмент, которое(ый) связывается с белковым комплексом CD3, содержащим последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 39-47, 69-90 и 360, предпочтительно состоящей из последовательности SEQ ID NO: 360.

При условии, что каждая из указанных последовательностей вариабельных областей тяжелых и легких цепей может связываться с белковым комплексом CD3, последовательности вариабельных областей тяжелых и легких цепей могут быть «смешаны и скомбинированы» для получения связывающих анти-CD3 молекул согласно настоящему изобретению. Связывание с CD3 таких "смешанных и скомбинированных" антител может быть протестировано с применением анализов связывания, описанных, например, в разделе примеров.

Конструирование константной области иммуноглобулина для стимуляции преимущественного образования гетеродимеров, а не гомодимеров Способы получения гетеродимерных иммуноглобулинов известны в данной области техники; один из простейших способов основан на экспрессии двух отдельных иммуноглобулиновых цепей в одной клетке (WO 95/33844, Lindhofer H & Thierfelder S). Указанный простой метод без использования конструирования ограничен преимущественным образованием гомодимерных компонентов, а не представляющего интерес гетеродимера (Kufer P et al., (2004) Trends Biotechnol., 22(5): 238-244). При использовании дополняющих технологий, усиливающих гетеродимеризацию тяжелых цепей (Merchant AM et al., (1998) Nat. Biotechnol., 16(7): 677-681), может быть достигнуто получение большего количества гетеродимеров, при формировании, тем не менее, значительного количества нежелательных гомодимеров (Jackman J et al., (2010) J Biol Chem., 285(27): 20850-9, Klein C et al., (2012) MAbs, 4(6): 653-63). В настоящем изобретении, соответственно, используется описанная технология BEAT® (публикация РСТ № WO 2012/131555), который основан на уникальной концепции биомикрии, обеспечивающей достижение гетеродимеризации лучше известных из предшествующего уровня техники способов. Технология BEAT основана на обмене интерфейсов между встречающимися в природе гомо- или гетеродимерными парами иммуноглобулиновых доменов для получения новых гетеродимеров, которые подходят для применения в качестве строительных блоков для биспецифических антител на основе Fc.

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, содержащий первый и второй полипептиды, содержащие сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированным доменом CH3, имеющим белок-белковый интерфейс, при этом белок-белковый интерфейс первого полипептида содержит замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90 (нумерация IMGT®), а белок-белковый интерфейс второго полипептида содержит замену аминокислоты в положении 84.4 и в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90 (нумерация IMGT®).

Согласно дополнительному варианту реализации в настоящем изобретении предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, отличающийся тем, что первый и второй полипептиды содержат сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированным доменом CH3, имеющим белок-белковый интерфейс, при этом белок-белковый интерфейс первого полипептида содержит замену аминокислоты в положении 88 и в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86 и 90 (нумерация IMGT®), а белок-белковый интерфейс второго полипептида содержит замену аминокислоты в положении 85.1 и/или 86 и в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 88 и 90 (нумерация IMGT®), и остаток аминокислоты, замененный в положении 88 в первой сконструированной константной области иммуноглобулина взаимодействует с остатком аминокислоты, замененным в положении 85.1 и/или 86 во второй сконструированной константной области иммуноглобулина, при этом положение аминокислоты каждого члена группы обозначено в соответствии с нумерацией IMGT®.

Предпочтительно остаток аминокислоты, который заменен в белок-белковом интерфейсе первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 88, представляет собой 88W и его консервативные аминокислотные замены, при этом положение аминокислоты обозначено в соответствии с нумерацией IMGT®. Более предпочтительно, остаток аминокислоты, который заменен в белок-белковом интерфейсе первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 88, представляет собой 88W; при этом дополнительный остаток аминокислоты, замененный в белок-белковом интерфейсе первой сконструированной константной области иммуноглобулина выбран из группы, состоящей из 3A, 20V, 20T, 20A, 20N, 20Q, 20E, 20S, 20K, 20W, 22A, 22G, 22T, 22L, 22I, 22V, 26R, 26Q, 26T, 26K, 26V, 26S, 26N, 26E, 79Y, 85.1T, 85.1M, 85.1A, 85.1S, 85.1R, 85.1H, 85.1K, 85.1F, 85.1C, 85.1N, 85.1W, 86S, 86I, 86T, 86H, 86Q, 86V, 86W, 86Y, 86F и 90N, при этом положение аминокис-

лоты обозначено в соответствии с нумерацией IMGT®.

Предпочтительно, остаток аминокислоты, который заменен в положении 85 и 86 в белок-белковом интерфейсе второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из: 85.1A, 85.1S, 85.1C и 86S, и их консервативных аминокислотных замен (нумерация IMGT®). Более предпочтительно остаток аминокислоты, который заменен в белок-белковом интерфейсе второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из: 85.1A, 85.1S, 85.1C и 86S; при этом дополнительный остаток аминокислоты, замененный в белок-белковом интерфейсе второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 26T, 81D, 84L, 84.2E, 88R и 90R и их консервативных аминокислотных замен (нумерация IMGT®).

Согласно предпочтительному варианту реализации остаток аминокислоты, который заменен в белок-белковом интерфейсе первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 88, представляет собой 88W; при этом дополнительный остаток аминокислоты, замененный в белок-белковом интерфейсе первой сконструированной константной области иммуноглобулина, представляет собой: 3A, 20K, 22V, 26T, 79Y, 85.1S, 86V и 90N, и при этом остатки аминокислот, которые заменены в белок-белковом интерфейсе второй сконструированной константной области иммуноглобулина в положениях 85.1 и 86, представляют собой 85.1A, 85.1S или 85.1A и 86S; при этом дополнительный остаток аминокислоты, замененный в белок-белковом интерфейсе второй сконструированной константной области иммуноглобулина, представляет собой: 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 26T, 81D, 84L, 84.2E, 84.4Q, 88R и 90R (нумерация IMGT®).

Согласно альтернативному варианту реализации в настоящем изобретении предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, отличающийся тем, что первый и второй полипептиды содержат сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированным доменом CH3, имеющим белок-белковый интерфейс, при этом белок-белковый интерфейс первого полипептида содержит замену аминокислоты в положении 20, и в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90, белок-белковый интерфейс второго полипептида содержит замену аминокислоты в положении 26 и в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 22, 27, 79, 81, 84, 85.1, 86, и 88, а остаток аминокислоты, замененный в положении 20 в первой сконструированной константной области иммуноглобулина, взаимодействует с остатком аминокислоты, замененным в положении 26 во второй сконструированной константной области иммуноглобулина, при этом положение аминокислоты каждого члена группы обозначено в соответствии с нумерацией IMGT®.

Предпочтительно остатки аминокислот, которые заменены в белок-белковом интерфейсе первой сконструированной цепи иммуноглобулина, содержат остатки аминокислот в положениях 20 и 22, и, необязательно, дополнительный остаток аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 и 90; при этом остатки аминокислот, которые заменены в белок-белковом интерфейсе второй сконструированной цепи иммуноглобулина, содержат остатки аминокислот в положениях 26 и в дополнительном положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 20, 22, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 и 90, при этом положение аминокислоты каждого члена группы обозначено в соответствии с нумерацией IMGT®. Предпочтительно, остатки аминокислот, которые заменены в белок-белковом интерфейсе первой сконструированной цепи иммуноглобулина, содержат остатки аминокислот в положениях 20 и 22, и, необязательно, дополнительный остаток аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 и 90; при этом остатки аминокислот, которые заменены в белок-белковом интерфейсе второй сконструированной цепи иммуноглобулина, содержат остатки аминокислот в положениях 26 и 86 и, необязательно, в дополнительном положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 88 и 90, при этом положение аминокислоты каждого члена группы обозначено в соответствии с нумерацией IMGT®.

Более предпочтительно остаток аминокислоты, который заменен в положении 20 в белок-белковом интерфейсе первой сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из 20V, 20T, 20A, 20N, 20Q, 20K, 20S, 20W и 20E; при этом дополнительный остаток аминокислоты, замененный в белок-белковом интерфейсе первой сконструированной константной области иммуноглобулина выбран из группы, состоящей из 3A, 22A, 22G, 22L, 22I, 22V, 22T, 26K, 26R, 26Q, 26T, 26V, 26S, 26N, 26E, 79Y, 85.1W, 85.1F, 85.1T, 85.1M, 85.1A, 85.1S, 85.1R, 85.1H, 85.1K, 85.1C, 85.1N, 86W, 86Y, 86S, 86I, 86H, 86Q, 86V, 86T, 86F, 88Q, 88L, 88V, 88R, 88E, 88T, 88I, 88Y, 88K, 88W и 90N, а остаток аминокислоты, который заменен в положении 26 в белок-белковом интерфейсе второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из 26T и 26E и их консервативных аминокислотных замен, при этом положение аминокислоты обозначено в соответствии с нумерацией IMGT®.

Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации остаток аминокислоты, который заменен в белок-белковом интерфейсе первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 20, представляет собой 20K; при этом дополнительный остаток аминокислоты, замененный в

белок-белковом интерфейсе первой сконструированной константной области иммуноглобулина, представляет собой 3A, 22V, 26T, 79Y, 85.1S, 86V, 88W и 90N; при этом остатки аминокислот, которые заменены в белок-белковом интерфейсе второй сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 26, представляет собой 26T; при этом дополнительный остаток аминокислоты, замененный в белок-белковом интерфейсе второй сконструированной константной области иммуноглобулина, представляет собой 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 81D, 84L, 84.2E, 84.4Q, 85.1C/S/A, 86S, 88R и 90R (нумерация EV1GT®).

Разработка гетеродимерных иммуноглобулинов, нацеленных на CDS и ассоциированный с заболеванием антиген

На первом этапе (пример 1) замены, которые уменьшают или устраниют связывание с белком A, анализировали в гомодимерных иммуноглобулинах на основе фрагментов FAB или scFv. Было обнаружено, что присутствие вариабельного домена тяжелой цепи подкласса VH3 в составе тяжелой цепи, содержащего замены, обеспечивающие снижение или отсутствие связывания с белком A, препятствует использованию любых способов дифференциального аффинного очищения на основе белка A. Решения для устранения указанных основных затруднений при использовании способов дифференциального аффинного очищения на основе белка A были найдены в виде замен в каркасной области, уменьшающих или устраниющих связывание с белком A, в подклассе VH3.

На втором этапе (пример 2.1) получали гуманизированное антитело, нацеленное на CD3 человека (эпсилон-субъединицу), прививая области CDR антитела мыши против CD3 на каркасные области IGVH3-23 и IGVK1 или IGVK3 зародышевой линии человека. В оптимальных гуманизированных вариантах устранен сайт связывания белка A в домене VH путем замены G65S или N82aS (нумерация Kabat). Указанные варианты получали в форме фрагментов FAB или scFv.

На третьем этапе были получены антигенсвязывающие сайты антител, нацеленные на ассоциированные с заболеванием антигены. Области CDR антител мыши могут быть привиты на каркасные области зародышевой линии человека IGVH3-23 и IGVK1 (примеры 2.3, 2.4 и 2.6-2.10). Как вариант, области CDR антител, выделенные из библиотеки фагового дисплея, могут быть основаны на вариабельных доменах подкласса VH3 или привиты на каркасные области зародышевой линии человека IGVH3-23 и IGVK1 (примеры 2.5 и 2.6). Сайт связывания белка A в домене VH области связывания эпигопа устранили с помощью замен G65S или N82aS (нумерация Kabat).

На четвертом этапе получали гетеродимерные антитела на основе технологии BEAT® (согласно описанию в WO 2012/131555), для которой использовали антитело против CD3 из примера 2.1 и область связывания эпигопа ассоциированного с заболеванием антигена согласно описанию в примерах 2.2-2.10 в формате scFv-FAB, или наоборот (пример 3.1). Поскольку различие в числе сайтов связывания белка A между гомо- и гетеродимерными компонентами может применяться для выделения гетеродимерного компонента посредством хроматографии с белком A, биспецифические антитела согласно настоящему изобретению сконструировали таким образом, чтобы один из указанных двух гомодимерных компонентов не содержал сайта связывания белка A и, соответственно, не связывался со смолой с белком A. Далее, для улучшения профиля безопасности антител BEAT, связывание с Fc-рецептором уменьшили или элиминировали путем введения двух замен L234A и L235A (нумерация EU) в нижнюю шарнирную область Fc-области.

Примеры

Материалы и методы

Конструирование экспрессионных векторов для транзиентной экспрессии в клетках млекопитающих

кДНК, кодирующие разные полипептидные цепи частично или полностью, сначала были получены путем генного синтеза в GENEART AG (Регенсбург, Германия) и модифицированы с применением стандартных техник молекулярной биологии. Продукты ПЦР расщепляли подходящими ферментами рестрикции ДНК, очищали и лигировали в модифицированную плазмиду pcDNA3.1 (Invitrogen AG, Цуг, Швейцария), несущую промотор ЦМВ и последовательность полиаденилирования бычьего гормона (поли(A)), ранее расщепленные теми же ферментами рестрикции ДНК. Все полипептидные цепи независимым образом лигировали в указанный экспрессионный вектор, при этом секреция управлялась лидерным пептидом VJ2C мыши.

Экспрессирование рекомбинантных белков

Антитела, ScFv-Fc гибридные белки, антитела BEAT и антигены экспрессировали согласно описанию ниже, если не указано иное. Для транзиентной экспрессии равными количествами векторами со каждой из сконструированных цепей совместно трансфицировали адаптированные к супензии клетки HEK293-EBNA (стандарты ATCC-LGL, Теддингтон, Великобритания; Кат. № CRL-10852) с применением полиэтиленимина (PEI; Sigma, Бакс, Швейцария). Как правило, 100 мл клеток в супензии с плотностью 0,8-1,2 млн клеток на мл трансфицировали смесью ДНК-ПЭИ. После введения в клетки-хозяева рекомбинантных экспрессионных векторов, каждый из которых кодирует гены сконструированных цепей, получали иммуноглобулиновую конструкцию путем последующего культивирования указанных

клеток на протяжении периода продолжительностью от 4 до 5 дней для обеспечения секреции в культуральную среду (EX-CELL 293, бессывороточная среда для клеток HEK293 (Sigma), с добавлением 0,1% плакороновой кислоты, 4мМ глутамина и 0,25 мкг/мл генетицина). Бесклеточные культуральные супернатанты, содержащие секретированные иммуноглобулины, получали путем центрифугирования с последующей стерилизующей фильтрацией и использовали для дальнейшего анализа.

Дифференциальная аффинная хроматография с белком А (пример 1)

Очищение фрагмента Fc 133 и гомодимерных иммуноглобулинов scFv-Fc

Хроматография в режиме захвата/элюирования

Супернатанты кондиционировали 0,1 объема (V) 1M Tris-HCl, pH 8,0 перед очищением. Sepharose™ 4 Fast Flow с белком G (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбрugg, Швейцария; кат. №17-0618-01) добавляли в кондиционированные супернатанты. Смеси инкубировали в течение ночи при 4°C. После инкубирования связанные белки промывали 10 CV ФСБ с pH 7,4, элюировали 4 объемами колонки (CV) 0,1M глицина с pH 3,0 и нейтрализовали 0,1 объемами 1M Tris-HCl с pH 8,0. Супернатант, проточные фракции и элюированные фракции анализировали в невосстановливающих условиях посредством ДСН-ПААГ (Bis-Tris 4-12% акриламид NuPAGE, Invitrogen AG, Базель, Швейцария).

Градиентная хроматография

После получения клеточные культуральные супернатанты, содержащие фрагмент Fc 133, сначала очищали с помощью хроматографии в режиме захвата/элюирования с применением Sepharose™ 4 Fast Flow с белком G (выше). Элюированный материал, полученный с помощью хроматография в режиме захвата/элюирования, затем загружали на колонку с белком A объемом 1 мл HiTrap™ MabSelect SuRe™ (мутанты по сайту связывания белка A). Колонку предварительно уравновешивали 0,2M цитратно-фосфатного буфера pH 8,0 и использовали в хроматографической системе ÄKTA Purifier™ (и колонка, и инструмент от GE Healthcare Europe GmbH; кат. № колонки 11-0034-93) при скорости потока 1 мл/мин. Элюирование проводили в линейном градиенте pH, комбинируя различные количества двух буферов (подвижный буфер (A): 0,2M цитратно-фосфатный буфер с pH 8,0; элюирующий буфер (B): 0,04M цитратно-фосфатный буфер с pH 3,0. Линейный градиент повышался от 0% B до 100% B в пяти объемах колонки (CV). Элюированные фракции нейтрализовали 0,1 объемами 1M Tris-HCl с pH 8,0. Супернатант, проточные фракции и элюированные фракции анализировали в невосстановливающих условиях посредством ДСН-ПААГ (Bis-Tris 4-12% акриламид NuPAGE, Invitrogen AG, Базель, Швейцария).

Очищение FAB-Fc и FAB-фрагментов гомодимерных иммуноглобулинов

После получения клеточные культуральные супернатанты кондиционировали 0,1 объемами 1M Tris-HCl, pH 8,0. Смолу с белком L (Genescrypt, Пискатауэй, США) добавляли в кондиционированный супернатант и инкубировали в течение ночи при 4°C. После инкубирования связанные белки промывали десятью CV ФСБ, pH 7,4, элюировали 4CV 0,1M глицина с pH 3,0, и, наконец, нейтрализовали 0,1 объемами 1M Tris-HCl с pH 8,0. Для оценки связывания с белком A очищенный на белке L FAB вводили в колонку 1 мл HiTrap Mab Select™ (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбрugg, Швейцария) при pH 8,0 (буфер с лимонной кислотой/Na₂HPO₄). Элюирование выполняли с применением линейного градиента pH, комбинируя различные количества двух буферов (подвижный буфер (A): 0,2 M цитратно-фосфатный буфер pH 8,0 и элюирующий буфер (B): 0,04 M цитратно-фосфатный буфер pH 3,0). Использовали линейный градиент от 0% B до 100% B в 5 объемах колонки. Элюированные фракции нейтрализовали 0,1 объемами 1M Tris-HCl pH 8,0. Супернатант, проточные фракции и элюированные фракции анализировали в невосстановливающих условиях посредством ДСН-ПААГ (Bis-Tris 4-12% акриламид NuPAGE, Invitrogen AG, Базель, Швейцария).

Очищение и тестирование гомодимерных FAB-Fc и scFv-Fc иммуноглобулинов на основе VH3 с устраниенным сайтом связывания белка A в доменах Fc и VH3.

Схема очищения включала хроматографию в режиме захвата/элюирования с последующей градиентной хроматографией в соответствии с описанной выше процедурой.

Дифференциальная аффинная хроматография с белком А (примеры 1 и 3)

После получения бесклеточные супернатанты загружали на колонку HiTrap™ MabSelect SuRe™ объемом 1 мл с белком A, предварительно уравновешенную 0,2M цитратно-фосфатным буфером с pH 6,0, и проводили через хроматографическую систему ÄKTA Purifier™ (и первое, и второе от GE Healthcare Europe GmbH; колонка Кат.№: 11-0034-93) при скорости потока 1 мл/мин. В качестве подвижного буфера использовали 0,2 M цитратно-фосфатный буфер с pH 6. Элюирование представляющего интерес гетеродимера выполняли с применением 20 mM натрий-цитратного буфера с pH 4, а гомодимерные компоненты элюировали 0,1 M глицином, pH 3,0.

После элюирования проводили считывание OD при 280 нм; фракции, содержащие представляющий интерес гетеродимер, объединяли и нейтрализовали 0,1 объема 1M Tris с pH 8,0 (Sigma).

Супернатант, проточные фракции и элюированные фракции анализировали в невосстановливающих условиях посредством ДСН-ПААГ (Bis-Tris 4-12% акриламид NuPAGE, Invitrogen AG, Базель, Швейцария).

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Показатели термостабильности антител сравнивали с применением калориметрических измерений.

Калориметрические измерения проводили на VP-DSC дифференциальном сканирующем микрокалориметре (MicroCal-GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбрugg, Швейцария). Объем ячейки составлял 0,128 мл, скорость нагревания составляла 1°C/мин и избыточное давление поддерживали на уровне 64 фунтов на квадратный дюйм. Все белковые фрагменты использовали в концентрации 1-0,5 мг/мл в ФСБ (рН 7,4). Молярную теплоемкость каждого белка оценивали путем сравнения с дублирующими образцами, содержащими идентичный буфер, из которых белок был исключен. Частные молярные теплоемкости и кривые плавления анализировали с применением стандартных процедур. В термограммы вводили поправки на фон и нормировали концентрации перед дальнейшим анализом с применением недвухуровневой модели ("Non-two State") в программном обеспечении Origin v7.0.

Известны ожидаемые профили плавления подклассов IgG человека (Garber E & Demarest SJ (2007) Biochem Biophys Res Commun, 355(3): 751-7); все профили, как было показано, включают три этапа развертывания, соответствующие независимому развертыванию доменов CH2, CH3 и FAB. Из четырех подклассов IgG человека IGHG1 содержит наиболее стабильный домен CH3 (~85°C); хотя другие подклассы доменов CH3 менее стабильны, но не известен ни один с температурой плавления ниже 70°C. Аналогичным образом, известно, что все подклассы имеют температуру плавления домена CH2 ~70°C.

Оценка чистоты при помощи капиллярного гель-электрофореза (пример 3.2) Получение невосстановленных образцов 40 мкл обессоленного белкового образца забуферивали ДСН-буфером для образцов (Beckman Coulter International S.A., Ньон, Швейцария, набор IgG Purity Kit, Кат.№: A10663), содержащие 5 mM йодацетамида (Sigma). К образцам добавляли внутренний стандарт 10 кДа. Смеси образцов нагревали при 70°C в течение 10 мин.

Капиллярный гель-электрофорез

После получения образцы проводили через систему ProteomeLab PA 800 (Beckman Coulter International S.A., Ньон, Швейцария), оснащенную детектором с фотодиодной матрицей (DAD), настроенный на 220 нм. Неизолированные капилляры из плавленого кварца с внутренним диаметром 50 мкм × 30,2 см (эффективная длина до детектора 20,2 см) использовали в качестве среды для разделения. Введение и разделение образцов выполняли при постоянном напряжении 5 и 15 кВ, соответственно, с обратной полярностью в гелевом буфере с ДСН для разделения по молекулярной массе. Данные регистрировали при частоте 2 Гц; в процессе разделения ток был стабилен. Капилляры и образцы термостатировали при 25°C.

Измерения аффинности с помощью ППР (пример 1)

ППР-тестирование FAB-фрагментов с устраниенным связыванием с белком А

кДНК, кодирующую внеклеточную область HER2 человека, соединенную с Fc-фрагментом IGHG1 клонировали в экспрессионный вектор, аналогичный экспрессионным векторам с тяжелыми и легкими цепями, описанным выше, и временно трансфицировали клетки HEK293E с применением ПЭИ-метода (см. публикацию РСТ №: WO2012131555). Супернатанты кондиционировали 0,1 объемами 1 M Tris-HCl pH8,0 и антиген очищали посредством хроматографии с белком А с захватом/элюированием согласно описанию в примере 1. Для ППР-экспериментов использовали сенсорный чип с моноклональным антителом мыши против IgG человека (Fc), что позволяло осуществить захват гибрида Fc с рекомбинантным антигеном HER2 в правильной ориентации (набор для захвата антител человека, кат. № BR-1008-39, GE Healthcare Europe GmbH). Измерения регистрировали с помощью инструмента BIACore™ 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбрugg, Швейцария). FAB против HER2 в разных разведениях (50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,57; 0,78; 0,39 нМ) вводили на сенсорный чип на протяжении 4 мин при 30 мкл/мин. Для каждого измерения спустя 7 мин диссоциации вводили 3M раствор MgCl₂ в течение 1 мин при 30 мкл/мин для регенерации. Данные (сенсограмма: fc2-fc1) аппроксимировали моделью 1:1 по Ленгмюру. Для учета экспериментальных вариаций в захваченных HER2-Fc в начале каждого измерения значение Rmax устанавливали на локальный уровень для всех аппроксимаций. Измерения выполняли в двух повторностях, и включали образцы с нулевой концентрацией в качестве референсных. И критерий хи-квадрат, и остаточные значения использовали для оценки качества аппроксимации между экспериментальными данными и индивидуальными моделями связывания

Измерения аффинности с помощью ППР (примеры 2 и 3)

ППР-анализ использовали для измерения констант скорости ассоциации и диссоциации в кинетике связывания разных антител (антитела мыши и гуманизированные антитела). Кинетику связывания антител измеряли с помощью инструмента BIACore 2000 (BIACore-GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбрugg, Швейцария) при комнатной температуре и анализировали в программном обеспечении BiaEvaluation (версия 4.1, BIACore-GE Healthcare Europe GmbH).

Измерения осуществляли на сенсорных чипах CM5 (GE Healthcare Europe GmbH, Кат.№: BR-1000-14), индивидуально связанных с представляющим интерес лигандом с применением коммерческого набора для сшивания аминами (Amine Coupling Kit, GE Healthcare Europe GmbH, Кат. №: BR-1000-50). Лицанд белок G получали от Pierce (Thermo Fisher Scientific-Perbio Science S.A., Лозанна, Швейцария, Кат. № 21193).

Данные (сенсограмма: fc2-fc1) аппроксимировали моделью 1:1 по Ленгмюру с переносом или без переноса масс в соответствии с показаниями. В экспериментах по захвату, для учета экспериментальных

вариаций в начале каждого измерения значение R_{max} устанавливали на локальный уровень для всех аппроксимаций. Время диссоциации составляло по меньшей мере 350 секунд. Измерения проводили в трех повторностях и включали образцы с нулевой концентрацией в качестве референсных. И хи-квадрат, и остаточные значения использовали для оценки качества аппроксимации между экспериментальными данными и индивидуальными моделями связывания.

Измерения аффинности на клетках HPB-ALL при помощи FACS

Клетки HPB-ALL (DSMZ, Брауншвейг, Германия, Кат. №: ACC483) использовали в качестве положительной по CD3 клеточной линии для окрашивания с помощью FACS. HPB-ALL поддерживали на среде RPMI 1640 с добавлением 10% ЭТС и 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. По 100 мкл серийных разведений гибридного антитела ОКТ3 и его гуманизированных вариантов инкубировали с 4×10^5 клеток HPB-ALL в ФСБ с добавлением 1% БСА и 0,1% азida натрия (называемом FACS-буфером) на протяжении 45 минут на льду. Нерелевантный IgG1 человека использовали в качестве контрольного изотипа, а гибридное антитело ОКТ3 в качестве положительного контроля. После промывания клетки инкубировали с Fc-ФЭ против человека в разведении 1/200 (EBioscience, Вена, Австрия) в течение 45 мин на льду. Затем клетки снова промывали и ресуспендировали в 200 мкл FACS-буфера. Относительное среднее значение флуоресценции каждого образца измеряли на аппарате FACSCalibur (BD Biosciences, Альпвиль, Швейцария). Результаты обобщены на фиг. 9 в виде относительного окрашивания HPB-ALL по сравнению с гибридным антителом ОКТ3.

Клеточные линии для анализов *in vitro*

Положительные по HER2 клеточные линии человека

Клетки человека, экспрессирующие антиген HER2, были описаны в публикации РСТ №: WO2010108127. В настоящем изобретении использовали положительные по HER2 клеточные линии человека: BT474 (стандарты ATCC-LGL; Кат. № HTB-20)

Условия культивирования: среда RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием ЭБС, 1% пенициллина-стрептомицина (Invitrogen AG, Кат. № 10378-016), 1% раствора пирувата натрия (PAA Laboratories, Пашинг, Австрия; Кат. № S11-003), 1% MEM С заменимыми аминокислотами (PAA Laboratories, Кат. №: M11-00dsmz3) и 1% GlutaMAX-1 (Invitrogen AG, Кат. № 35050-038) в 150 см² колбе для тканевых культур (TPR, Траздинген, Швейцария; Кат. №: 90150). Клетки пересевали дважды в неделю. JIMT-1 (DSMZ, Брауншвейг, Германия, Кат. № ACC589)

Условия культивирования: Модифицированная по Дульбекко эссенциальная среда (DMEM (1X)) + GlutaMAX-1 (Invitrogen AG, Кат. № 31966-012) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ЭБС, 1% пенициллина-стрептомицина (Invitrogen AG, Кат. № 10378-016), 1% раствора пирувата натрия (PAA Laboratories, Кат. № S11-003), 1% MEM с заменимыми аминокислотами (PAA Laboratories, Кат. №: M11-003) и 1% GlutaMAX-1 (Invitrogen AG, Кат. №: 35050-038). Клетки пересевали 2-3 раза в неделю.

MDA-MB-231 (стандарты ATCC-LGL; Кат. № HTB-26).

Условия культивирования: такие же условия культивирования, что и для JIMT-1.

HT-1080 (стандарты ATCC-LGL; Кат. № CCL-121).

Условия культивирования: клетки HT1080 культивировали на среде EMEM с добавлением 10% инактивированной нагреванием ЭБС, 1% пенициллина-стрептомицина (Invitrogen AG, Кат. № 10378-016) и 1% глутамина (Invitrogen AG, Кат. № 25030-024). Клетки культивировали, разделяя три раза в неделю (в разведении 1 к 6).

NCI-N87 (стандарты ATCC-LGL; Кат. № CRL-5822).

Условия культивирования: клетки NCI-N87 культивировали в среде RPMI 1640 с 10% инактивированной нагреванием ЭБС, 1% пенициллина-стрептомицина (Invitrogen AG, Кат. № 10378-016), 1% раствора пирувата натрия (PAA Laboratories, Пашинг, Австрия; Кат. № S11-003), 1% MEM с заменимыми аминокислотами (PAA Laboratories, Кат. № M11-00dsmz3) и 1% глутамина (Invitrogen AG, Кат. № 25030-024). Клетки разделяли дважды в неделю (в разведении 1 к 3).

Положительные по CD38 клеточные линии человека

Клетки человека, экспрессирующие антиген CD38, были описаны в публикациях РСТ №№ WO 2005103083, WO 2008047242, WO 011154453 и WO 012092612. В настоящем изобретении использовали следующие положительные по CD38 клеточные линии человека:

Стабильные рекомбинантные клетки CHO[CD38]

Ген, кодирующий человека CD38, заказывали в Source Biosciences (Берлин, Германия, Кат. №: IRAU37D11, 4309086). CD38 человека амплифицировали с применением праймеров с добавлением последовательности Козак, стартового кодона, за которым следовал сигнальный пептид (лидерная последовательность V мыши) на 5'-конце и сайта рестрикции NheI на 3'-конце. Ампликон разрезали с применением NheI и HindIII и клонировали в экспрессионную кассету pT1 полученного из pkDNA3.1 вектора (Invitrogen AG), разработанного своими силами. Экспрессионная кассета pT1 связывает экспрессию гена, представляющего интерес, с экспрессией GFP и PAC (ген устойчивости к пуромицину) с применением двух сайтов IRES (участок внутренней посадки рибосомы) на полицистронной мРНК. Получали плазмидную ДНК в формате Midiprep и наличие клонированной открытой рамки считывания CD38 подтверждали путем секвенирования ДНК. Суспензию клеток CHO-S (Invitrogen AG) трансфицировали с приме-

нением полиэтиленимина (JetPEI®, PolyPlus-трансфекция, Илькирш, Франция) в биореакторе объемом 50 мл (биореакторы TubeSpin 50, TPP, Тразадинген, Швейцария). С указанной целью растущие клетки в экспоненциальной фазе высевали на среду OptiMEM (Invitrogen AG, Кат. № 31985-047). В клетки добавляли комплекс JetPEI®:ДНК. Через 5 ч инкубации клеток комплексом JetPEI®: ДНК при 37°C при встряхивании (200 RPM) для эндоцитоза в клеточную супензию добавляли 1 объем культуральной среды PowerCHO2 (Lonza, поставщик RUWAG Lifescience, Бетлах, Швейцария, Кат. № BE12-771Q) с добавлением 4 mM глутамина. Затем клетки инкубировали на колебательной платформе при 37°C, 5% CO2 и 80% влажности. Через день после трансфекции клетки в разных концентрациях высевали в 96-луночные планшеты на селективную среду, содержащую пуромицин (Sigma, Кат.№: P8833 - 25 мг). Приблизительно через 14 дней селекции в статических условиях, 46 объединенных пулов высокоэкспрессирующих GFP клеток размножали в виде супензионных культур в биореакторах TubeSpin 50. После успешной адаптации к супензии клетки анализировали на CD38 посредством FACS. Отбирали и применяли в настоящем изобретении стабильные клонсы CHO[CD38] с профилем гомогенного окрашивания CD38.

Другие положительные по CD38 клеточные линии включали:

NCI-H929 (стандарты ATCC-LGL; Кат. № CRL-9068)

Namalwa (стандарты ATCC-LGL; Кат. № CRL-1432)

U266 (стандарты ATCC-LGL; Кат. № TIB-196)

RPMI 8226 (стандарты ATCC-LGL; Кат. № CCL-155)

Условия культивирования: среда RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной нагреванием ЭБС, 1% пенициллина/стрептомицина (Invitrogen AG) и 1% GlutaMAX-1 (Invitrogen AG)

Raji (стандарты ATCC-LGL; Кат. № CCL-86)

Daudi (стандарты ATCC-LGL; Кат. № CCL-213)

Положительные по ОХ40 клеточные линии человека

Клетки человека, экспрессирующие ОХ40 антиген, были описаны в публикации РСТ № WO 2013008171.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и НВР-ALL представляют собой примеры положительных по ОХ40 клеточных линий человека.

В настоящем изобретении применяли стабильные рекомбинантные клетки CHO[OX40].

Клетки рекомбинантной клеточной линии CHO, несущие синтетическую кДНК, кодирующую ОХ40 человека, конструировали с применением протокола, аналогичного описанному выше протоколу для стабильной рекомбинантной клеточной линии CHO[CD38].

Положительные по CD20 клеточные линии человека

Клетки человека, экспрессирующие антиген CD20, были описаны в публикации РСТ № WO 010095031. Примером раковых клеток CD20+ являются раковые клетки линии Daudi (стандарты ATCC-LGL; Кат. № CCL-213); указанные В-лимфобластные раковые клетки культивировали на среде RPMI 1640 (Sigma) с добавлением 20% ЭБС и 1% пенициллина/стрептомицина; 1% L-глутамина; 1% пирувата Na и 1% NEAA (заменимых аминокислот). Клетки культивировали при 37°C с добавлением 5% CO2.

Положительные по рЭФР клеточные линии человека

Клетки человека, экспрессирующие антиген рЭФР, были описаны в публикации РСТ № WO 2010108127. Примером рЭФР+ раковых клеток являются раковые клетки линии HT-29 (стандарты ATCC-LGL; Кат. № HTB-38), указанные клетки рака ободочной и прямой кишки культивировали в среде Мак-Коя 5A (Sigma) с добавлением 10% ЭБС и 1% пенициллина/стрептомицина; 1% L-глутамина; 1% пирувата Na и 1% NEAA. Клетки культивировали при 37°C с добавлением 5% CO2.

Положительные по CD19 клеточные линии человека

Клетки человека, экспрессирующие антиген CD19 были описаны в публикации РСТ № WO 2010/095031. Клетки Namalwa (стандарты ATCC-LGL; Кат. № CRL-1432) и Raji (стандарты ATCC-LGL; Кат. № CCL-86) представляют собой примеры положительных по CD20 клеточных линий человека.

Положительные по мембранныму IgE клеточные линии человека

В публикации РСТ № WO 2010/033736 на стр. 71 описан способ переключения классов в клетках МКПК человека на продуцирующие IgE В-клетки путем добавления интерлейкина 4 (ИЛ-4) и антитела против CD40.

Рекомбинантные целевые антигены

Гибридный белок CD3 гамма-эпсилон человека и Fc

кДНК кодирующие внеклеточную область CD3-гамма человека (№ доступа UniProt P09693, остатки 23-103 (SEQ ID NO: 184); UniProt Consortium (2013) Nucleic Acids Res., 41 (выпуск базы данных): D43-7; <http://www.uniprot.org/>) соединенная с внеклеточной областью CD3-эпсилон человека (№ доступа UniProt P07766, остатки 22-118 (SEQ ID NO: 185)) пептидный линкер длиной 26 остатков (последовательность: GSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGS; SEQ ID NO: 186) сначала были синтезированы GENEART AG (Регенсбург, Германия). Указанный синтетический ген соединяли с частью Fc IgG1 человека с применением стандартных техник ПЦР с перекрывающимися праймерами; кДНК-матрицу Fc IgG1 человека также получают от Geneart AG. Полученную кДНК клонировали в модифицированную плазмиду

pcDNA3.1, упомянутую выше.

Для транзиентной экспрессии белка CD3 гамма-эпсилон-Fc (SEQ ID NO: 187) рекомбинантным вектором трансформировали адаптированные к суспензии клетки HEK-EBNA (ATCC-CRL-10852) с применением полизтиленимина (ПЭИ) согласно описанию выше. Конструкцию CD3-гамма-эпсилон-Fc затем очищали из бесклеточного супернатанта с применением рекомбинантной среды Streamline rProtein A (GE Healthcare Europe GmbH, Глассбрюгг, Швейцария) и использовали для дальнейшего анализа.

Гибридные белки CDS-эпсилон человека и яванского макака с 1-26 Fc кДНК, кодирующую CD3-эпсилон человека пептид 1-26 (№ доступа UniProt P07766, аминокислоты 23-48, SEQ ID NO: 188) и кДНК, кодирующую пептид 1-26 CB3-эпсилон яванского макака (№ доступа UniProt Q95LI5, аминокислоты 22-47, SEQ ID NO: 189) ПЦР-амплифицировали из синтетических кДНК, полученных от GENEART A.G. для внеклеточных областей CD3-эпсилон человека и яванского макака, соответственно. Затем амплифицированные продукты соединяли с Fc-частью IgG1 человека с применением стандартных техник ПНР с перекрывающимися праймерами. кДНК-матрицу IgG1 Fc человека получали от Geneart AG. Полученную кДНК клонировали в модифицированную плазмиду pcDNA3.1, упомянутую выше.

Для транзиентной экспрессии конструкций CD3-эпсилон человека и яванского макака (SEQ ID NO: 190 и 191, соответственно) рекомбинантными векторами трансформировали в адаптированные к суспензии клетки HEK-EBNA (ATCC-CRL-10852) с применением полизтиленимина (ПЭИ) согласно описанию выше. Затем гибридные конструкции CD3-эпсилон очищали из бесклеточного супернатанта с применением рекомбинантной среды Streamline rProtein A (GE Healthcare Europe GmbH, Глассбрюгг, Швейцария) и использовали для дальнейшего анализа. Указанные два гибридных белка называются в настоящем документе гибридными белками CD3-эпсилон и 1-26_Fc человека и яванского макака.

Внеклеточная область HER2 человека

Составы с растворимой внеклеточной областью HER2 были описаны в публикации PCT № WO 2012131555. Получали растворимую внеклеточную область HER2 человека, соединенную с полигистидиновой меткой (называемую в настоящем документе HER2-his) или соединенную с областью Fc IgG1 человека (называемую в настоящем документе HER2-Fc).

Внеклеточные области CD38 человека и яванского макака

кДНК CD38 человека получали от Source Biosciences (Erwin-Negelein-Haus, Германия, Кат. №: IRAU37D11, 4309086), ее внеклеточную область (№ доступа UniProt P28907 остатки 43-300) ПЦР-амплифицировали и клонировали в собственный экспрессионный вектор, происходящий из pcDNA3.1 (Invitrogen AG). Указанный экспрессионный вектор включал последовательность Козак и стартовый кодон, за которым следует лидерный пептид VJ2C мыши на 5'-конце и 6-His-метку на 3'-конце сайта множественного клонирования. Растворимую внеклеточную область CD38 человека, соединенную с 6-His-меткой (SEQ ID NO: 192) экспрессировали и очищали следующим образом: один объем среды RPMI 1640 (PAA Laboratories, Кат. № E15-039), содержащий клетки HEK, 0,1% плuronовой кислоты (Invitrogen AG), экспрессионный вектор и полизтиленимин (JetPEI®, PolyPlus-трансфекция, Илькирш, Франция) инкубировали в качалочной колбе при 37°C, 5% CO₂ и 80% влажности. Один объем среды ExCe11293 с добавлением 6 mM глутамина добавляли в смесь через 4 ч и продолжали дополнительную инкубацию, в общей сложности составлявшую 5 дней. После получения центрифугированием получали бесклеточный супернатант и фильтровали с применением 0,2 мкм фильтров, pH доводили до 7,4 (4°C) с применением Tris 1M с pH 8,7. Гранулы Ni-Sepharose Excell (GE Healthcare, Кат. № 17-3712-03) добавляли в раствор и инкубировали в течение ночи при 4°C при встряхивании. Раствор загружали на колонку Econo-Column (Bio-Rad Laboratories AG, Рейнак, Швейцария, Кат. № 737-4252) для очищения за счет гравитации. Гранулы промывали в ФСБ (2×), 20 mM имидазоле, и белок элюировали в ФСБ, 500 mM имидазола. Элюированные фракции объединяли и проводили буферный обмен в ФСБ за два этапа диализа при 4°C. Очищенную внеклеточную область CD38 человека фильтровали с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,22 мкм. С применением способов согласно описанию выше растворимую внеклеточную область антигена CD38 яванского макака, соединенную с 6-His-меткой (SEQ ID NO: 193) клонировали, экспрессировали и очищали.

Внеклеточная область OX40 человека

Способ получения растворимой внеклеточной области OX40 человека был описан в публикации PCT № WO 2013008171.

Внеклеточная область рЭФР человека

Пример состава с растворимой внеклеточной областью антигена рЭФР был описан в публикации PCT № WO 2012131555.

Анализ перенаправления Т-клеточного киллинга *in vitro*

Получение мононуклеарных клеток периферической крови

Для получения мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) получали фильтры для крови, содержащие лейкоциты человека, из Центра сбора крови, La-Шо-де-Фоне, Швейцария (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Serologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Клетки извлекали с фильтров путем обратной промывки 60 мл ФСБ, содержащего 10 Ед/мл ликвемина (Drossapharm AG, Люцерн,

Швейцария). Затем МКПК очищали с применением фильтрующих пробирок для разделения крови объемом 50 мл (Бруншвиг, Базель, Швейцария) в соответствии с инструкциями изготовителя. Пробирки центрифугировали в течение 20 мин при 800 g при комнатной температуре (без торможения) и собирали клетки с поверхности. Клетки промывали 3-кратно средой Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI, PAA Laboratories, Пашинг, Австрия) без ЭБС или забуференным фосфатом солевым раствором (ФСБ). МКПК ресуспендировали с плотностью 10e6 клеток/мл в среде RDL (RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) и пенициллина/стрептомицина) и культивировали в течение ночи при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ до анализа.

Составы с Т-клетками

Очищение Т-клеток выполняли непосредственно после выделения МКПК с применением набора для тотального выделения Т-клеток Pan T Cell Isolation Kit II (Mylenyi Biotec GmbH, Бергиш Гладбах, Германия, Кат.№: 130-091-156) в соответствии с инструкциями изготовителя. После очищения Т-клетки ресуспендировали с плотностью 10e6 клеток/мл в среде RDL и культивировали в течение ночи при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ до анализа.

Анализ считываний

Два разных считывания, дававших высокосопоставимые результаты, использовали для количественного определения перенаправленного киллинга.

Метод проточной цитометрии, называемый в настоящем документе методом RDL-FACS, основан на флуоресцентной цитометрии согласно описанию в Schlereth B et al. ((2005) Cancer Res, 65: 2882-2889), Moore PA et al. ((2011) Blood, 117(17): 4542-51) и Friedrich M et al. ((2012) Mol Cancer Ther, 11: 2664-2673). Целевые клетки собирали, подсчитывали, однократно промывали и ресуспендировали с плотностью 5×10e6 клеток/мл в ФСБ + 1 мкм карбоксифлуоресцена сукциниimidэфира (CFSE, Sigma). Клетки инкубировали в течение 15 мин при 37°C при осторожном перемешивании каждые 5 мин. Нагруженные CFSE клетки промывали трехкратно средой RDL и ресуспендировали с плотностью 2×10e5 клеток/мл в среде RDL. МКГЖ собирали, подсчитывали и ресуспендировали с плотностью 2×10e6 клеток/мл в среде RDL. Серийные разведения антител (3-кратные разведения растворов) получали в среде RDL. Целевые клетки (50 мкл/лунку), Т-клетки (50 мкл/лунку) и 3-кратные разведения растворов антител (50 мкл/лунку) распределяли в плоскодонном 96-луночном планшете (TPP, Тразадинген, Швейцария). Соотношение эффекторных к целевым клеткам составляло 10:1. Планшеты инкубировали в течение 48 часов в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C. После инкубирования планшеты центрифугировали в течение 3 минут при 300 g, супернатанты утилизировали, вытряхивая планшеты. Планшеты промывали однократно 200 мкл ФСБ, повторно центрифугировали, и утилизировали ФСБ. Добавляли предварительно нагретый раствор аккутазы (Invitrogen AG) и инкубировали планшеты 10 мин при 37°C. Отделившиеся адгезивные клетки ресуспендировали пипетированием после добавления 100 мкл среды RDL. Раствор переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном (TPP). Планшеты с U-образным дном центрифугировали в течение 3 мин при 300 g, супернатанты утилизировали и клетки ресуспендировали в 200 мкл холодного FACS-буфера (ФСБ + 2% ЭБС + 10% версена) с добавлением 7-AAD (Becton Dickinson AG, Альшвиль, Швейцария) в разведении 1/40. Планшеты непосредственно регистрировали на цитометре Guava easy-Cytel™ Flow Cytometer (Millipore AG, Цуг, Швейцария). Для каждой лунки определяли абсолютное число живых целевых клеток посредством гейтирования CFSE-положительной 7ADD- отрицательной популяции с применением программного обеспечения Flowjo® (Miltenyi Biotec GmbH, Бергиш Гладбах, Германия). Процент специфической цитотоксичности для каждого образца определяли с применением условий, в которых в качестве исходных инкубировали только целевые клетки. Значения EC₅₀ определяли с применением метода нелинейной регрессии с вариабельным наклоном с помощью программного обеспечения Prism (программное обеспечение GraphPad, Ла Хойя, Калифорния, США). Процент специфического перенаправленного лизиса (RDL) рассчитывали путем вычитания процента специфической цитотоксичности в условиях без антитела с условиями добавления экспериментального антитела.

Способ оценки жизнеспособности клеток, называемый в настоящем документе методом RDL-MTS, основан на колориметрическом методе оценки жизнеспособности клеток согласно описанию у Bühlert et al. ((2008) Cancer Immunol Immunother, 57: 43-52, Labrijn AF et al. ((2013) Proc Natl Acad Sci USA, 110(13): 5145-50) и в публикации PCT № WO 2012143524. Целевые клетки собирали, подсчитывали, однократно промывали и ресуспендировали с плотностью 2×10e5 клеток/мл в среде RDL. МКПК собирали, подсчитывали и ресуспендировали с плотностью 2×10e6 клеток/мл в среде RDL. Серийные разведения антител (3-кратные разведения растворов) получали в среде RDL. Целевые клетки (50 мкл/лунку), Т-клетки (50 мкл/лунку) и 3-кратные разведения растворов антитела (50 мкл/лунку) распределяли в плоскодонном 96-луночном планшете (TPP). Отношение эффекторных к целевым клеткам составляло 10:1. Планшеты инкубировали в течение 48 ч в инкубаторе 5% CO₂ при 37°C. После инкубирования супернатанты утилизировали и планшеты промывали 3 раза 200 мкл ФСБ для удаления МКПК, и затем добавляли в каждую лунку по 100 мкл среды RDL. Считывание выполняли с применением набора CellTiter 96® (Promega AG, Дюбендорф, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 10-20 мкл реагента MTS добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали 2-6 ч в инкубаторе 5% CO₂ при 37°C. Затем

считывали поглощение при 490 нм на планшет-ридере BioTek Synergy (BioTek AG, Люцерн, Швейцария). Процент специфического киллинга рассчитывали с применением указанной формулы: Специфический киллинг = $100 \times [(SD-Sp)/(SD-MD)]$. SD представляет собой поглощение, измеренное в условиях спонтанной гибели, когда целевые клетки инкубировали отдельно. Sp представляет собой поглощение, измеренное при каждом условии тестирования (целевые клетки + МКПК + антитело). MD представляет собой поглощение, измеренное в условиях максимальной гибели, когда целевые клетки лизировали путем проведения 3 циклов замораживания-размораживания. Процент специфического перенаправленного лизиса (RDL) рассчитывали путем вычитания процента специфической цитотоксичности в условиях без антитела из процента специфической цитотоксичности в условиях добавления экспериментального антитела. Значения EC₅₀ определяли с применением метода нелинейной регрессии с вариабельным наклоном с помощью программного обеспечения Prism (программное обеспечение GraphPad).

Модель с ксенотрансплантатами

Ксенотрансплантаты JIMT-1

Клеточные линии и реагенты

Клетки клеточной линии карциномы молочной железы JIMT-1 получали от DSMZ (Кат. № ACC589). Клетки поддерживали на среде DMEM (1X) с GlutaMAX™-1 (Invitrogen AG, Кат. № 31966-021) с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) (AMTMED, Лондон, Великобритания, Кат. № Z10834P), 1% пенициллина-стрептомицина (Invitrogen AG, Кат. № 10378-016), 1% раствора пирувата натрия (PAA Laboratories, Кат. № S11-003), 1% MEM с заменимыми аминокислотами (PAA Laboratories, Кат. № M11-003) и 1% GlutaMAX™-1 (Invitrogen AG, Кат. № 35050-038). Клетки разделяли дважды в неделю с применением аккутазы StemPro Accutase (Invitrogen AG, Кат. № A11105-01).

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) собирали с фильтров для крови, содержащих лейкоциты человека, из Центра сбора крови в Ла-Шо-де-Фоне, Швейцария (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Serologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Клетки извлекали с фильтров путем обратной промывки 60 мл ФСБ, содержащего 10 Ед/мл ликвемина (Drossapharm AG, Люцерн, Швейцария). Затем МКПК выделяли 50 мл с помощью фильтрующих пробирок для разделения крови (Бруншвиг, Базель, Швейцария) в соответствии с инструкциями изготовителя: Пробирки центрифугировали 20 мин при 800 g при КТ (без торможения) и клетки собирали с поверхности. Клетки промывали 3-кратно средой Мемориального института Розуэлла Парка без ЭБС (RPMI, Invitrogen AG, Кат. № 21875-091). МКПК ресуспенсировали с плотностью 10⁶ клеток/мл в среде RPMI с добавлением 10% ЭБС(AMIMED), 1% пенициллина-стрептомицина (Invitrogen AG) и культивировали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Целевые клетки собирали, подсчитывали, однократно промывали и ресуспенсировали с плотностью 5×10⁶ клеток/мл в ФСБ.

Мышь и условия проведения экспериментов

Эксперименты *in vivo* проводили на самках мышей с иммунодефицитом NOD.CB17/AlhnRj-Prkdc^{scid}/Rj (NOD/SCID) возрастом 5 недель, для которых характерен дефицит Т-клеток, В-клеток и естественных киллерных клеток (Janvier Labs, Сен-Бертевен, Франция). Мышей содержали в стерильных стандартизованных условиях среды в стандартных клетках-микроизоляторах для грызунов (20 +/- 1°C комнатная температура, 50 ± 10% относительной влажности, 12-часовой свето-темновой цикл). Мыши получали облученную пищу, подстилку и профильтрованную через фильтр с размером пор 0,22 мкм питьевую воду. Все эксперименты проводились в соответствии со швейцарскими законами о защите животных с разрешения компетентных кантональных органов (Кантон Невшатель, Швейцария). В соответствии с Законом о защите животных необходимо проводить эвтаназию мышей при объемах опухолей, превышающих 2000 mm³. Статистический анализ со сравнением среднего объема опухоли в соответствующих экспериментальных группах и в получавшей носитель контрольной группе выполняли с применением однофакторного анализа ANOVA и параметрических тестов Бонферрони.

У всех мышей перед имплантацией удаляли волосяной покров на правом боку с применением крема VEET (Reckitt Benckiser AG, Валлизеллен, Швейцария). В день имплантации и затем еженедельно мышей фотографировали и измеряли массу тела. Каждое животное получало 5×10⁶ МКПК человека, смешанных с 5×10⁶ клеток JIMT-1 карциномы молочной железы в конечном объеме 0,2 мл ФСБ. Участвовали четыре разных донора МКПК. Смесь МКПК/JIMT-1 инъектировали подкожно в правый бок каждой мыши NOD/SCID. Включали контрольную группу, получавшую 5×10⁶ клеток JIMT-1 карциномы молочной железы в конечном объеме 0,2 мл ФСБ без добавления какого-либо количества МКПК человека. В каждой группе из десяти получавших трансплантаты JIMT-1/МКПК животных (по одной группе на каждого донора МКПК), пять животных получали внутривенное лечение биспецифическим антителом HER2/CD3-1 в концентрации 0,05 mg/kg через 3 ч после трансплантации в объеме 100 мкл. Лечение повторяли 3 раза в неделю, каждые два дня, на протяжении двух недель. Опухоли измеряли дважды в неделю с применением калипера в двух перпендикулярных направлениях; объемы опухолей вычисляли в соответствии с следующей формулой: объем опухоли = [(ширина 2 × длина)/2].

Пример 1. Определение мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание с белком А, в

подклассе VH3

Известны способы устранения связывания с белком А в константной области иммуноглобулина (Lindhofer H. et al., (1995) J Immunol, 155(1): 219-225; US6, 551, 592; Jendeberg L. et al., (1997), J Immunol Methods, 201(1): 25-34; публикация РСТ № WO 2010151792). Для оценки применения способов устранения связывания полноразмерных гомодимерных иммуноглобулинов с белком А получали гомодимерный иммуноглобулин против HER2 на основе смешанного IGHG1-IGHG3 Fc-формата и соответствующий контрольный фрагмент Fc 133. Гомодимерный иммуноглобулин против HER2 получали в формате, аналогичном встречающемуся в природе антителу, и он состоял из FAB-фрагмента, специфического в отношении HER2, соединенного с фрагментом Fc 133 (последовательность Fc, происходящая из встречающегося в природе изотипа IGHG3 человека, последовательностью шарнира которого заменили полную последовательность шарнира встречающегося в природе изотипа IGHG1 человека, сокращенно Fc 133 с SEQ ID NO:1 - причем цифры в названии соответствуют изотипическому подклассу иммуноглобулинов гамма для каждого домена в следующем порядке: шарнир/CH2/CH3; соответствующий полноразмерный иммуноглобулин против HER2, называемый в настоящем документе FAB-Fc против HER2 133; тяжелая цепь с SEQ ID NO: 2 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3). После трансфекции связывание гомодимера FAB-Fc против HER2 133 и фрагмента Fc 133 с белком А анализировали с помощью градиентной хроматографии в соответствии с протоколом, описанным в разделе "Материалы и методы". Как видно на фиг. 3 и 4А, фрагмент Fc 133 не связывался с коммерческой смолой с белком А MabSelect SuRe™ (GE Healthcare Europe GmbH), тогда как гомодимер FAB-Fc против HER2 133 был способен к указанному связыванию.

Для оценки вклада константных доменов FAB описанный выше гомодимер против HER2 реструктурировали, получая молекулу scFv-Fc против HER2, где единица scFv состояла из исходных вариабельных иммуноглобулиновых доменов, соединенных линкером длиной 15 аминокислот (сокращенно в настоящем документе scFv-Fc 133 против HER2; тяжелая цепь с SEQ ID NO: 4). Полученный гомодимер scFv-Fc 133 против HER2, соответственно, был идентичен исходному гомодимерному иммуноглобулину против HER2 FAB-Fc 133, но не содержал константных доменов CH1 и СК. Как видно на фиг. 4В, гомодимер scFv-Fc 133 демонстрировал связывание с белком А, которое наблюдалось и для исходного гомодимерного иммуноглобулина против HER2. Указанное открытие приводит к выводу, что вариабельные домены FAB-фрагмента, направленного против HER2, препятствовали эффективному применению способов, устраняющих связывание с белком А Fc-части гомодимерных иммуноглобулинов. Что еще более важно, был сделан вывод о том, что связывание с белком А в вариабельных доменах гомодимерных иммуноглобулинов предотвращает получение гетеродимерных иммуноглобулинов на основе техники дифференциального очищения с белком А.

Известно, что все пять доменов белка А связывают вариабельные домены тяжелых цепей из подкласса вариабельных доменов VH3 (Jansson B et al., (1998) FEMS Immunol. Med. Microbiol., 20(1): 69-78); известно, что указанное свойство затрудняет получение FAB-фрагментов на основе VH3 после расщепления целых молекул антител папаином, поскольку белок А связывает как FAB-фрагменты на основе VH3, так и Fc-фрагменты. Вариабельный домен тяжелой цепи, обнаруживаемый в гомодимерном иммуноглобулине против HER2 или его scFv-Fc-версии, принадлежит к подклассу VH3-23, что объясняет связывание указанными гомодимерными молекулами белка А, несмотря на отсутствие сайта связывания белка А в составе сконструированных областей Fc.

Иммуноглобулины на основе VH3 или их фрагменты имеют важное значение для биотехнологической промышленности. Молекулы на основе VH3 интенсивно разрабатывались, поскольку способность связывать белок А облегчает их предварительный функциональный скрининг, и соответственно многие синтетические или донорные библиотеки фагового дисплея или технологии на основе трансгенных животных, используемые для поиска антител, основаны на подклассе доменов VH3. Кроме того, молекулы на основе VH3 часто выбирают ввиду хорошей экспрессии и стабильности по сравнению с другими известными подклассами вариабельных доменов тяжелых цепей. GE Healthcare был разработан и коммерциализирован под торговым наименованием MabSelect SuRe™ рекомбинантный вариант белка А, который не связывает FAB-фрагменты на основе VH3.

Поскольку смолу MabSelect SuRe™ использовали в настоящем документе для оценки связывания с белком А двух описанных выше гомодимерных иммуноглобулинов против HER2, был сделан вывод, что указанная смола Mab Select SuRe™ не подходит для получения гетеродимерных иммуноглобулинов, содержащих по меньшей мере один вариабельный домен VH3, при применении техник дифференциального очищения с белком А, поскольку, хотя гомодимерные компоненты не связывались с белком А в Fc-областях, они, тем не менее, связывались с белком А за счет доменов VH3.

Для изучения замен, которые устраняют или уменьшают связывание с белком А гомодимерных иммуноглобулинов на основе VH3 или их фрагментов, необходимо провести анализ связывания с белком А для вариантов FAB на основе VH3. Хотя известно, что смолы типа Mab Select SuRe™ не связывают подкласс доменов VH3, другая коммерческая смола с белком А, известная как Mab Select™, связывает подкласс доменов VH3 (также от GE Healthcare), и она была выбрана для анализа связывания с белком А

вариантов FAB на основе VH3.

Применение смолы Mab SelectTM валидировали путем получения рекомбинантного FAB-фрагмента против HER2, происходящего из исходного описанного ранее гомодимерного иммуноглобулина против HER2, который по имеющимся данным происходит из подкласса вариабельных доменов VH3-23 (сокращенно в настоящем документе FAB против HER2; тяжелая цепь с SEQ ID NO: 5 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3), и анализа указанного фрагмента на колонках Mab SelectTM и Mab Select SuReTM (указанный FAB-фрагмент, содержащий легкую цепь на основе подкласса VK I, сначала очищали в режиме захвата-элюирования с применением хроматографии с белком L перед проведением градиентной хроматографии с белком A на колонках Mab SelectTM или Mab Select SuReTM; протокол для обеих колонок соответствовал протоколу, приведенному в разделе «Материалы и методы»). Как видно на фиг. 4C, FAB против HER2 на основе VH3 связывался исключительно с колонкой Mab SelectTM, что подтверждает отсутствие связывания смолы Mab Select SuReTM с FAB-фрагментами на основе VH3; по меньшей мере при рассмотрении мономерных FAB-фрагментов на основе VH3, это также контрастировало с результатами, наблюдавшимися ранее для гомодимерных иммуноглобулинов на основе VH3 со сконструированными областями Fc, не связывающимися с белком A. Напротив, для FAB против HER2 наблюдалось выраженное связывание с колонкой MabSelectTM, что дает возможность анализа вариантов FAB на основе VH3, не связывающихся или слабее связывающихся с белком A.

Для устранения связывания FAB-фрагментов на основе VH3 с белком A, идентифицировали критические для связывания с белком A остатки доменов VH3 в кристаллической структуре FAB-фрагмента человека в комплексе с доменом D белка A (код PDB: 1DEE; www.pdb.org; Graille M et al., (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97(10): 5399-5404). Указанный анализ использовали в качестве отправной точки для рационального дизайна, при котором природа осуществляемых замен основана на сравнении последовательностей связывающихся с белком A и не связывающихся с белком A происходящих от человека подклассов VH. На фиг. 5 показано выравнивание одной репрезентативной каркасной области для каждого подкласса вариабельных доменов тяжелых цепей человека. Положения аминокислот 15, 17, 19, 57, 59, 64, 65, 66, 68, 70, 81, 82a и 82b (нумерация по Kabat) идентифицировали как часть интерфейсов белок-белкового взаимодействия между доменом D белка A и FAB-фрагментом на основе VH3 в структуре 1DEE. Среди подклассов VH человека VH3 является единственным связывающим белок A подклассом; остатки в последовательностях аминокислот других подклассов в эквивалентных положениях выбирали в качестве источника замен для устранения или уменьшения связывания с белком A, при этом потенциально уменьшающих иммуногенность, поскольку указанные замены включали замену одного остатка на другой встречающийся в природе остаток в эквивалентном положении аминокислоты, обнаруживаемый в не связывающемся с белком A подклассе VH человека.

Мутации вводили в последовательность вышеуказанного FAB-фрагмента против HER2 с помощью стандартных техник мутагенеза на основе ПЦР; осуществляли следующие замены: G65S (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 6 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3), R66Q (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 7 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3), T68V (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 8 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3), Q81E (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 9 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3), N82aS (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 10 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3) и комбинация R19G/T57A/Y59A (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 11 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3).

Кроме того, осуществляли замену T57A (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 12 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3) и замену T57E (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 13 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3). Ранее, в WO2010075548, было показано, что T57A устраняет связывание с белком A, и было разработано T57E для введения заряженного остатка, который может нарушать взаимодействие VH3 с белком A. Мутанты FAB, содержащие легкую цепь на основе подсемейства VK I, сначала очищали в режиме захвата-элюирования с применением хроматографии с белком L, а затем анализировали связывание с белком A на колонке MabSelectTM, функционирующей в градиентном режиме согласно описанию в разделе "Материалы и методы". На фиг. 6 показано, что только T57A, T57E, G65S, Q81E, N82aS и комбинация R19G/T57A/Y59A устранили или уменьшили связывание FAB против HER2 со смолой MAbSelectTM. Замены G65S, Q81E и N82aS являются предпочтительными для устранения связывания FAB-фрагментов на основе VH3 с белком A, поскольку при указанных мутациях происходит замена остатка последовательности, эквивалентного обнаруживаемому в не связывающихся с белком A подклассах VH; таким образом, потенциально снижается иммуногенность.

Аффинность и специфичность антител по существу определяются областями CDR, однако замены в каркасных областях могут влиять на свойства антител, как это показано в случае нескольких гуманизированных антител. Для оценки возможного влияния вышеописанных замен на специфичность и/или аффинность происходящих из VH3 антител, анализировали связывание двух предпочтительных мутантов FAB с антигеном HER2 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Измерения ППР с применением рекомбинантного антигена HER2 выполняли согласно описанию в разделе "Материалы и методы". Оба предпочтительных мутанта демонстрировали связывание антигена HER2, идентичное связыванию исходной молекулы FAB (фиг. 7), что указывает на отсутствие влияния указанных замен на специфичность или аффинность. Соответственно ожидается, что указанные замены подходят для широ-

кого использования при конструировании не связывающихся с белком А происходящих из VH3 молекул антител без существенного уменьшения связывания антигена.

Две из указанных предпочтительных замен вводили в гомодимерный иммуноглобулин против HER2 и молекулу scFv-Fc против HER2, описанные ранее, и анализировали связывание вариантов на смоле MabSelect SuRe™. Получали следующие варианты: scFv против HER2 (G65S)-Fc 133 (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 14), scFv против HER2 (N82aS)-Fc 133 (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 15), FAB против HER2 (G65S)-Fc 133 (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 16 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3) и FAB против HER2 (N82aS)-Fc 133 (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 17 и легкая цепь с SEQ ID NO: 3).

На фиг. 8 приведены профили хроматографии на MabSelect SuRe™ для всех четырех мутантов. Все варианты демонстрировали уменьшение связывания с колонкой MabSelect SuRe™ практически до полного отсутствия связывания, что указывает на успешное устранение связывания с белком А за счет описанных выше замен. Что еще более важно, был сделан вывод о том, что в сочетании с техниками дифференциального очищения с белком А замены, которые устраняют или уменьшают аффинность FAB на основе VH3 в отношении белка А, позволяют получить гетеродимерные иммуноглобулины, где присутствует по меньшей мере один вариабельный домен VH3.

Пример 2. Антигенсвязывающие сайты, нацеленные на антиген CD3 человека, ассоциированные с опухолью антигены и воспалительные антигены клеточной поверхности

Антигенсвязывающие сайты антигена CD3 человека

Выбирали субъединицу CD3-эпсилон человека для запуска перенаправленного Т-клеточного киллинга за счет биспецифической стимуляции.

Гуманизированные варианты антитела ОКТ3 мыши

Связывающий антиген CD3-эпсилон человека сайт, применяемый в настоящем изобретении, происходит из антитела ОКТ3 мыши (Муромонаб-CD3, торговое наименование Ортоклон ОКТ3, продавалось Janssen-Cilag, впоследствии снято с производства; вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи мыши с SEQ ID NO: 18 и 19, соответственно). Вариабельные домены ОКТ3 мыши гуманизировали и структурировали в формате scFv и FAB-фрагментов.

Осуществляли гуманизацию, следуя способу, описанному в источнике: Jung S & Plückthun A (1997, Protein Eng, 10(8): 959-66), с получением высокостабильного гуманизированного варианта, подходящего как для FAB-, так и для scFv-формата. В указанном способе используется высокостабильная пара доменов VH/VL, обнаруживаемая в антителе Герцептин® (rhuMAbHER2, huMAB4D5-8, трастузумаб или торговое наименование Герцептин®; патентная публикация США № 5821337; вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи с SEQ ID NO: 20 и 21 соответственно) и последовательность операций способа гуманизации с фиксированными каркасными областями (Almagro JC & Fransson J (2008), Front Biosci, 13: 1619-33). Поскольку антитело Герцептин® изначально происходит из семейств высокостабильных каркасных областей VH3 и VK1 зародышевой линии человека, каркасные области зародышевой линии из указанных двух семейств в равной степени подходят для применения в качестве источника фиксированных каркасных областей. Как вариант, вместо VK1 может использоваться семейство каркасных областей легких цепей VK3 зародышевой линии человека, поскольку они также обладают хорошими характеристиками стабильности (Ewert S et al., (2003) J Mol Biol, 325: 531-553). Помимо антител мыши для улучшения стабильности с применением указанного способа фиксированных каркасных областей могут быть сконструированы антитела человека. Предпочтительно применение каркасной области IGHV3-23*04, IGKV1-39*01 и IGKV3-20*01 зародышевой линии человека, содержащей SEQ ID NO: 22, 23 и 24, соответственно (обозначения в соответствии с IMGT (международной информационной системой ImMuno-Genetics (Lefranc MP et al. (1999) Nucleic Acids Res, 27(1): 209-12; Ruiz M et al. (2000) Nucleic Acids Res, 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) Nucleic Acids Res, 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) Nucleic Acids Res, 31(1): 307-10; Lefranc MP et al., (2005) Dev Comp Immunol, 29(3): 185-203; Kaas Q et al, (2007) *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 6(4): 253-64; <http://www.imgt.org>).

С указанной целью конструировали первое гуманизированное антитело, отличающееся тем, что области CDR вариабельных доменов антитела Герцептин были замещены, соответственно, областями CDR антитела ОКТ3 мыши, и сравнивали с гибридным антителом против ОКТ3 мыши (вариабельные участки тяжелой цепи и легкой цепи с SEQ ID NO: 25 и 26, называемое в настоящем документе гибридным антителом ОКТ3).

Прототипическое антитело (вариабельные участки тяжелой цепи и легкой цепи с SEQ ID NO: 27 и 39, сокращенно VH/VL) отличается повышенными уровнями синтеза в тестах на транзиентную экспрессию и повышенную стабильность FAB согласно измерениям посредством дифференциальной сканирующей калориметрии, но не связывается с клетками HPB-ALL (согласно оценке медианной интенсивности флуоресценции в FACS-экспериментах, см. раздел "Материалы и методы"), Т-клетками положительной по CD3-эпсилон опухолевой линии человека (фиг. 9A).

На основе трехмерной модели первой прототипической пары вариабельных доменов выбирали и тестировали подгруппу обратных мутаций (из прототипа Герцептина® с привитыми CDR в последовательность мыши ОКТ3): I34M, V48I, A49G, R58N, R58Y, I69L, A71T и T73K в вариабельном домене тя-

желой цепи, и M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, R66G, F71Y и P96F в вариабельном домене легкой цепи (нумерация Kabat). Отметим, что замена R58N соответствует мутации с подстановкой из прототипа Герцептина®с привитыми CDR в OKT3 мыши, а замена R58Y соответствует замене с подстановкой из прототипа Герцептина®с привитыми CDR в IGHV3-23*04 зародышевой линии человека. Стратегия конструирования в отношении комбинации замен была основана на комплементарности разных замен в смысле их предполагаемого влияния на упаковку и/или иммуногенность областей CDR и/или вариабельных доменов.

Согласно первому подходу, все кандидатные антитела получали в форме антител IgG1 человека. Оптимальные варианты выбирали на основании уровней экспрессии, термостабильности FAB-фрагмента и способности связывать клетки HPB-ALL по оценке с применением FACS. В оптимальных гуманизированных вариантах устранил сайт связывания белка А, присутствующий в домене VH, с использованием замен G65S или N82aSa. Указанный этап конструирования требовался для дальнейшего получения безопасных переориентирующих Т-клетки антител BEAT, не содержащих гомодимеров, направленных против CD3.

Средство к связыванию восстанавливали обратные мутации в VH: I34M, A49G и A71T, наряду с обратными мутациями в VL: M4L, L46R, L47W и F71Y. Оптимальными комбинациями вариабельных доменов являлись: VH8/VL4, VH8/VL8, VH11/VL4 и VH11/VL8, поскольку они в основном сохраняли исходный уровень связывания с клетками (фиг. 9A-C). Кроме того, комбинации VH8/VL8 (вариабельные домены с SEQ ID NO: 48 и 51, соответственно) и VH11/VL8 (вариабельные домены с SEQ ID NO: 49 и 51, соответственно) отличались повышенной стабильностью FAB (+2,8°C и +1,6°C соответственно, фиг. 9D).

Наконец, оптимальные гуманизированные варианты дополнительно реструктурировали в формат гибридолов scFv-Fc и транзиентно экспрессировали. Варианты ранжировали по относительной аффинности, стабильности, уровням экспрессии при транзиентной трансфекции в указанном формате (фиг. 9E). Оптимальные комбинации вариабельных доменов в формате гибридолов scFv-Fc были аналогичны комбинациям, идентифицированным в формате антитела: VH8-VL4 (scFv-фрагмент с SEQ ID NO: 58) и VH8-VL8 (scFv-фрагмент с SEQ ID NO: 59). Оба фрагмента scFv отличались хорошей термостабильностью в формате гибридолов scFv-Fc (фиг. 9F).

Гуманизированные варианты антитела SP34 мыши

Антитело SP34 мыши впервые было описано в 1985 (Pessano S. et al., (1985) EMBO J, 4(2): 337-44). Оно продуцировалось гибридомой, полученной от мышей, иммунизированных экстрактами денатурированных белков из клеток FLPB-ALL; указанное антитело обладало специфичностью для человека и перекрестной реактивностью для яванского макака. Известны эпитопы SP34 на эпсилон-субъединице CD3 человека и яванского макака.

С применением способов и последовательности операций, описанных в указанном примере выше, конструировали гуманизированные домены VH и VL для антитела мыши SP34, содержащего домен VH с SEQ ID NO: 60 и домен VL с SEQ ID NO: 61, путем прививки CDR на каркасные области VH3-23 и VK3 зародышевой линии, соответственно. Затем может быть устранено связывание полученных вариабельных доменов на основе VH3 с белком А за счет использования замен G65S или N82aS (нумерация Kabat), в зависимости от их применения в формате антитела BEAT.

С указанной целью конструировали первое гуманизированное антитело, отличающееся тем, что области CDR в вариабельных доменах антитела человека, домене тяжелой цепи VH3 зародышевой линии и домене легкой цепи VK3 зародышевой линии, были, соответственно, заменены на области CDR антитела мыши SP34. Полученное гуманизированное антитело использовали в качестве исходной точки для дальнейшего повышения аффинности и сравнивали с гибридным антителом SP34 (тяжелая цепь и легкая цепь с SEQ ID NO: 62 и 63, соответственно, называемым в настоящем документе гибридным антителом SP34).

Прототипическое антитело (вариабельные участки тяжелой цепи и легкой цепи с SEQ ID NO: 64 и 69, сокращенно VH1/VL1) отличалось слабым связыванием с гибридным белком CD3-эпсилон человека и 1-26_Fc (по оценке с помощью ППР, см. раздел "Материалы и методы" и фиг. 10A).

На основе трехмерной модели первого прототипа пары вариабельных доменов выбирали подгруппу замен, соответствующих любым обратным мутациям между прототипом VH3/VK3 с привитыми CDR зародышевой линии человека и последовательностью мыши SP34 (замены "от человека к мыши" или "от мыши к человеку") или использовали рациональный дизайн замен аминокислот. Вносились и тестировались следующие изменения в различных комбинациях: W100eF и W100eY в вариабельном домене тяжелой цепи, и A2I, S25A, T27A, G27aA, V27cA, T28A, T29A, S30A, N31A, Y32A, E38Q, F44P, G46L, T51A, N52A, K53A, R54A, P56A, L66G, D69T, F87Y, Q89A, W91F, Y92A, S93A, N94A и Q100G в вариабельном домене легкой цепи (нумерация Kabat; см. фиг. 10A). Стратегия конструирования в отношении комбинации замен была основана на комплементарности разных замен в смысле их предполагаемого влияния на области CDR и/или упаковку и/или иммуногенность и/или действие вариабельных доменов на транзиентную экспрессию в клетках млекопитающих.

Согласно первому подходу все кандидаты получали в форме антител IgG1 человека и затем дополн-

нительно тестировали в формате гибридного белка scFv-Fc (фиг. 10В), при этом в некоторых вариантах сайт связывания белка А, присутствующий в домене VH, был устранен с использованием замены G65S. Оптимальным образом гуманизированные кандидаты выбирались на основании уровней экспрессии и способности связывать гибридные белки CD3-эпсилон человека и яванского макака и 1-26_Fc по оценке с применением ППР.

Использовали предпочтительные в отношении связывания антигенов и рекомбинантной экспрессии комбинации вариабельных доменов тяжелых цепей и легких цепей: VH1 (SEQ ID NO: 101), или VH2 (SEQ ID NO: 102), или VH3 (SEQ ID NO: 103), или VH5 (SEQ ID NO: 104), спаренные с доменами легких цепей VL21 (SEQ ID NO: 105) и VL32 (SEQ ID NO: 106).

HER2

Биспецифические антитела, перенаправляющие Т-клетки для киллинга положительных по HER2 раковых клеток, подходят для лечения разных форм рака молочной железы человека. Были описаны антитела против HER2 (Blumenthal GM et al., (2013) Clin Cancer Res, 19(18): 4911-6), и некоторые из них в настоящее время применяются в клинике или проходят клинические испытания для применения у человека (Tsang RY & Finn RS (2012) Br J Cancer, 106(1): 6-13).

Антигенсвязывающий сайт к HER2 в настоящем изобретении происходит из рекомбинантного гуманизированного антитела против HER2 Герценттина® (см. раздел 1.1) в форме FAB-фрагмента (FAB-фрагмент с тяжелой цепью SEQ ID NO: 5 и легкой цепью SEQ ID NO: 3) или scFv-фрагмента (SEQ ID NO: 107). В некоторых форматах связывание с белком А в домене VH гуманизированного антитела против HER2 4D5 (подкласс доменов VH3) устранили с использованием замены G65S (FAB-фрагмент с тяжелой цепью, содержащей SEQ ID NO: 108, и легкой цепью SEQ ID NO: 3, или scFv-фрагмент с SEQ ID NO: 109) или замены N82aS (FAB-фрагмент с тяжелой цепью, содержащей SEQ ID NO: 110 и легкой цепью SEQ ID NO: 3, или scFv-фрагмент с SEQ ID NO: 111).

CD38

CD38 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II, который в норме обнаруживается на гемопоэтических клетках и в твердых тканях. CD38 экспрессируется также при различных злокачественных гематологических заболеваниях. Биспецифические антитела, перенаправляющие Т-клетки для киллинга положительных по CD38 раковых клеток, подходят для лечения различных злокачественных гематологических заболеваний, в том числе множественной миеломы, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточного острого лимфоцитарного лейкоза, макроглобулинемии Вальденстрема, первичного системного амилоидоза, мантийноклеточной лимфомы, пролимфоцитарного/миелоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, фолликулярной лимфомы, NK-клеточного лейкоза и лейкоза плазматических клеток. Несколько антител против CD38 были описаны в качестве реагентов для исследований или кандидатных терапевтических средств (публикация РСТ № WO 2006099875). К наиболее хорошо описанным антителам против CD38 человека относятся гибридомы мыши OKT-10 и HB-7 (Hoshino S et al., (1997) J Immunol, 158(2): 741-7).

Согласно первому подходу антигенысвязывающие сайты против CD38 человека могут происходить из гибридом OKT10 мыши (вариабельные участки тяжелой цепи и легкой цепи с SEQ ID NO: 112 и 113, соответственно) или HB-7 (вариабельные участки тяжелой цепи и легкой цепи с SEQ ID NO: 114 и 115, соответственно) и их гуманизированных вариантов, которые могут быть затем получены в форме фрагментов FAB или scFv. С применением способов и последовательности операций, описанных в примере 2.1, могут быть сконструированы гуманизированные домены VH и VL для гибридомы HB-7 путем прививки CDR на каркасные области зародышевой линии VH3-23 и VK1 соответственно.

Согласно второму подходу путем так называемого метода оптимальной гуманизации, описанного в источнике: Almagro JC & Fransson J (Front Biosci, (2008) 13: 1619-33), конструировали оптимальные гуманизированные домены VH и VL для гибридомы HB-7 путем прививки CDR на каркасные области зародышевой линииIGHV4-59*03 и IGKV1-NL1*01 человека, соответственно (обозначения в соответствии с IMGT®, выше). Гуманизированные варианты VH и VL с разной степенью обратных мутаций исследовали *in silico* и один предпочтительный отобранный вариант гуманизированных VH и VL транзистенно экспрессировали в формате IgG1 человека; в настоящем документе он называется гуманизированным HB-7 с оптимальными доменами VH (SEQ ID NO: 116) и VL (SEQ ID NO: 117). Вводили следующие обратные мутации мыши (VH) S35H, I37V, I48L, V67L, V71K, T73N, F78V, Y91F и (VL): M4L, L48I, Y49S, T69K (нумерация Kabat). Гуманизированное оптимальное антитело HB-7 (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 118 и легкая цепь с SEQ ID NO: 119) окрашивало рекомбинантные клетки CHO[CD38] при FACS-анализе (данные не показаны). Гуманизированное оптимальное антитело HB-7 обладало сродством к связыванию внеклеточной области CD38, аналогичным сродству гибридного антитела HB-7 (тяжелая цепь с SEQ ID NO: 120 и легкая цепь с SEQ ID NO: 121) при анализе с применением НИР (KD составляли 3,6 и 2,5 нМ, соответственно; фиг. 11A (гибридное) и фиг. 11B (гуманизированное)). Неожиданным образом, гуманизированное оптимальное антитело HB-7 отличалось значительно повышенной (+14.6°C) стабильностью FAB-фрагмента по сравнению с гибридным антителом HB-7 по оценке на основании калориметрических

профилей ($76,4^{\circ}\text{C}$ (гибридное) и $91,0^{\circ}\text{C}$ (гуманизированное), фиг. 11F).

Согласно третьему подходу мышей иммунизировали клетками, положительными по внеклеточному домену CD38 человека, и использовали CD38 человека для получения новых кандидатных гибридом, направленных против CD38 человека. Известны способы получения гибридом; применяемые в настоящем изобретении способы были аналогичны способам, описанным в публикации РСТ № WO 2013008171. Кандидатное антитело мыши 9G7 обладало высокой аффинностью в отношении CD38 как человека, так и яванского макака (вариабельные участки тяжелой цепи и легкой цепи с SEQ ID NO: 122 и 123 соответственно). Указанное антитело мыши сначала гуманизировали в соответствии со способами, описанными в указанном примере выше. При применении метода оптимального соответствия в качестве отправной точки для процесса гуманизации выбирали каркасную область VH IGHV2-5*09 и каркасную область VK IGKV1-33*01 зародышевой линии (обозначения в соответствии с IMGT®, выше). После прививки CDR прототип первого антитела (полученный в форме изотипа IgG1 человека, тяжелая цепь SEQ ID NO: 124 и легкая цепь с SEQ ID NO: 125) демонстрировал выраженное связывание в CD38 человека, всего в 3 раза слабее связывания исходного антитела мыши по оценке с помощью ППР (гибридное антитело 9G7 с тяжелой цепью SEQ ID NO: 126 и легкой цепью с SEQ ID NO: 127; KD составляет 0,3 нМ и 1 нМ для гибридного антитела 9G7 (данные не показаны) и первого гуманизированного прототипа (данные не показаны) соответственно). Аффинность двукратно возрастала при введении обратной мутации F36Y в вариабельном домене легкой цепи антитела (нумерация Kabat) (полученное антитело в настоящем документе называется гуманизированным оптимальным антителом 9G7 с тяжелой цепью SEQ ID NO: 124 и легкой цепью с SEQ ID NO: 128; KD составляет 0,5 нМ для CD38 человека, фиг. 11C). Гуманизированное оптимальное антитело 9G7 также проявляло высокую аффинность в отношении антигена CD38 яванского макака (KD составляет 3,2 нМ, данные не показаны) и повышенную термостабильность FAB (FAB T_m согласно ДСК-изображениям) по сравнению с гибридным антителом 9G7 (94°C и $82,2^{\circ}\text{C}$ для гуманизированного оптимального антитела 9G7 и гибридного антитела 9G7, соответственно; см. фиг. 11G). Гуманизированные оптимальное антитело 9G7 содержит вариабельный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 129 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 130.

Кроме того, антитело мыши 9G7 гуманизировали с применением способа получения оптимальной каркасной части путем прививки CDR на каркасные области зародышевой линии VH3-23 и VK1. Гуманизированные варианты VH и VL с разной степенью обратных мутаций исследовали *in silico* и один предпочтительный отобранный вариант комбинации VH и VL транзиентно экспрессировали в виде антитела IgG1 человека (полученное антитело в настоящем документе называется гуманизированным антителом 9G7 с оптимальной каркасной частью с тяжелой цепью SEQ ID NO: 131 и легкой цепью с SEQ ID NO: 132). Вводили следующие обратные мутации мыши (VH) A24F, V37I, V48L, S49A, F67L, R71K, N73T, L78V и K94R, и (VL) F36Y (нумерация Kabat). Указанное антитело демонстрировало выраженное связывание с CD38 человека и яванского макака CD38 с константами аффинного связывания, аналогичными константам оптимально гуманизированного антитела 9G7 (KD составляет 0,4 нМ и 1 нМ для CD38 человека и яванского макака, соответственно; фиг. 11D). Термостабильность FAB (FAB T_m согласно ДСК-изображениям) была также в значительной степени аналогична термостабильности гуманизированного варианта 9G7 с оптимальной F36Y ($89,2^{\circ}\text{C}$, см. фиг. 11H). На фиг. 11J приведен обзор разных гуманизированных антител 9G7, описанных выше. Гуманизированное антитело 9G7 с оптимальной каркасной частью содержит вариабельный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 133 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 134.

Согласно четвертому подходу проводили скрининг фаговой библиотеки антител для получения дополнительных фрагментов scFv против CD38 человека. Разнообразие библиотеки основано на встречающихся в природе генах V человека. Для указанной библиотеки происходящих от доноров антител на основе фагового дисплея использовали амплифицированные кДНК из лимфоцитов крови, полученных от 48 доноров-людей, у 70% которых имелось аутоиммунное заболевание (васкулит, системная красная волчанка, спондилоартропатия, ревматоидный артрит и склеродермия). Конструирование библиотеки осуществляли согласно протоколу описанному в источнике: Schofield et al. (2007, Genome Biol., 8(11): R254), с общим разнообразием, составляющим $2,53 \times 10^{10}$ клонов. Фрагменты scFv, распознающие CD38 человека и/или яванского макака, выделяли из указанной донорной библиотеки на основе фагового дисплея следующим образом. Фрагменты scFv выделяли в ходе серии повторных циклов отбора с полученными рекомбинантным способом антигенами CD38 человека и/или яванского макака (см. раздел "Материалы и методы"). Известны способы скрининга библиотек антител на основе фагового дисплея (Viti F et al., (2000) Methods Enzymol, 326: 480-505). Вкратце, после инкубации с библиотекой иммобилизованный антиген, которым предварительно покрывали пластиковую пробирку для иммуноанализа (в течение ночи в ФСБ в концентрации 20 мкг/мл) или захватывали на гранулах со стрептавидином (при применении меченой биотином формы антигена антиген захватывали в концентрации 50 нМ во время процесса отбора), связанные фаги выделяли, а несвязанные фаги отмывали. Связанные фаги высвобождали согласно описанию Marks с коллегами (Marks JD et al., (1991) J Mol Biol, 222(3): 581-97) и троекратно повторяли процесс отбора. Более тысячи клонов, полученных после второго и третьего раунда пэн-

нинга, экспрессировали и анализировали посредством ELISA против антигенов CD38 человека и яванского макака. Положительные клонны подвергали ДНК-секвенированию и некоторые уникальные клонны дополнительно анализировали на способность связывать клеточные линии, экспрессирующие CD38 человека. После первого раунда пэннинга на меченом биотином варианте антигена CD38 человека, иммобилизованного на гранулах со стрептавидином, и второго раунда пэннинга на меченом биотином варианте антигена CD38 яванского макака, иммобилизованного на гранулах со стрептавидином, выбирали один предпочтительный scFv-фрагмент (клон №767), содержащий вариабельную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 135 и вариабельную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO: 136, ввиду его способности связывать CD38 как человека, так и яванского макака. При получении в форме антитела IgG1 человека клон 767 отличался значением KD, составляющим приблизительно 300 нМ для CD38 человека (фиг. 11Е) и приблизительно 1,2 мкм для CD38 яванского макака (данные не показаны) (клон 767 антитела IgG1 в настоящем документе называется антителом человека 767 с тяжелой цепью SEQ ID NO: 137 и легкой цепью с SEQ ID NO: 138). Термостабильность FAB (FAB T_m согласно ДСК-изображениям) составляла 70,2°C (фиг. 11И). Клон 767 домена VH принадлежит к подклассу доменов VH3.

OX40

Биспецифическое антитело, нацеленное на CD3 и OX40, обеспечивает нацеливание на активированные Т-лимфоциты и их истощение. При указанной комбинации активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие молекулы как CD3, так и OX40, вовлечены в процесс взаимного киллинга, приводящий к быстрому исчезновению клеток. Одновременное взаимодействие биспецифического антитела с CD3 человека и OX40 может обеспечивать эффективную элиминацию патогенных Т-клеток за непродолжительный период времени. OX40 является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR); он был впервые описан в 1987 году как гликопротеин размером 50 кДа, экспрессируемый на активированных CD4+ Т-клетках крысы (Paterson DJ et al., (1987) Mol. Immunol. 24: 1281-90). В отличие от CD28, OX40 конститутивно не экспрессируется на необученных Т-клетках; его экспрессию индуцирует стимуляция Т-клеточного рецептора (TCR). OX40 представляет собой вторичную костимулирующую молекулу, экспрессия которой начинается через 24-72 ч после активации; ее лиганд, OX40L, также не экспрессируется на покоящихся антигенпредставляющих клетках, но экспрессируется после их активации.

Антитело мыши против OX40 человека, описанное в публикации PCT № WO 2013008171 (тяжелая цепь и легкая цепь домены с SEQ ID NO: 139 и 140 соответственно) может использоваться в качестве источника антигена связывающего сайта OX40 человека. Гуманизированный вариант указанного антитела, полученный с помощью метода оптимальной гуманизации, также описан в публикации PCT № WO 2013008171 (домены тяжелых цепей и легких цепей с SEQ ID NO: 141 и 142 соответственно; оба антитела могут быть реструктурированы с получением формата BEAT).

С применением способов и последовательности операций, описанных в примере 2.1, конструировали гуманизированные домены VH и VL гибридомы против OX40 человека путем прививки CDR на каркасные области зародышевой линии VH3-23 и VK1 соответственно. В полученных вариабельных доменах на основе VH3 дополнительно устраивали связывание с белком А с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat) в зависимости от их применения в формате антитела BEAT. Исследовали только два гуманизированных домена VH и домен VL, различающиеся разной степенью обратных мутаций. Обратные мутации идентифицировали на основании выравниваний последовательностей между вариабельными доменами исходного антитела и VH3 и VK1 с привитыми CDR аналогично первому прототипическому антителу, а также подхода, описанного в примере 2.1. Указанные вариабельные домены с привитыми CDR не содержат обратных мутаций и называются в настоящем документе минимально привитыми (МИНП). Указанные последовательности затем дополнительно модифицировали с включением всех обратных мутаций, идентифицированных при предыдущем выравнивании, и получали в результате модифицированные последовательности вариабельного домена, называемые в настоящем документе максимально привитыми (МАКСП). Полученные последовательности обобщенно описаны ниже:

Область VH без обратных мутаций гуманизированного и стабилизированного антитела против OX40; сокращенно гуманизированное антитело против OX40/МИНП VH (SEQ ID NO: 278).

Область VH со всеми возможными обратными мутациями гуманизированного и стабилизированного антитела против OX40; сокращено гуманизированное антитело против OX40/МАКСП VH (SEQ ID NO: 279).

Область VL без обратных мутаций гуманизированного и стабилизированного антитела против OX40; сокращено гуманизированное антитело против OX40/МИНП VL (SEQ ID NO: 280).

Область VL со всеми возможными обратными мутациями гуманизированного и стабилизированного антитела против OX40; сокращено гуманизированное антитело против OX40/МАКСП VL (SEQ ID NO: 281).

CD20

Биспецифические антитела, перенаправляющие Т-клетки для киллинга экспрессирующих CD20 В-клеток, могут подходить для лечения разных форм злокачественных лимфом человека. Несколько антител против CD20 человека были описаны в качестве реагентов для исследований или кандидатных тера-

певтических средств. К наиболее хорошо охарактеризованным антителам против CD20 человека относятся гибридное антитело ритуксимаб и его гуманизированные варианты (гибридное антитело ритуксимаб, торговое наименование Ритуксан®, публикация РСТ № WO1994011026; домен VH мыши, соответствующий SEQ ID NO: 143 и домен VL, соответствующий SEQ ID NO ID NO: 144).

С применением способов и последовательности операций, описанных в примере 2.1, конструировали гуманизированные домены VH и VL для гибридного антитела ритуксимаб путем прививки CDR на каркасные области зародышевой линии VH3-23 и VK1, соответственно. В полученных вариабельных доменах на основе VH3 дополнительно устранили связывание с белком А с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat) в зависимости от их применения в формате антитела BEAT. Исследовали два гуманизированных домена VH и домен VL, различающиеся разной степенью обратных мутаций. Обратные мутации идентифицировали на основании выравниваний последовательностей между вариабельными доменами исходного антитела, и VH3 и VK1 с привитыми CDR аналогично первому прототипическому антителу, а также подхода, описанного в примере 2.1. Указанные вариабельные домены с привитыми CDR не содержат обратных мутаций и называются в настоящем документе минимально привитыми. Указанные последовательности затем дополнительно модифицировали с включением всех обратных мутаций, идентифицированных при предыдущем выравнивании, и получали в результате модифицированные последовательности вариабельного домена, называемые в настоящем документе максимально привитыми. Полученные последовательности обобщенно описаны ниже. Область VH гуманизированного и стабилизированного Ритуксимаба без обратных мутаций; сокращенно гуманизированный Ритуксимаб/МИНП VH (SEQ ID NO: 282). Область VH гуманизированного и стабилизированного Ритуксимаба со всеми возможными обратными мутациями; сокращено гуманизированный Ритуксимаб/МАКСП VH (SEQ ID NO: 283).

Область VL гуманизированного и стабилизированного Ритуксимаба без обратных мутаций; сокращенно гуманизированный Ритуксимаб/МИНП VL (SEQ ID NO: 284). Область VL гуманизированного и стабилизированного Ритуксимаба со всеми возможными обратными мутациями; сокращено гуманизированный Ритуксимаб/МАКСП VL (SEQ ID NO: 285).

рЭФР

Биспецифические антитела, перенаправляющие Т-клетки для киллинга положительных по рЭФР раковые клетки могут подходить для лечения разных форм раковых заболеваний человека, преимущественно раковых заболеваний поджелудочной железы человека и рака толстой кишки человека. Несколько антител против рЭФР человека были описаны в качестве реагентов для исследования или кандидатных терапевтических средств. К наиболее хорошо описанным антителам против рЭФР человека относятся гибридное антитело цетуксимаб и его гуманизированные варианты, (гибридное антитело цетуксимаб, торговое наименование Эрбитукс®, C225, IMC-C225; публикация РСТ № WO 199640210; домен VH мыши с SEQ ID NO: 145 и домен VL мыши с SEQ ID NO: 146).

С применением способов и последовательности операций, описанных в примере 2.1, конструировали гуманизированные домены VH и VL для гибридного антитела Эрбитукс® путем прививки областей CDR на каркасные области VH3-23 и VK1 зародышевой линии соответственно. В полученных вариабельных доменах на основе VH3 дополнительно устранили связывание с белком А с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat) в зависимости от их применения в формате антитела BEAT. Исследовали два гуманизированных домена VH и домен VL, различающиеся разной степенью обратных мутаций. Обратные мутации идентифицировали на основании выравниваний последовательностей между вариабельными доменами исходного антитела, и VH3 и VK1 с привитыми CDR аналогично первому прототипическому антителу, а также подхода, описанного в примере 2.1. Указанные вариабельные домены с привитыми CDR не содержат обратных мутаций и называются в настоящем документе минимально привитыми. Указанные последовательности затем дополнительно модифицировали с включением всех обратных мутаций, идентифицированных при предыдущем выравнивании, и получали в результате модифицированные последовательности вариабельного домена, называемые в настоящем документе максимально привитыми. Полученные последовательности обобщенно описаны ниже: Область VH гуманизированного и стабилизированного Эрбитукса без обратных мутаций; сокращенно гуманизированный Эрбитукс/МИНП VH (SEQ ID NO: 286). Область VH гуманизированного и стабилизированного Эрбитукса со всеми возможными обратными мутациями; сокращено гуманизированный Эрбитукс/МАКСП VH (SEQ ID NO: 287).

Область VL гуманизированного и стабилизированного Эрбитукса без обратных мутаций; сокращено гуманизированный Эрбитукс/МИНП VL (SEQ ID NO: 288). Область VL гуманизированного и стабилизированного Эрбитукса со всеми возможными обратными мутациями; сокращено гуманизированный Эрбитукс/МАКСП VL (SEQ ID NO: 289).

Другим хорошо описанным антителом против рЭФР человека является антитело человека панитумаб и его гуманизированные варианты (антитело человека панитумаб, торговое наименование Вектибикс (Vectibix®), публикация РСТ № WO2012138997; домен VH мыши с SEQ ID NO: 290 и домен VL мыши с SEQ ID NO: 291).

С применением способов и последовательности операций, описанных в примере 2.1, конструировали гуманизированные домены VH и VL для гибридного антитела Вектибикс® путем прививки CDR на каркасные области зародышевой линии VH3-23 и VK1, соответственно. В полученных вариабельных доменах на основе VH3 дополнительно устранили связывание с белком А с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat) в зависимости от их применения в формате антитела BEAT. Исследовали два гуманизированных домена VH и домен VL, различающиеся разной степенью обратных мутаций. Обратные мутации идентифицировали на основании выравниваний последовательностей между вариабельными доменами исходного антитела, и VH3 и VK1 с привитыми CDR аналогично первому прототипическому антителу, а также подхода, описанного в примере 2.1. Указанные вариабельные домены с привитыми CDR не содержат обратных мутаций и называются в настоящем документе минимально привитыми. Указанные последовательности затем дополнительно модифицировали с включением всех обратных мутаций, идентифицированных при предыдущем выравнивании, и получали в результате модифицированные последовательности вариабельного домена, называемые в настоящем документе максимально привитыми. Полученные последовательности обобщенно описаны ниже. Область VH гуманизированного и стабилизированного Вектибикса без обратных мутаций; сокращенно гуманизированный Вектибикс/МИНП VH (SEQ ID NO: 292). Область VH гуманизированного и стабилизированного Вектибикса со всеми возможными обратными мутациями; сокращено гуманизированный Вектибикс/МАКСП VH (SEQ ID NO: 293).

Область VL гуманизированного и стабилизированного Вектибикса без обратных мутаций; сокращено гуманизированный Вектибикс /МИНП VL (SEQ ID NO: 294).

Область VL гуманизированного и стабилизированного Вектибикса со всеми возможными обратными мутациями; сокращено гуманизированный Вектибикс/МАКСП VL (SEQ ID NO: 295).

CD19

Биспецифические антитела, перенаправляющие Т-клетки для киллинга экспрессирующих CD19 В-клеток, подходят для лечения разных форм рака крови и миелоидных раковых заболеваний человека. Молекула CD19 человека представляет собой структурно выраженный рецептор клеточной поверхности, экспрессируемый на поверхности В-клеток человека, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, пре-В-клеток, В-клеток на ранних стадиях развития (т.е. незрелых В-клеток), зрелых В-клеток до конечной дифференцировки в плазматические клетки и злокачественных В-клеток. CD19 экспрессируется при большинстве пре-В-клеточных острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ), неходжкинских лимфом, В-клеточных хронических лимфоцитарных лейкозов (ХЛЛ), пролимфоцитарных лейкозов, волосатоклеточном лейкозе, общих острых лимфобластных лейкозах и некоторых острых лимфобластных лейкозах с нулевым фенотипом (Nadler LM et al. (1983) J Immunol, 131: 244-250; Anderson KC et al., (1984) Blood, 63: 1424-1433; Loken MR et al. (1987) Blood, 70: 1316-1324; Uckun FM et al. (1988) Blood, 71: 13-29; Scheuermann RH & Racila E (1995) Leuk Lymphoma, 18: 385-397). Экспрессия CD19 на плазматических клетках также предполагает, что он может экспрессироваться на дифференцированных В-клеточных опухолях, таких как множественная миелома, плазмоцитомы, опухоли Вальденстрема (Grossbard ML et al. (1998) Br J Haematol, 102: 509-15; Treon SP et al. (2003) Semin Oncol, 30: 248-52).

В гуманизированных антителах против CD19 человека, описанных в публикации РСТ №WO 2010/095031, используются каркасные области вариабельных доменов VH3-23 и VK1, и они могут применяться для получения биспецифических антител согласно описанию в примере 2.1. Используется гуманизированное антитело против CD19 человека, содержащее домен VH с SEQ ID NO: 296 и домен VL с SEQ ID NO: 297, и дополнительно устранили его связывание с белком А с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat) в зависимости от применения в формате антитела BEAT.

IgE

Биспецифические антитела, перенаправляющие Т-клетки для киллинга положительных по мембраннысвязанному IgE В-клеток, могут подходить для лечения других воспалительных заболеваний, таких как астма или фиброз. Несколько антител против IgE человека были описаны в качестве реагентов для исследований или кандидатных терапевтических средств. К наиболее хорошо описанным антителам против IgE человека антител относится антитело Омализумаб (торговое наименование Ксолар (Xolair®), публикация USPTO № US 6761889, US 6329509 и US 20080003218A1; Presta LG et al., (1993) J Immunol, 151: 2623-2632; гуманизированный домен VH с SEQ ID NO: 298 и домен VL с SEQ ID NO: 299) и их варианты.

С применением способов и последовательности операций, описанных в примере 2.1, конструировали гуманизированные домены VH и VL для антитела Омализумаба путем прививки CDR на каркасные области зародышевой линии VH3-23 и VK1 соответственно. В полученных вариабельных доменах на основе VH3 дополнительно устранили связывание с белком А с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat) в зависимости от их применения в формате антитела BEAT. Исследовали два стабилизированных домена VH и домен VL, отличающиеся разной степенью обратных мутаций. Обратные мутации идентифицировали на основании выравниваний последовательностей между вариабельными доменами исходного антитела, и VH3 и VK1 с привитыми CDR аналогично первому прототипическому

антителу, а также подхода, описанного в примере 2.1. Указанные вариабельные домены с привитыми CDR не содержат обратных мутаций и называются в настоящем документе минимально привитыми. Указанные последовательности затем дополнительно модифицировали с включением всех обратных мутаций, идентифицированных при предыдущем выравнивании, и получали в результате модифицированные последовательности вариабельного домена, называемые в настоящем документе максимально привитыми. Полученные последовательности обобщенно описаны ниже:

Область VH стабилизированного Омализумаба без обратных мутаций; сокращенно стабилизированная Омализумаб/МИНП VH (SEQ ID NO: 300).

Область VH стабилизированного Омализумаба со всеми возможными обратными мутациями; сокращено стабилизированная Омализумаб/МАКСП VH (SEQ ID NO: 301).

Область VL стабилизированного Омализумаба без обратных мутаций; сокращено стабилизированная Омализумаб/МИНП VL (SEQ ID NO: 302).

Область VL стабилизированного Омализумаба со всеми возможными обратными мутациями; сокращено стабилизированная Омализумаб/МАКСП VL (SEQ ID NO: 303).

Другим примером антитела против IgE человека является антитело мыши Bsw17 (Vogel M. et al., (2004) J Mol Biol, 341(2): 477-89; домен VH мыши с SEQ ID NO: 304 и домен VL мыши с SEQ ID NO: 305).

С применением способов и последовательности операций, описанных в примере 2.1, гуманизированные домены VH и VL для гуманизированного антитела Bsw17 конструировали путем прививки CDR на каркасные области зародышевой линии VH3-23 и VK1 соответственно. В полученных вариабельных доменах на основе VH3 дополнительно устранили связывание с белком А с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat) в зависимости от их применения в формате антитела BEAT. Исследовали два стабилизированных домена VH и домен VL, различающиеся разной степенью обратных мутаций. Обратные мутации идентифицировали на основании выравниваний последовательностей между вариабельными доменами исходного антитела, и VH3 и VK1 с привитыми CDR аналогично первому прототипическому антителу, а также подхода, описанного в примере 2.1. Указанные вариабельные домены с привитыми CDR не содержат обратных мутаций и называются в настоящем документе минимально привитыми. Указанные последовательности затем дополнительно модифицировали с включением всех обратных мутаций, идентифицированных при предыдущем выравнивании, и получали в результате модифицированные последовательности вариабельного домена, называемые в настоящем документе максимально привитыми. Полученные последовательности обобщенно описаны ниже:

Область VH стабилизированного Bsw17 без обратных мутаций; сокращено стабилизированная Bsw17/МИНП VH (SEQ ID NO: 306).

Область VH стабилизированного Bsw17 со всеми возможными обратными мутациями; сокращено стабилизированная Bsw17/МАКСП VH (SEQ ID NO: 307).

Область VL стабилизированного Bsw17 без обратных мутаций; сокращено стабилизированная Bsw17/МИНП VL (SEQ ID NO: 308).

Область VL стабилизированного Bsw17 со всеми возможными обратными мутациями; сокращено стабилизированная Bsw17/МАКСП VL (SEQ ID NO: 309).

Пример 3. Получение переориентирующих Т-клетки гетеродимерных иммуноглобулинов

3.1 Технология BEAT® и встроенная система очищения

Антитела BEAT представляют собой гетеродимеры тяжелых цепей на основе уникальной концепции биомимикрии, демонстрирующие гетеродимеризацию, превосходящую обеспечиваемую технологией "выступ-во-впадину" (публикация РСТ № WO 2012131555). Платформа BEAT основана на обмене образующих интерфейс аминокислот в эквивалентных положениях трехмерной структуры между встречающимися в природе гомодимерными или гетеродимерными парами иммуноглобулиновых доменов для создания новых гетеродимеров, которые могут использоваться в качестве строительных блоков для биспецифических антител на основе Fc. Указанная технология позволяет разрабатывать биспецифические антитела на основе Fc с применением любого типа антигенсвязывающего скапфолда. Формат scFv-FAB используется в настоящем документе для дизайна биспецифических антител на основе Fc без необходимости разработки общей легкой цепи для обоих антигенсвязывающих сайтах.

Поскольку антитела BEAT представляют собой гетеродимеры тяжелых цепей, необходимо различать две разных тяжелых цепи. Их называют в настоящем документе цепями ВТА и ВТВ. Цепи ВТА и ВТВ в настоящем документе включают антигенсвязывающий сайт, шарнирную область человека IgG1, домен CH2, происходящий из изотипа IgG1 или IgG3 человека, и модифицированный домен CH3, происходящий из изотипа IgG1 или IgG3 человека. Некоторые из доменов CH3 ВТА и ВТВ были идентичны доменам, описанным в публикации РСТ № WO 2012131555, или представляли собой их модифицированные варианты. Домены CH3 ВТА и ВТВ выбирали из групп, состоящих из: (ВТА) SEQ ID NO: 147, 148, 149, 153, 154, и 155 и (ВТВ) SEQ ID NO: 150, 151, 152, 156, 157 и 158. Предпочтительные пары доменов CH3 ВТА-ВТВ выбраны из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 147 с SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 148 с SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 149 с SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 147 с SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 148c SEQ ID NO: 152. Наиболее предпочтительные пары доменов CH3 ВТА-ВТВ выбраны из групп,

пы, состоящей из: SEQ ID NO: 147 с SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 148 с SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 154 с SEQ ID NO: 150, и SEQ ID NO: 154 с SEQ ID NO: 152.

Согласно описанию выше, гетеродимеры тяжелых цепей BEAT, отличающиеся асимметричным связыванием с белком A, могут быть получены с применением исходных доменов изотипов иммуноглобулинов, не связывающихся с белком A (публикация РСТ № WO 2012131555). Отличие в количестве сайтов связывания белка A между гомодимерными и гетеродимерными компонентами, в частности, подходит для разделения указанных молекулярных компонентов посредством хроматографии с белком A. Чтобы избежать остаточного связывания, которое мешает разделению компонентов посредством хроматографии с белком A, необходимо устраниТЬ какие-либо вторичные сайты связывания белка A, которые в естественных условиях встречаются в составе вариабельных доменов тяжелой цепи человека подкласса VH3. В том случае, если антигенсвязывающие сайты происходят из семейства VH3, устранение содержащегося в них сайта связывания белка A может осуществляться с помощью замен G65S или N82aS (нумерация Kabat).

При получении биспецифического антитела согласно настоящему изобретению с применением одного антигенсвязывающего сайта, происходящего из VH3, и одного антигенсвязывающего сайта, происходящего не из VH3, происходящий из VH3 антигенсвязывающий сайт должен располагаться на тяжелой цепи, не связывающей белок A в Fc-области. Как вариант, антигенсвязывающий сайт, происходящий из VH3, может содержать замены N82aS или замены G65S, или эквивалентные им замены для устранения связывания с белком A. При получении биспецифического антитела согласно настоящему изобретению с применением пары антигенсвязывающих сайтов, происходящих из VH3, единственная возможность для устранения связывания с белком A по меньшей мере в одном из антигенсвязывающих сайтов на основе VH3 заключается в описанных выше заменах аминокислот. Предпочтительно биспецифические антитела согласно настоящему изобретению сконструированы таким образом, чтобы один из указанных двух гомодимеров не содержал сайта связывания белка A. Более предпочтительно биспецифические антитела согласно настоящему изобретению сконструированы таким образом, чтобы один гомодимер не содержал сайта связывания белка A, а другой гомодимер существенно отличался по числу сайтов связывания белка A (по меньшей мере на один сайт связывания белка A, предпочтительно на два сайта связывания белка A) от представляющего интерес гетеродимера.

Механизмы токсичности, запускаемые моноспецифическими антителами против CD3-эпсилон человека, интенсивно использовались; прямые механизмы были связаны с аффинностью, эпитопами и валентностью указанных антител, однако также были описаны непрямые механизмы токсичности. Указанные непрямые механизмы токсичности опосредованы областью Fc антител против CD3-эпсилон человека, которые взаимодействуют с экспрессирующими Fc-рецептор иммунными клетками и приводят к транзиентной активации Т-клеток и высвобождению цитокинов. Для повышения безопасности устранили связывание с Fc-рецептором нижней шарнирной области антител BEAT, нацеленных на CD3-эпсилон человека. Связывание с Fc-рецептором устранили или уменьшили с использованием замен L234A и L235A (нумерация EU; Strohl WR et al., (2009) Curr Opin Biotechnol, 20(6): 685-91); часто называемых заменами LALA.

Примеры антител BEAT, включающих по меньшей мере один домен VH3 с устраниенным связыванием с белком A

Примеры нацеленных на HER2/CD3 антител BEAT

Фрагменты, направленные против HER2 и CD3-эпсилон, могут быть получены в формате либо тяжелых цепей scFv-Fc-типа, состоящих из scFv-фрагмента, соединенного с цепью BEAT, либо в виде тяжелой цепи, состоящей из FAB-фрагмента, соединенного с цепью BEAT аналогично соединению во встречающемся в природе антителе. Для сборки функционального антигенсвязывающего сайта требуется связывание тяжелой цепи на основе FAB с когнатной легкой цепью.

В области CH2 вводили замены L234A и L235A и устранили в них остаточное связывание с белком A с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat) при необходимости. Примеры антител BEAT, нацеленных и на человека антиген FLER2 и CD3-эпсилон человека, получали следующим образом:

Первое антитело BEAT к HER2/CD3 конструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.2 для фрагментов против CD3-эпсилон человека и против HER2 человека, соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 159), включающую вариабельную область тяжелой цепи с заменой N82aS (нумерация Kabat), область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 47). Указанная тяжелая цепь включала часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывалась с белком A, однако, поскольку вариабельный домен тяжелой цепи, используемый в настоящем изобретении, происходит из подкласса доменов VH3, домен VH был мутирован так, чтобы включать замену N82aS, с устраниением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против HER2 чело-

века содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 160) включающей scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к HER2/CD3-1 (фиг. 12А, структура А).

Второе антитело BEAT к HER2/CD3 конструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.2 для фрагментов против CD3-эпсилон человека и против HER2 человека, соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против HER2 человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 161), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 3). Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 162), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ3. Указанная тяжелая цепь включала часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывалась с белком A, однако, поскольку вариабельный домен тяжелой цепи, используемый в настоящем изобретении, происходит из подкласса доменов VH3, домен VH был мутирован так, чтобы включать замену N82aS, с устраниением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к HER2/CD3-2 (фиг. 12А, структура В).

Третье антитело BEAT против HER2/CD3 конструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.2 для фрагментов против CD3-эпсилон человека и против HER2 человека, соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 163) включающей вариабельный домен тяжелой цепи с заменой G65S (нумерация Kabat), область γ1 CH1, шарнирную область γ1, область γ3 CH2 с заменами L234A и L235A (нумерация EU), и домен BEAT CH3 на основе γ3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 47). Указанная тяжелая цепь включала часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывалась с белком A, однако, поскольку вариабельный домен тяжелой цепи, используемый в настоящем изобретении, происходит из подкласса доменов VH3, домен VH был мутирован так, чтобы включать замену G65S, с устраниением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против HER2 человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 164) включающей scFv-фрагмент, область γ1 CH1, шарнирную область γ1, область γ1 CH2 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1. scFv-часть биспецифического антитела дополнительно стабилизировали с применением сконструированной дисульфидной связи между доменами тяжелой и легкой цепей в положении тяжелой цепи 44 (G44C) и в положении легкой цепи 100 (Q100C) по Kabat согласно описанию в публикации РСТ №WO 1994029350. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к FIER2/CD3-3 (фиг. 12В, структура С).

Четвертое антитело BEAT против FLER2/CD3 конструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.2 для фрагментов против CD3-эпсилон человека и против HER2 человека, соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 165), включающую вариабельный домен тяжелой цепи, область γ1 CH1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU), и домен CH3 BEAT на основе γ1, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 166). Сборка указанных тяжелой и легкой цепей включала гуманизированную версию антитела человека против CD3-эпсилон (SP34) согласно описанию в публикации РСТ № WO 2008119565. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против HER2 человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 167), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU); и домен CH3 BEAT на основе γ3. Указанная тяжелая цепь включала часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывалась с белком A, однако, поскольку вариабельный домен тяжелой цепи, используемый в настоящем изобретении, происходит из подкласса доменов VH3, домен VH был мутирован так, чтобы включать замену N82aS, с устраниением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к HER2/CD3(SP34) (фиг. 12В, структура D).

Пятое антитело BEAT против HER2/CD3 конструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.2 для фрагментов против CD3-эпсилон человека и против HER2 человека, соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 168), включающую вариабельный домен тяжелой цепи, область γ1 CH1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU), и домен CH3 BEAT на основе γ1, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 89). Указанный фрагмент биспецифического антитела включал вариабельные домены VH1/VL21 гуманизи-

рованного антитела SP34, описанного в примере 2.1. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против HER2 человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 167), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU); и домен CH3 BEAT на основе γ 3. Указанный фрагмент эквивалентен фрагменту, направленному против HER2 антитела BEAT к HER2/CD3(SP34), описанному выше (см. фиг. 12B, структура D). Тяжелая цепь включала часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывалась с белком A, однако, поскольку вариабельный домен тяжелой цепи, используемый в настоящем изобретении, происходит из подкласса доменов VH3, домен

VH был мутирован так, чтобы включать замену N82aS, с устраниением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-1) (фиг. 12C, структура E).

Антитела BEAT к HER2/CD3-1, BEAT к HER2/CD3-2, BEAT к HER2/CD3-3, BEAT к HER2/CD3(SP34), и BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-1) транзиентно экспрессировали, очищали и тестировали *in vitro* их сродством к антигенам HER2 и CD3-эпсилон, стабильность и способность к перенаправлению Т-клеточного киллинга. Выход при транзиентной экспрессии составлял от 5 до 15 мг/л культурального супернатанта для всех антител BEAT. Важно отметить, что для всех биспецифических антител наблюдался крайне низкий уровень гомодимерных примесей при получении с применением одноступной хроматографии с белком A.

Поскольку все указанные антитела BEAT были сконструированы так, чтобы оба плеча включали домен VH3, только устранение связывания с белком A по меньшей мере в одном домене VH3 обеспечивает легкое очищение представляющего интерес гетеродимера с применением одного из предпочтительных способов дифференциального очищения (см. фиг. 2E). Пример отслеживания дифференциального очищения с белком A антитела BEAT к HER2/CD3-1 показан на фиг. 13; на фиг. 14 показан капиллярный электрофорез очищенного гетеродимера. В указанном профиле могут быть идентифицированы только предельно незначительные примеси гомодимеров. Гомодимеры тяжелой цепи, в структуру которых входит FAB-часть, не обнаружены, поскольку они не связывают белок A. Гомодимеры тяжелой цепи, в структуру которых входят фрагменты scFv, обнаружены в предельно незначительных количествах (2,5%), что обеспечивает содержание гетеродимеров, составляющее 97%, после проведения одного этапа хроматографии с белком A. Антитела BEAT к HER2/CD3-2, BEAT к HER2/CD3-3, BEAT к HER2/CD3(SP34) и BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-1) очищали до аналогичных уровней гомогенности и чистоты за один этап хроматографии с белком A. Антитела BEAT к HER2/CD3-3 содержали некоторое количество связанных дисульфидными связями агрегатов гетеродимеров после хроматографии с белком A (27%); их удаляли с применением катионообменной хроматографии.

Для того, чтобы дополнительно продемонстрировать значительное влияние устраниния связывания гетеродимеров тяжелых цепей на основе VH3 с белком A на чистоту после проведения хроматографии с белком A, конструировали антитело BEAT к HER2/CD3-1 без описанной выше замены N82aS. На фиг. 15A и 15B показан ДСН-ПААГ-анализ элюирующих при хроматографии с белком A фракций для BEAT к HER2/CD3-1 и его варианта без замены N82aS, соответственно. При pH4 в элюированной фракции варианта без замены N82aS наблюдается дополнительная полоса, соответствующая гомодимерам тяжелой цепи, в структуре которых присутствует FAB-фрагмент (фиг. 15B), тогда как у варианта BEAT к HER2/CD3 с заменой N82aS она отсутствует (фиг. 15A). Поскольку тяжелая цепь, в структуре которой присутствует FAB-фрагмент, не связывается с белком A в области Fc (область Fc на основе изотипа IgG3 человека), единственный возможный вывод заключается в том, что вариабельные домены на основе VH3, обнаруживаемые в указанных гомодимерных компонентах, отвечают за связывание с белком A. Указанный результат ясно демонстрирует полезность устраниния связывания с белком A в гетеродимерах тяжелых цепей на основе VH3.

Оба антитела BEAT к HER2/CD3-1 и BEAT к HER2/CD3-2 отличались аналогичными значениями KD для антигенов HER2 и CD3-эпсилон человека. Значения KD находились в диапазоне 0,50-2 нМ для антигена HER2 человека и 1-2 мкм для антигена CD3-эпсилон человека (измерения посредством ППР с применением конструкции CD3-гамма-эпсилон-Fc человека (см. раздел "Материалы и методы"; фиг. 16A и 16B). Профили ДСК для указанных двух биспецифических антител аналогичны, в обоих случаях scFv-части, взаимодействующие с HER2 человека или CD3-эпсилон человека, сохраняли хорошие профили термостабильности с T_m в диапазоне 68°C. T_m FAB-частей в обоих антителах находились в диапазоне 82-83°C (фиг. 16C).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген HER2 человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются последовательности VH и VL гуманизированного герцептина, имеет следующую структуру: BEAT к HER2/CD3 сконструирован с применением комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.2 для антигенсвязывающих сайтов против CD3-эпсилон человека и HER2 человека соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против HER2 человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 310), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1

$\gamma 1$, шарнирную область $\gamma 1$, область CH2 $\gamma 3$ с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе $\gamma 3$, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 3). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устраниением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 $\gamma 1$, шарнирную область $\gamma 1$, область CH2 $\gamma 1$ с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе $\gamma 1$. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-2).

Анализ Т-клеточного киллинга *in vitro*

Механизм действия антител BEAT к HER2/CD3 основан на направлении цитотоксического Т-клеточного киллинга на целевые клетки за счет связывания антигена CD3 на поверхности цитотоксических Т-клеток и экспрессируемого на целевых клетках антигена HER2.

Эффективность антител BEAT к HER2/CD3-1 и BEAT к HER2/CD3-2 для перенаправления Т-клеточного киллинга измеряли с применением основанного на проточной цитометрии метода (называемого в настоящем документе методом RDL-FACS) или колориметрического метода (называемого в настоящем документе методом RDL-MTS).

Высокоэкспрессирующую FLER2 клеточную линию JIMT-1, устойчивую к Герцептину® (трастузумабу) клеточную линию карциномы молочной железы, высокоэкспрессирующую FLER2 клеточную линию BT-474, чувствительную к Герцептину® (трастузумабу) клеточную линию карциномы молочной железы, и низкоэкспрессирующую FIER2 клеточную линию аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 индивидуально культивировали в течение 48 ч в присутствии клеток МКПК человека и серийных разведений антител BEAT к HER2/CD3-1 или -2 или контрольных антител.

В указанных анализах клетки МКПК человека из донорской крови использовали в качестве источника цитотоксических Т-лимфоцитов. Во всех анализах использовали отношение эффекторных клеток к целевым, составляющее 10:1. Отрицательный контроль был представлен образцами без обработки антителом (только целевые клетки и клетки МКПК человека). Цитотоксичность определяли с применением методов RDL-FACS или RDL-MTS после инкубационного периода (см. раздел «Материалы и методы»). Результаты показали, что контрольные антитела не запускают специфическую опосредованную Т-клетками цитотоксичность. Напротив, антитела BEAT к HER2/CD3-1 и -2 индуцировали крайне выраженную дозозависимую гибель опухолевых целевых клеток. Максимальный киллинг составлял почти 100%. Оба метода регистрации давали близкие результаты. Значения EC₅₀ от донора к донору для разных методов варьировали приблизительно в 10 раз. Измеренные показатели EC₅₀ коррелировали с уровнем экспрессии антигена HER2 целевыми клеточными линиями.

Клетки BT-474 экспрессируют больше всего антигена HER2, и значения EC₅₀ для обоих антител, BEAT к HER2/CD3-1 и -2, находились в диапазоне значений от субпикомолярных до пикомолярных (0,6 и 2 пМ, соответственно, фиг. 17А). На поверхности клеток JIMT-1 присутствует маскированный антиген HER2 (Nagy P et al. (2005), Cancer Res, 65(2): 473-482) и, соответственно, наблюдается незначительное связывание с Герцептином® несмотря на высокие уровни экспрессии HER2. Неожиданным образом, значения EC₅₀ для клеток JIMT-1 обоих антител, BEAT к HER2/CD3-1 и -2, находились в пикомолярном диапазоне согласно измерениям посредством метода RDL-MTS (21 и 16 пМ, соответственно; фиг. 17В). При измерении с помощью метода RDL-FACS значение EC₅₀ для антитела BEAT к HER2/CD3-1 составляло 1,4 пМ. Низкоэкспрессирующая HER2 клеточная линия аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 была менее чувствительна, чем две предыдущие клеточные линии, в отношении обоих антител, демонстрируя субнаномолярные значения EC₅₀ (оба значения близки 0,2 нМ; фиг. 17С). При измерении с помощью метода RDL-FACS значение EC₅₀ для антитела BEAT к HER2/CD3-1 составляло 0,08 нМ. В совокупности указанные результаты показывают, что антитела BEAT к HER2/CD3-1 и -2 высокоэффективно перенаправляли Т-клеточный киллинг на различные экспрессирующие HER2 клеточные линии рака молочной железы.

Антитело BEAT к HER2/CD3(SP34) включало гуманизированную версию антитела против CD3-эпсилон человека (SP34), описанную в публикации РСТ № WO 2008119565. Способность антитела BEAT указанного формата к перенаправлению Т-клеточного киллинга на клетки HER2+ исследовали *in vitro*. При анализе киллинга использовали две разные HER2+ клеточные линии, высокоэкспрессирующую HER2 клеточную линию (NCI-N87) и низкоэкспрессирующую HER2 клеточную линию (HT-1080) (см. раздел «Материалы и методы»). На фиг. 17Д-Е показан перенаправленный Т-клеточный киллинг клеток NCI-N87 и HT-1080 антителом BEAT к HER2/CD3(SP34), соответственно. Для анализов использовали отношение эффекторных клеток к целевым клеткам, составляющее 10 к 1, и метод регистрации RDL-MTS после инкубационного периода, составлявшего 48 ч (см. раздел «Материалы и методы»). Результаты

показывают, что антитело BEAT к HER2/CD3(SP34) высокоэффективно перенаправляло Т-клеточный киллинг на HER2+ клеточные линии, со значениями EC₅₀, составляющими 0,35 и 29 пМ, при нацеливании на клетки NCI-N87 и HT-1080, соответственно.

Антитело BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-1) включало VH1/VL21 гуманизированного варианта антитела против CD3-эпсилон человека (SP34-каппа-1), описанного в примере 2.1. Способность антитела BEAT указанного формата к перенаправлению Т-клеточного киллинга на клетки HER2+ исследовали *in vitro*. При анализе киллинга использовали две разных HER2+ клеточных линии, высокоэкспрессирующую HER2 клеточную линию (NCI-N87) и низкоэкспрессирующую HER2 клеточную линию (HT-1080) (см. раздел "Материалы и методы"). На фиг. 17F-G показан перенаправленный Т-клеточный киллинг клеток NCI-N87 и HT-1080 антителом BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-1) соответственно. Для анализов использовали отношение эффекторных клеток к целевым клеткам, составляющее 10 к 1, и метод регистрации RDL-MTS после инкубационного периода, составлявшего 48 ч (см. раздел "Материалы и методы"). Результаты показывают, что антитело BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-1) высокоэффективно перенаправляло Т-клеточный киллинг на клеточные линии HER2+ с показателями EC₅₀, составляющими 0,46 и 338 пМ, при нацеливании на клетки NCI-N87 и HT-1080 соответственно.

Исследования эффективности *in vivo*

Ксенотрансплантаты JIMT-1

Эффективность антитела BEAT к HER2/CD3-1 *in vivo* исследовали с применением модели ксенотрансплантата JIMT-1/МКПК. Клетки МКПК человека из донорской крови использовали в качестве источника цитотоксических Т-лимфоцитов. Клетки JIMT-1 устойчивой к Герцептину® карциномы молочной железы смешивали в пропорции 1:1c нестимулированными клетками МКПК человека (четыре разных донора) и затем вводили подкожно мышам с иммунодефицитом (NOD/SCID). После трансплантации животные получали лечение антителом BEAT к HER2/CD3-1 внутривенно три раза в неделю на протяжении двух недель. Лечение антителом начинали через 3 ч после трансплантации и продолжали на 2, 4, 7, 9 и 11 день после трансплантации.

Для оценки роста опухоли без МКПК животным одной из пяти когорт подкожно инокулировали 5×10⁶ клеток JIMT-1 в отсутствие клеток МКПК человека, при этом животным в остальных когортах подкожно инъецировали смеси 5×10⁶ клеток JIMT-1 с 5×10⁶ нестимулированных клеток МКПК человека от здоровых доноров.

В отсутствие антитела клетки МКПК человека не демонстрировали негативного влияния на рост опухолей (фиг. 18A). Лечение антителом BEAT к HER2/CD3-1 в присутствии эффекторных клеток человека индуцировало полное подавление роста опухоли у большинства животных (18/20 опухолей, фиг. 18B-C). Через 18 дней после последнего дня проведения лечения только у 11% опухолей (2/18) начинался повторный рост. Указанные данные вполне ясно показывают высокую противоопухолевую эффективность антитела BEAT к HER2/CD3-1.

Примеры нацеленных на CD38/CD3 антител BEAT

Фрагменты, направлены против CD38 и против CD3-эпсилон, могут быть получены в формате либо тяжелых цепей scFv-Fc-типа, состоящих из scFv-фрагмента, соединенного с цепью BEAT, либо в виде тяжелой цепи, состоящей из FAB-фрагмента, соединенного с цепью BEAT аналогично соединению во встречающемся в природе антителе. Для сборки функционального антигенсвязывающего сайта требуется связывание тяжелой цепи на основе FAB с когнитной легкой цепью.

В области CH2 вводили замены L234A и L235A и при необходимости устранили в них остаточное связывание с белком A с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat). Примеры антител BEAT, нацеленных и на антиген CD38 человека, и на CD3-эпсилон человека получали следующим образом:

Первый пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD38 человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются оптимальные последовательности VH и VL гуманизированного HB7, получали следующим образом:

Антитело BEAT к CD38/CD3 конструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.3 для фрагментов, направленных против CD3-эпсилон человека и против CD38 человека, соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD38 человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 169), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1, соединенный с когнитной легкой цепью (SEQ ID NO: 119). Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 162), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ3. Указанная тяжелая цепь включала часть области Fc IgG3 человека и соответственно не связывалась с белком A, однако поскольку вариабельный домен тяжелой цепи, используемый в настоящем изобретении, происходит из каркасной области VH3, домен VH был мутирован так, чтобы включать замену N82aS, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи. Указанный фраг-

мент эквивалентен описанному выше фрагменту BEAT к HER2/CD3-2 против CD3-эпсилон (см. фиг. 12A, структура В). Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3 (фиг. 19 структура А).

Антитело BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3 транзиентно экспрессировали, очищали и тестировали *in vitro* на аффинность в отношении антигенов CD38 и CD3-эпсилон, стабильность и способность для перенаправления Т-клеточного киллинга. Значение KD составляло 3,2 нМ для антигена CD38 человека (измерение посредством ППР; фиг. 20А). Профили ДСК для указанного биспецифического антитела отражают хорошие профили термостабильности с T_m, составляющей приблизительно 68°C для scFv-части. T_m FAB-части составляла приблизительно 91°C (фиг. 20В).

CD38-экспрессирующие клеточные линии (см. раздел "Материалы и методы") использовали для оценки перенаправленного Т-клеточного киллинга в анализах, аналогичных описанному в примере 3.2.1. На фиг. 21 показан перенаправленный Т-клеточный киллинг клеток миеломы RPMI 8226 с применением антитела BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3. Отметим, что в качестве эффекторных клеток в анализе использовались очищенные Т-клетки с отношением эффекторных клеток к целевым клеткам, составляющим 10 к 1. При измерении с помощью метода RDL-FACS, EC₅₀ для антитела BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3 составляло 2,2 пМ (среднее для 2 доноров, продолжительность инкубации 48 ч).

Второй пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD38 человека, и на CD3-эпсилон человека, где использовались последовательности VH и VL клона 767 человека, получали следующим образом: антитело BEAT к CD38/CD3 конструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.3 для фрагментов, направленных против CD3-эпсилон человека и против CD38 человека, соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD38 человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 170), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235 A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 138). Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 171), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ3. Указанная тяжелая цепь включала часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывалась с белком A, однако, поскольку вариабельный домен тяжелой цепи, используемый в настоящем изобретении, происходит из каркасной области VH3, домен VH был мутирован так, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к CD38-767/CD3 (фиг. 19, структура В).

Антитело BEAT к CD38-767/CD3 транзиентно экспрессировали, очищали и тестировали *in vitro* на аффинность в отношении антигенов CD38 и CD3-эпсилон, стабильность и способность для перенаправления Т-клеточного киллинга. Экспрессирующие CD38 клеточные линии (см. раздел "Материалы и методы") использовали для оценки перенаправленного Т-клеточного киллинга в анализах, аналогичных описанному в примере 3.2.1. на фиг. 22 показан перенаправленный Т-клеточный киллинг клеток Daudi при использовании антитела BEAT к CD38-767/CD3. Отметим, что в указанном анализе использовались клетки МКПК человека в качестве эффекторных клеток с отношением эффекторных клеток к целевым клеткам, составляющим 10:1. При измерении с помощью метода RDL-FACS значение EC₅₀ для антитела BEAT к CD38-767/CD3 составляло 244 пМ (среднее для трех доноров, продолжительность инкубации 24 ч).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD38 человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются последовательности VH и VL с оптимальной каркасной частью гуманизированного 9G7, имеет следующую структуру: BEAT к CD38/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.3 для антигенсвязывающих сайтов CD3-эпсилон человека и CD38 человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD38 человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 312), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 132). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к CD38-9G7/оптимальн.

каркасн./CD3(SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD38 человека, и на CD3-эпсилон человека, где использовались последовательности VH и VL клона 767 человека, имеет следующую структуру: BEAT к CD38/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.3 для антигенсвязывающих сайтов CD3-эпсилон человека и CD38 человека, соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD38 человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 313), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 138). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311) включающей scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к CD38-767/CD3(SP34-каппа-2).

Примеры нацеленных на OX40 /CD3 антител BEAT

Фрагменты, направленные против OX40 и против CD3-эпсилон, могут быть получены либо в форме scFv-Fc-типа тяжелых цепей, состоящих из scFv-фрагмента, соединенного с цепью BEAT, либо в виде тяжелой цепи, состоящей из FAB-фрагмента, соединенного с цепью BEAT аналогично соединению во встречающемся в природе антителе. Для сборки функционального антигена связывающего сайта требуется связывание тяжелой цепи на основе FAB с когнатной легкой цепью.

В области CH2 вводили замены L234A и L235A, и, при необходимости, устранили в них остаточное связывание с белком A с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat). Примеры антител BEAT, нацеленных и на антиген OX40 человека, и на CD3-эпсилон человека, получали следующим образом:

Пример антитела BEAT к OX40/CD3 сконструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.4 для фрагментов, направленных против CD3-эпсилон человека и против OX40 человека, соответственно. Для фрагмента гетеродимерного иммуноглобулина против OX40 человека использовались вариабельные домены гуманизированного антитела против человека OX40, раскрытоого в публикации РСТ № WO 2013008171 (вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи с SEQ ID NO: 141 и 142 соответственно), и он содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 172), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU); и домен CH3 BEAT на основе γ 1, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 173). Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 162), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3. Указанная тяжелая цепь включала часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывалась с белком A, однако, поскольку вариабельный домен тяжелой цепи, используемый в настоящем изобретении, происходит из каркасной области VH3, домен VH был мутирован так, чтобы включать замену N82aS, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи. Указанный фрагмент эквивалентен описанному выше фрагменту BEAT к HER2/CD3-2 против CD3-эпсилон (см. фиг. 12А, структура В). Биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к OX40/CD3 (фиг. 23).

Способность антитела BEAT к OX40/CD3 к перенаправлению Т-клеточного киллинга на клетки OX40+ исследовали *in vitro*. При анализе киллинга использовали стабильную рекомбинантную клеточную линию CHO[OX40]. На фиг. 24 показан перенаправленный Т-клеточный киллинг стабильных рекомбинантных клеток CHO[OX40] антителом BEAT к OX40/CD3. Для анализов в качестве эффекторных клеток использовали клетки МКПК человека с отношением эффекторных клеток к целевым клеткам, составляющим 20 к 1, и метод регистрации RDL-MTS после инкубационного периода, составлявшего 48 ч (см. раздел "Материалы и методы"). Результаты показывают, что антитело BEAT к OX40/CD3 высокоэффективно перенаправляло Т-клеточный киллинг на стабильные рекомбинантные клетки CHO[OX40] с показателем EC₅₀, составляющим 0,5 нМ (среднее для трех доноров).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген OX40 человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются максимально привитые последовательности VH и VL гуманизированного антитела против OX40, имеет следующую структуру: BEAT к OX40/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигена связывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.4 для антигена связывающих сайтов CD3-эпсилон человека и OX40 человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против ОХ40 человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 314), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 315). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и соответственно не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к ОХ40/МАКСП/CD3(SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген ОХ40 человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются минимально привитые последовательности VH и VL гуманизированного антитела против ОХ40, имеет следующую структуру: BEAT к ОХ40/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.4 для антигенсвязывающих сайтов CD3-эпсилон человека и ОХ40 человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против ОХ40 человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 316), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 317). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и соответственно не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к ОХ40МИНП/CD3(SP34-каппа-2).

Примеры нацеленных на CD20 /CD3 антител BEAT

Пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD20 человека, и на CD3-эпсилон человека, где использовались последовательности VH и VL антитела мыши ритуксимаб, получали следующим образом:

BEAT к CD20/CD3 сконструированы с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.5 для фрагментов против CD3-эпсилон человека и против CD20 человека соответственно.

Пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD20 человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются максимально привитые последовательности VH и VL гуманизированного ритуксимаба, имеет следующую структуру: BEAT к CD20/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.5 для антигенсвязывающих сайтов против CD3-эпсилон человека и против CD20 человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD20 человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 318), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 319). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и соответственно не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к CD20МАКСП/CD3(SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных как на антиген CD20 человека, так и на CD3-эпсилон человека, где используются минимально привитые последовательности VH и VL гуманизированного

ритуксимаба, имеет следующую структуру: BEAT к CD20/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.5 для антигенсвязывающих сайтов CD3-эпсилон человека и CD20 человека, соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина антитела против CD20 человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 320), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU); и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 321). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к CD20МИНП/CD3(SP34-каппа-2).

Примеры нацеленных на рЭФР/CD3 антител BEAT

Фрагменты, направленные против рЭФР и против CD3, могут быть получены в формате либо тяжелых цепей scFv-Fc-типа, состоящих из scFv-фрагмента, соединенного с цепью BEAT, либо в виде тяжелой цепи, состоящей из FAB-фрагмента, соединенного с цепью BEAT аналогично соединению во встречающемся в природе антителе. Для сборки функционального антигенсвязывающего сайта требуется связывание тяжелой цепи на основе FAB с когнатной легкой цепью.

В области CH2 вводили замены L234A и L235A и, при необходимости, устраяли в них остаточное связывание с белком A с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat). Примеры антител BEAT, нацеленных и на антиген рЭФР человека, и на CD3-эпсилон человека, получали следующим образом:

Пример антител BEAT, нацеленных на антигены рЭФР человека и CD3-эпсилон человека, имеет следующую структуру: BEAT к рЭФР/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.6 для фрагментов против CD3-эпсилон человека и против рЭФР человека соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против рЭФР человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 174) на основе вариабельных доменов антитела мыши Эрбитукс (вариабельные домены тяжелой и легкой цепей мыши с SEQ ID NO: 145 и 146, соответственно), включавшую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 175). Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 171), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3. Указанная тяжелая цепь включала часть области Fc IgG3 человека и соответственно не связывалась с белком A, однако, поскольку вариабельный домен тяжелой цепи, используемый в настоящем изобретении, происходит из каркасной области VH3, домен VH был мутирован так, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи. Указанный фрагмент эквивалентен описанному выше фрагменту BEAT к CD38-767/CD3, направленному против CD3-эпсилон (см. фиг. 19, структура В). Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к рЭФР/CD3 (фиг. 25).

Антитело BEAT рЭФР/CD3 транзиентно экспрессировали, очищали и тестировали *in vitro* способность к перенаправлению Т-клеточного киллинга на рЭФР+ клеточные линии человека. При анализе киллинга использовали клеточную линию HT-29. На фиг. 26 показан перенаправленный Т-клеточный киллинг клеток HT-29 при использовании антитела BEAT рЭФР/CD3. Для анализов использовали в качестве эффекторных клеток клетки МКПК человека, с отношением эффекторных клеток к целевым клеткам, составляющим 10 к 1, и метод регистрации RDL-MTS после инкубационного периода, составлявшего 48 ч (см. раздел "Материалы и методы"). Результаты показывают, что антитело BEAT к рЭФР/CD3 высокоэффективно перенаправляло Т-клеточный киллинг на клетки HT-29 с показателем EC₅₀, составляющим 70,6 пМ (среднее для 4 доноров).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген рЭФР человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются максимально привитые последовательности VH и VL гуманизированного Эрбитукс, имеет следующую структуру:

BEAT к рЭФР/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.6 для антигенсвязывающих сайтов к CD3-эпсилон человека и к рЭФР человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против рЭФР человека содержит тяжелую цепь

BEAT (SEQ ID NO: 322), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU); и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 323). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и соответственно не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311) включающей scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT EGFRcetux-МАКСП/CD3(SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген рЭФР человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются минимально привитые последовательности VH и VL гуманизированного Эрбитукса, имеет следующую структуру:

BEAT к рЭФР/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.6 для антигенсвязывающих сайтов к CD3-эпсилон человека и к рЭФР человека соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против рЭФР человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 324), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 325). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и соответственно не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Часть гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU); и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT EGFRcetux-МИНП/CD3(SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген рЭФР человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются максимально привитые последовательности VH и VL гуманизированного Вектибикса, имеет следующую структуру: BEAT к рЭФР/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.6 для антигенсвязывающих сайтов к CD3-эпсилон человека и к рЭФР человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против рЭФР человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 326), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 327). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и соответственно не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT EGFRpan-МАКСП/CD3(SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген рЭФР человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются минимально привитые последовательности VH и VL гуманизированного Вектибикса, имеет следующую структуру: BEAT к рЭФР/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.6 для антигенсвязывающих сайтов к CD3-эпсилон человека и к рЭФР человека, соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против рЭФР человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 328), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 329). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая

цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT EGFRpani-MINPI/CD3(SP34-каппа-2).

Примеры антител BEAT к CD19/CD3

Тяжелые цепи, направленные против CD19 и против CD3, могут быть получены в формате либо тяжелых цепей scFv-Fc-типа, состоящих из scFv-фрагмента, соединенного с первой цепью BEAT, либо в виде тяжелой цепи, состоящей из FAB-фрагмента, соединенная с первой цепью BEAT аналогично соединению во встречающемся в природе антителе. Для сборки функционального антигенсвязывающего сайта требуется связывание тяжелой цепи на основе FAB с когнатной легкой цепью. В области CH2 вводили замены L234A и L235A и, при необходимости, устранили в них остаточное связывание с белком A с использованием замен G65S или N82aS (нумерация Kabat). Пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD19 человека, и на CD3-эпсилон человека, где использовались последовательности VH и VL против CD19, описанные в WO2010095031, имеет следующую структуру:

Пример антитела BEAT CD19/CD3 сконструирован с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.7 для антигенсвязывающих сайтов CD3-эпсилон человека и CD19 человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD19 человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 330), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 331). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к CD19/CD3(SP34-каппа-2).

Экспрессирующие CD19 клеточные линии, описанные в публикации РСТ №: WO2010/095031, используют для оценки перенаправленного Т-клеточного киллинга в анализах, аналогичных описанному в примере 3.2.1.

Примеры антител BEAT к IgE/CD3

Тяжелые цепи, направленные против IgE и против CD3, могут быть получены в формате либо тяжелых цепей scFv-Fc-типа, состоящих из scFv-фрагмента, соединенного с первой цепью BEAT, либо в виде тяжелой цепи, состоящей из FAB-фрагмента, соединенного с первой цепью BEAT аналогично соединению во встречающемся в природе антителе. Для сборки функционального антигенсвязывающего сайта требуется связывание тяжелой цепи на основе FAB с когнатной легкой цепью. В области CH2 вводили замены L234A и L235A и устранили в них остаточное связывание с белком A с использованием, при необходимости, замен G65S или N82aS (нумерация Kabat).

Антитела BEAT IgE/CD3 конструируют с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.8 для антигенсвязывающих сайтов CD3-эпсилон человека и IgE человека, соответственно.

Клеточные линии, экспрессирующие IgE на поверхности, описаны в публикации РСТ № WO 2010/033736 и могут применяться для оценки перенаправленного Т-клеточного киллинга в анализах, аналогичных описанному в примере 3.2.1.

Пример антител BEAT, нацеленных и на антиген IgE человека, и на CD3-эпсилон человека, где использовались максимально привитые последовательности VH и VL стабилизированные омализумаба, имеет следующую структуру:

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против IgE человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 332), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU); и домен CH3 BEAT на основе γ3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 333). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь,

используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT IgEomali-МАКСП/CD3(SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген IgE человека, и на CD3-эпсилон человека, где использовались минимально привитые последовательности VH и VL стабилизированного омализумаба, имеет следующую структуру:

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против IgE человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 334), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 335). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и соответственно не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT IgEomali-МИНП/CD3(SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген IgE человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются максимально привитые последовательности VH и VL стабилизированного Bsw17/, имеет следующую структуру:

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против IgE человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 336), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 337). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и, соответственно, не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT IgEbsw17-МАКСП/CD3(SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген IgE человека, и на CD3-эпсилон человека, где использовались минимально привитые последовательности VH и VL стабилизированного Bsw17/, имеет следующую структуру:

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против IgE человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 338), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 339). Указанная тяжелая цепь охватывает часть области Fc IgG3 человека и соответственно не связывается с белком A, однако, поскольку тяжелая цепь, используемая в настоящем изобретении, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркасных областей VH3, домен VH мутирован таким образом, чтобы включать замену G65S, с устранением таким образом каких-либо дополнительных сайтов связывания белка A в составе тяжелой цепи.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ1, шарнирную область γ1, область CH2 γ1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT IgE bsw17-МИНП/CD3(SP34-каппа-2).

Примеры антител BEAT, включающих только один домен VH3

Примеры нацеленных на CD38/CD3 антител BEAT

Пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD38 человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются оптимальные последовательности VH и VL гуманизированного HB7, получали следующим образом: BEAT к CD38/CD3 конструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих

сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.3 для фрагментов против CD3-эпсилон человека и против CD38 человека, соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD38 человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 176), включающую вариабельный домен тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 119). Указанная тяжелая цепь не связывалась с белком A, поскольку включала часть области Fc IgG3 человека и содержала вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий не из подкласса доменов VH3. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 177), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанная совокупность тяжелых и легких цепей включала гуманизированную версию антитела против CD3-эпсилон человека (SP34) согласно описанию в публикации РСТ № WO 2008119565. Указанный формат антитела BEAT в настоящем документе называется антителом BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3(SP34) (фиг. 27, структура А).

Способность антитела BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3(SP34) к перенаправлению Т-клеточного киллинга на клетки CD38+ исследовали *in vitro*. При анализе киллинга использовали клетки CD38+ В лимфобластной клеточной линии Daudi. На фиг. 28 показан перенаправленный Т-клеточный киллинг клеток Daudi антителом BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3(SP34). В качестве эфекторных клеток для анализов использовали клетки МКПК человека с отношением эфекторных клеток к целевым клеткам, составляющим 10 к 1, и метод регистрации RDL-FACS после инкубационного периода, составлявшего 24 ч (см. раздел "Материалы и методы"). Результаты показывают, что антитело BEAT к CD38-HB7(ОПТ)/CD3(SP34) высокоэффективно перенаправляло Т-клеточный киллинг против клеток линии Daudi CD38+ с показателем EC₅₀ составляющим 1,8 нМ (среднее для трех доноров).

Второй пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD38 человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются оптимальные последовательности VH и VL гуманизированного 9G7 (SEQ ID NO: 129 и 130 соответственно), получали следующим образом: BEAT к CD38/CD3 конструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.3 для фрагментов, направленных против CD3-эпсилон человека и против CD38 человека, соответственно. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD38 человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 178), включающую вариабельный домен тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 128). Указанная тяжелая цепь не связывалась с белком A, поскольку включала часть области Fc IgG3 человека и содержала вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий не из подкласса доменов VH3. Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 179), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанный фрагмент биспецифического антитела включал вариабельные домены гуманизированного антитела SP34 VH5/VL32, описанного в примере 2.1. Антитело BEAT указанного формата в настоящем документе называется антителом BEAT к CD38-9G7ОПТ/CD3(SP34-каппа-2) (фиг. 27, структура В). Значение KD для антитела CD38-9G7/9G7ОПТ/CD3(SP34-каппа-2) составляло 18 нМ для гибридного белка CD3 человека и 1-26 _{FC} (фиг. 29).

Способность антитела BEAT к CD38-9G7/ОПТ/CD3(SP34-каппа-2) для перенаправления Т-клеточного киллинга на клетки CD38+ исследовали *in vitro*. CD38+ В-клетки лимфобластной клеточной линии Daudi использовали при анализе киллинга. На фиг. 30 показан перенаправленный Т-клеточный киллинг клеток Daudi антителом BEAT к CD38-9G7/ОПТ/CD3(SP34-каппа-2). В качестве эфекторных клеток для анализов использовали клетки МКПК человека с отношением эфекторных клеток к целевым клеткам, составляющим 10 к 1, и метод регистрации RDL-FACS после инкубационного периода, составлявшего 24 ч (см. раздел "Материалы и методы"). Результаты показывают, что антитело BEAT к CD38-9G7/ОПТ/CD3(SP34-каппа-2) высокоэффективно перенаправляло Т-клеточный киллинг на CD38+ клетки линии Daudi с показателем EC₅₀, составляющим 2 нМ (среднее для трех доноров).

Примеры нацеленных на OX40/CD3 антител BEAT

Пример антител BEAT, нацеленных и на антиген OX40 человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются последовательности VH и VL гуманизированного антитела против OX40 (публикация РСТ №: WO2013008171), имеет следующую структуру: BEAT к OX40/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.4 для антигенсвязывающих сайтов CD3-эпсилон человека и OX40 человека, соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против OX40 человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 340), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU); и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 173). Указанная тяжелая цепь не связывается с белком A, поскольку охватывает часть области Fc IgG3 человека и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий не из подкласса доменов VH3.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к OX40/CD3(SP34-каппа-2).

Экспрессирующие OX40 клеточные линии человека, описанные выше, используют для оценки перенаправленного Т-клеточного киллинга в анализах, аналогичных описанному в примере 3.2.4.

Примеры нацеленных на CD20/CD3 антител BEAT

Пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD20 человека, и на CD3-эпсилон человека, где использовались последовательности VH и VL антитела мыши ритуксимаба, получали следующим образом:

BEAT к CD20/CD3 конструировали с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.5 для фрагментов, направленных против CD3-эпсилон человека и против CD20 человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD20 человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 180) на основе вариабельных доменов антитела мыши ритуксимаба (вариабельные домены тяжелых и легких цепей с SEQ ID NO: 143 и 144 соответственно), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 181). Указанная тяжелая цепь не связывалась с белком A, поскольку включала часть области Fc IgG3 человека и содержала вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий не из подкласса доменов VH3.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержал тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 177), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанный фрагмент эквивалентен описанному выше фрагменту антитела BEAT против CD3-эпсилон CD38-HB7(ОПТ)/CD3 (см. фиг. 27, структура А). Указанный scFv-фрагмент включал гуманизированную версию антитела против CD3-эпсилон человека SP34 согласно описанию в публикации РСТ №: WO2008119565 (домены VH и домен VL с SEQ ID NO: 182 и 183 соответственно).

Указанный формат антитела BEAT в настоящем документе называется антителом BEAT к CD20/CD3(SP34) (фиг. 31).

Антитело BEAT к CD20/CD3(SP34) транзиентно экспрессировали, очищали и тестировали *in vitro* способность к перенаправлению Т-клеточного киллинга на CD20+ клеточные линии человека. При анализе киллинга использовали лимфобластную клеточную линию CD38+B-клеток Daudi. На фиг. 32 показан перенаправленный Т-клеточный киллинг клеток Daudi антителом BEAT к CD20/CD3(SP34). В качестве эффекторных клеток в анализах использовали клетки МКПК человека, с отношением эффекторных клеток к целевым клеткам, составляющим 10 к 1, и метод регистрации RDL-FACS после инкубационного периода, составлявшего 24 ч (см. раздел "Материалы и методы"). Результаты показывают, что антитело BEAT к CD20/CD3(SP34) высокоэффективно перенаправляло Т-клеточный киллинг на клетки Daudi с показателем EC₅₀, составляющим 25 пМ (среднее для трех доноров).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген CD20 человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются последовательности VH и VL гибридного антитела ритуксимаб, имеет следующую структуру: BEAT к рЭФР/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.5 для антигенсвязывающих сайтов CD3-эпсилон человека и CD20 человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD20 человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 341), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 181). Указанная тяжелая цепь не связывается с белком A, поскольку охватывает часть области Fc IgG3 человека и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий не из подкласса доменов VH3.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311) включающей scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT к CD20/CD3(SP34-каппа-2).

Примеры нацеленных на рЭФР/CD3 антител BEAT

Пример антител BEAT, нацеленных и на антиген рЭФР человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются последовательности VH и VL антитела мыши Эрбитукс, имеет следующую структуру: BEAT к рЭФР/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.6 для антигенсвязывающих сайтов к CD3-эпсилон человека и к рЭФР человека, соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против рЭФР человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 342), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 175). Указанная тяжелая цепь не связывается с белком A, поскольку охватывает часть области Fc IgG3 человека и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий не из подкласса доменов VH3.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT EGFRcetux/CD3(SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных и на антиген рЭФР человека, и на CD3-эпсилон человека, где используются последовательности VH и VL антитела человека Вектибикс, имеет следующую структуру: BEAT к рЭФР/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.6 для антигенсвязывающих сайтов CD3-эпсилон человека и рЭФР человека, соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против рЭФР человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 343), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 344). Указанная тяжелая цепь не связывается с белком A, поскольку охватывает часть области Fc IgG3 человека и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий не из подкласса доменов VH3.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT EGFRpani/CD3(SP34-каппа-2).

Примеры нацеленных на IgE/CD3 антител BEAT

Пример антител BEAT, нацеленных и на антиген IgE человека, и CD3-эпсилон человека с использованием последовательностей VH и VL гуманизированного антитела омализумаб, имеет следующую структуру: BEAT IgE/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.8 для антигенсвязывающих сайтов CD3-эпсилон человека и IgE человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против IgE человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 345), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 346). Указанная тяжелая цепь не связывается с белком A, поскольку охватывает часть области Fc IgG3 человека и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий не из подкласса доменов VH3.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311) включающей scFv-фрагмент, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT IgEomali/CD3 (SP34-каппа-2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных как на антиген IgE человека, так и на CD3-эпсилон человека, где используются последовательности VH и VL антитела Bsw17 мыши, имеет следующую структуру: BEAT IgE/CD3 сконструировано с использованием комбинации антигенсвязывающих сайтов, описанных в примере 2.1 и 2.8 для антигенсвязывающих сайтов против CD3-эпсилон человека и против IgE человека соответственно.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против IgE человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 347), включающую вариабельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область γ 3 CH2 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенный с когнатной легкой цепью (SEQ ID NO: 348). Указанная тяжелая цепь не связывается с белком A, поскольку охватывает часть области Fc IgG3 человека и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, происходящий не из подкласса доменов VH3.

Фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина против CD3-эпсилон человека содержит тяжелую цепь BEAT (SEQ ID NO: 311), включающую scFv-фрагмент, области CH1 γ 1, шарнирной области γ 1, области γ 1 CH2 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в настоящем документе называется антителом BEAT IgEbsw17/CD3 (SP34-каппа-2).

Описанные экспрессирующие мембранный IgE клеточные линии применяют для оценки перенаправленного Т-клеточного киллинга в анализах, аналогичных описанным выше.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1 – Fc 133	DKTHTCPCPAPEELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFKWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPE NNYNTTPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHIE ALHNRFTQKSLSLSPKG
SEQ ID NO: 2 – тяжелая цепь FAB-Fc 133 антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTIVTSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGA LTSGVHTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHHK PSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 3 – легкая цепь антитела против HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQPKGK APKLLIYASFLYSGVPGRSGRSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYTTTPTFGQGTKVIEKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 4 – scFv- Fc 133 антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTIVTSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGA LTSGVHTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHHK PSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 5 – тяжелая цепь FAB антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTIVTSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGA LTSGVHTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHHK PSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 6 – тяжелая цепь FAB G65S антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTIVTSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGA LTSGVHTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHHK PSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 7 – тяжелая цепь FAB R66Q антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTIVTSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGA LTSGVHTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHHK PSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 8 – тяжелая цепь FAB T68V антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTIVTSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGA LTSGVHTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHHK PSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 9 – тяжелая цепь FAB Q81E антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLEM NSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTIVTSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGA LTSGVHTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHHK PSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 10 – тяжелая цепь FAB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMS

N82aS антитела против HER2	SLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 11 – тяжелая цепь FAB R19G/T57A/Y59A антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYARAADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 12 – тяжелая цепь FAB T57A антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 13 – тяжелая цепь FAB T57E антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYERYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 14 – тяжелая цепь scFv(G65S)-Fc 133 антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSGGGG SGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAKPLIYSASFYLYSTVPSRFSGSRSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQHYTPTFGQGTTKEIKRGGGGTDKTH TCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSH EDPEVQFKWYVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNT TPPMILDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNR FTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 15 – тяжелая цепь scFv(N82aS)-Fc 133 антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMS SLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSGGGG SGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAKPLIYSASFYLYSTVPSRFSGSRSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQHYTPTFGQGTTKEIKRGGGGTDKTH TCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSH EDPEVQFKWYVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNT TPPMILDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNR FTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 16 – тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTK

FAB(G65S)-Fc 133 антитела против HER2	GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALT SGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEELLGGPSVFLFPKPKD LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTP REEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESSQQPENNYNTPMQLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNIFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 17 – тяжелая цепь FAB(N82aS)-Fc 133 антитела против HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMS SLRAEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALT SGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEELLGGPSVFLFPKPKD LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTP REEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESSQQPENNYNTPMQLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNIFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 18 – вариабельный домен тяжелой цепи ОКТ3	QVQLQQSGAELARPGASV р KMСК ASGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGV р NYNQKFKDКАLTTDKSSSTAYMQ LSSLTSEDAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 19 – вариабельный домен легкой цепи ОКТ3	QIVLTQSPAIMSASPGEKV р MTCASSSVSYMNWYQQKSGTS PKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTYSLTISGMEAEDAAT YYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIN
SEQ ID NO: 20 – вариабельный домен тяжелой цепи Герцептина	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMS NSLRAEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 21 – вариабельный домен легкой цепи Герцептина	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFЛYSGVPSRFSRSQGTDFLTISSSLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKEIK
SEQ ID NO: 22 – вариабельный домен тяжелой цепи IGHV3- 23*04 зародышевой линии человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGL EWVSAISG~SGGSTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAK
SEQ ID NO: 23 – вариабельный домен легкой цепи IGKV1- 39*01 зародышевой линии человека	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYASSLQSGVPSRFSRSQGTDFLTISSSLQPEDFATYY CQQSYSTP
SEQ ID NO: 24 – вариабельный домен легкой цепи IGKV3- 20*01 зародышевой линии человека	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVY YCQQYQGSSP

SEQ ID NO: 25 – тяжелая цепь IgG1 гибридного ОКТ3	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTTDKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYZFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICVNHNKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPGPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWWYVDGVEVHNNAKTKP REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 26 – легкая цепь каппа гибридного ОКТ3 человека	QIVLTQSPAIMSASPGEKVMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTS PKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAAT YYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSTTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 27 – домен VH тяжелой цепи гуманизированного ОКТ3 с	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTIHWVRQAPG KGLEWVAYINPSRGYTRYADSVKGRTFISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYZFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICVNHNKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPGPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWWYVDGVEVHNNAKTKP REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 28 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTIHWVRQAPG KGLEWVGYINPSRGYTRYADSVKGRTFISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYZFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICVNHNKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPGPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWWYVDGVEVHNNAKTKP REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 29 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTIHWVRQAP GKGLEWVGYINPSRGYTRYADSVKGRTFISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYZFPEPVTWSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICVNHNK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPGPCAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWWYVDGVEVHNNAKT KPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 30 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTIHWVRQAPKGKLEWVGYINPSRGYTRYADSVKGRFTISTDTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDVFPEPVTWSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAKTKP EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 31 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTMHWVRQAPGKGLEWVGYINPSRGYTRYADSVKGRFTISTDTSKNTAYLQMN NSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDVFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 32 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTMHWVRQAPGKGLEWVGYINPSRGYTRYADSVKGRFTLSTDKSNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDVFPEPVTWSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 33 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTRYADSVKGRFTLSTDKSNTAYLQMN NSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDVFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 34 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTMHWVRQAPGKGLEWVGYINPSRGYTRYADSVKGRFTLSTDKSNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDVFPEPVTWSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPK

	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 35 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTYYADSVKGRFTLSTDKSNTAYLQ MNSLRaedTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 36 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTYYADSVKSRFTLSTDKSNTAYLQM NSLRaedTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 37 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTYYADSVKSRATLSTDKSNTAYLQ MNSLRaedTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 38 – гуманизированное ОКТ3, домен тяжелой цепи VH11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTYYADSVKGRFTLSTDKSNTAYLQ MSSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 39 – гуманизированное ОКТ3, домен легкой цепи VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYVAWYQQKPGKA PKLIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQWSSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
SEQ ID NO: 40 – гуманизированное ОКТ3, домен легкой цепи VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYVAWYQQKPGKA PKLIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQWSSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
SEQ ID NO: 41 – гуманизированное ОКТ3, домен легкой цепи VL2	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYVAWYQQKPGKAP KLLIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQWSSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 42 – гуманизированное ОКТ3, домен легкой цепи VL3	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYVAWYQQKPGKAP KLLIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQWSSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 43 – гуманизированное ОКТ3, домен легкой цепи VL4	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYVAWYQQKPGKAP KRWIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQWSSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 44 – гуманизированное ОКТ3, домен легкой цепи VL5	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYVAWYQQKPGKAP KRWIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQWSSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 45 – гуманизированное ОКТ3, домен легкой цепи VL6	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYVAWYQQKPGKAP KRWIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQWSSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 46 – гуманизированное ОКТ3, домен легкой цепи VL7	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYVAWYQQKPGKAP KRWIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQWSSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 47 – гуманизированное	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYVAWYQQKPGKAP KRWIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQWSSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA

OKT3, домен легкой цепи VL8	SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE C
SEQ ID NO: 48 – гуманизированное OKT3, домен VH8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTRYADSVKGRTLSTDKSNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 49 – гуманизированное OKT3, домен VH11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTRYADSVKGRTLSTDKSNTAYLQ MSSLRRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 50 – гуманизированное OKT3, домен VL4	DIQLTQSPSSLASAVGDRVTITCRASSSVSYVAWYQQKPGKAP KRWIYDTSKLYSGVPSRFSGRSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQWSSNPPTFGQGTTKVEIK
SEQ ID NO: 51 – гуманизированное OKT3, домен VL8	DIQLTQSPSSLASAVGDRVTITCRASSSVSYVAWYQQKPGKAP KRWIYDTSKLYSGVPSRFSGRSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQWSSNPPTFGQGTTKVEIK
SEQ ID NO: 52 – scFv-фрагмент OKT3 мыши – гибрид с Fc IgG1 человека	QVQLQQSGAELARPGASVCKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTRYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQ LSSLTSEDAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSY MNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTYSYL TISGMMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINGGGTDKT HTCPCCPAPELLGGPSVLFPPPKPKDTLMISRTPETCVVV HEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 53 – scFv-фрагмент VH5-VL3 гуманизированного OKT3 – гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWVGYINPSRGYTRYADSVKGRTLSTDKSNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSGGGG GSGGGGSGGGGGGGASDIQLTQSPSSLASAVGDRVTITCRAS SSVSYVAWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLYSGVPSRFSGRSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTTKVEIKGGGGT DKTHTCPCCPAPELLGGPSVLFPPPKPKDTLMISRTPETCVV DVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 54 – scFv-фрагмент VH6-VL4 гуманизированного OKT3 – гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTRYADSVKGRTLSTDKSNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSGGGG SGGGGSGGGGGGASDIQLTQSPSSLASAVGDRVTITCRASS SSVSYVAWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLYSGVPSRFSGRSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTTKVEIKGGGGTD KTHTTCPCCPAPELLGGPSVLFPPPKPKDTLMISRTPETCVV DVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQE

	NNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCVMHEALHNHYTQKSLSPGK
SEQ ID NO: 55 – scFv- фрагмент VH6-VL5 гуманизированного OKT3 – гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTMHWVRQAP GKGLWIGYINPSRGYTRYADSVKGRTFLSTDKSNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSGGGG SGGGGSGGGGGGGASDIQLTQSPSSLASVGDRVTITCRASS SVSYMWNWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGTD YTTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTTKVEIKGGGGTD KHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDFTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGPE NNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCVMHEALHNHYTQKSLSPGK
SEQ ID NO: 56 – scFv- фрагмент VH8-VL4 гуманизированного OKT3 – гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTMHWVRQAP GKGLWIGYINPSRGYTYYADSVKGRTFLSTDKSNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSGGGG GSGGGGSGGGGGGGASDIQLTQSPSSLASVGDRVTITCRAS SSVSYVAWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTTKVEIKggggtdkt htccppapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdschedpevkfnwyvdgvev hnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlingkeyckvsnkalpapietiskakgqpreg qvylppsrdeltnqvslltclvkgfypsdiavewesngqpennyktpplvdsdgsfflysklt vdksrwqgnvfcscvmhealhnhytqksllspgk
SEQ ID NO: 57 – scFv- фрагмент VH8-VL8 гуманизированного OKT3 – гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTMHWVRQAP GKGLWIGYINPSRGYTYYADSVKGRTFLSTDKSNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSGGGG GSGGGGSGGGGGGGASDIQLTQSPSSLASVGDRVTITCRAS SSVSYVAWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTTKVEIKggggtdkt htccppapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdschedpevkfnwyvdgvev hnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlingkeyckvsnkalpapietiskakgqpreg qvylppsrdeltnqvslltclvkgfypsdiavewesngqpennyktpplvdsdgsfflysklt vdksrwqgnvfcscvmhealhnhytqksllspgk
SEQ ID NO: 58 – scFv- фрагмент VH8-VL4 OKT3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTMHWVRQAP GKGLWIGYINPSRGYTYYADSVKGRTFLSTDKSNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSGGGG GSGGGGSGGGGGGGASDIQLTQSPSSLASVGDRVTITCRAS SSVSYVAWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTTKVEIK
SEQ ID NO: 59 – scFv- фрагмент VH8-VL8 гуманизированного OKT3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTMHWVRQAP GKGLWIGYINPSRGYTYYADSVKGRTFLSTDKSNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSGGGG GSGGGGSGGGGGGGASDIQLTQSPSSLASVGDRVTITCRAS SSVSYVAWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLYSGVPSRSGSRSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTTKVEIK
SEQ ID NO: 60 – домен VH антитела	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSKAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYL

мыши против CD3-эпилон человека SP34	QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSA
SEQ ID NO: 61 – домен VL антитела мыши против CD3-эпилон человека SP34	QAVVTQESALTSPGETVTLTCRSS-TGA VTTSNYANWVQEKPDLHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTED EAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 62 – тяжелая цепь IgG1 гибридного SP34	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAACASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYL QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 63 – легкая цепь гибридного SP34 (V лямбда мыши – константный домен лямбда человека)	QAVVTQESA-LTTSGETVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQEKPDLHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTED EAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLTVAAPSVFIIFPPSDEQL KSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 64 – гуманизированное SP34, домен тяжелой цепи VH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 65 – гуманизированное SP34, домен тяжелой цепи VH2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRTFTISRDDSNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 66 – гуманизированное SP34, домен тяжелой цепи VH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRTFTISRDDSNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSYFAYWGQGTLLVTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

	NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 67 – гуманизированное SP34, домен тяжелой цепи VH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRTISRDDSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 68 – гуманизированное SP34, домен тяжелой цепи VH5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 69 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL1	EAVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISSLQSEDFAVYFCQLWYSNLWVFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSPVTKSFRGEC
SEQ ID NO: 70 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL2	EAVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISSLQSEDFAVYFCALWYSNLWVFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSPVTKSFRGEC
SEQ ID NO: 71 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL3	EAVVTQS~ATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISSLQSEDFAVYFCQLWYSNLWVFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSPVTKSFRGEC
SEQ ID NO: 72 – гуманизированное	EAVVTQS~ATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISSLQSED

SP34, домен легкой цепи VL4	FAVYFCALWYSNLWVFGQQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 73 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL5	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKP GQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISSLQSEDF AVYFCALWYSNLWVFGQQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 74 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL6	EAVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKP PGQAPRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISSLQSED AVYFCALWYSNLWVFGQQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 75 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL7	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKP GQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISSLQSEDF AVYFCALWYSNLWVFGQQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 76 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL8	EAVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKP PGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSGSGDEATLTISSLQSED AVYFCALWYSNLWVFGQQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 77 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL9	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKP GQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSGSGDEATLTISSLQSEDF AVYFCALWYSNLWVFGQQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 78 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL10	EAVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKP PGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISSLQSED AVYFCALWYSNLWVFGQQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
SEQ ID NO: 79 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL11	EAVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKP PGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSGSGTEATLTISSLQSED AVYFCALWYSNLWVFGQQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 80 – гуманизированное	EAVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKP PGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGTEATLTISSLQSEDF AVYFCALWYSNLWVFGQQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL

SP34, домен легкой цепи VL12	KSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 81 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL13	EAVVTQSPATLSVSPGERATLSCRASTGA VTT SNYANWVQEKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYFCALWYSNLWVFGQGT KLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 82 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL14	EAVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGA VTT SNYANWVQEKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYFCALWYSNLWVFGQGT KLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 83 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL15	EAVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGA VTT SNYANWVQQKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYFCALWYSNLWVFGQGT KLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 84 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL16	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRASTGA VTT SNYANWVQEKP GQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYFCALWYSNLWVFGQGT KLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 85 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL17	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGA VTT SNYANWVQEKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYFCALWYSNLWVFGQGT KLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 86 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL18	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGA VTT SNYANWVQEKP GQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYFCALWYSNLWVFGGGT KLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 87 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL19	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGA VTT SNYANWVQEKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYFCALWYSNLWVFGQGT KLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 88 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL20	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGA VTT SNYANWVQQKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYFCALWYSNLWVFGQGT KLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

	DSKDSTYSLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 89 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL21	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQEKP GQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYYCALWYSNLWVFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 90 – гуманизированное SP34, домен легкой цепи VL22	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYYCALWYSNLWVFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 91 – scFv-фрагмент VH2-VL21 гуманизированного SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRTISRDDSNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSS TGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYYCALWYSNLWVFGQGTKLEIK KGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTP EVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPKG
SEQ ID NO: 92 – scFv-фрагмент VH3-VL23 гуманизированного SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRTISRDDSNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSS TGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYYCALFYSNLWVFGQGTKLEIK GGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTP EVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPKG
SEQ ID NO: 93 – scFv-фрагмент VH4-VL23 гуманизированного SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRTISRDDSNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSS TGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDFAVYYCALFYSNLWVFGQGTKLEIK GGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTP EVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPKG

SEQ ID NO: 94 – scFv-фрагмент VH5-VL23 гуманизированного SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFAYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRS STGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIGGANKRAPGVPARFS GSLSGDEATLTISSLQSEDFAVYYCALFYSNLWVFGQGTKEI KGGGGTDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPDKTLMSRTP EVTCAVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKA KGQPREPQVYTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 95 – scFv-фрагмент VH1-VL27 гуманизированного SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFAYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRS STGAVTTSAAANWVQEKPQAFRGLIGGANKRAPGVPARFS GSLSGDEATLTISSLQSEDFAVYYCALWYSNLWVFGQGTKEI KGGGGTDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPDKTLMSRTP EVTCAVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKA KGQPREPQVYTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 96 – scFv-фрагмент VH1-VL28 гуманизированного SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFAYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRS STGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIGGAAARAPGVPARFS GSLSGDEATLTISSLQSEDFAVYYCALWYSNLWVFGQGTKEI KGGGGTDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPDKTLMSRTP EVTCAVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKA KGQPREPQVYTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 97 – scFv-фрагмент гуманизированного VH1-VL29 SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFAYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRS STGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIGGANKAAAGVPARFS GSLSGDEATLTISSLQSEDFAVYYCALWYSNLWVFGQGTKEI KGGGGTDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPDKTLMSRTP EVTCAVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKA KGQPREPQVYTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 98 – scFv-фрагмент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY

гуманизированного VH1-VL30 SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	LQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRS STGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIGGANKRAPGVPARFS GSLSGDEATLTISSLQSEDFAVYYCALWAANLWVFGQGTKLE IKGGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPKG
SEQ ID NO: 99 – scFv- фрагмент гуманизированного VH1-VL31 SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRS STGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIGGANKRAPGVPARFS GSLSGDEATLTISSLQSEDFAVYYCALWYSALWVFGQGTKLE IKGGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPKG
SEQ ID NO: 100 – scFv-фрагмент гуманизированного VH5-VL32 SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRS STGAVTAAANYANWVQEKPQAFRGLIGGANKRAPGVPARFS GSLSGDEATLTISSLQSEDFAVYYCALFYSNLWVFGQGTKLEI KGGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPKG
SEQ ID NO: 101 – домен VH1 гуманизированного SP34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVT VSS
SEQ ID NO: 102 – домен VH2 гуманизированного SP34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTLYL QMNSLRaedtavyyCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVT VSS
SEQ ID NO: 103 – домен VH3 гуманизированного SP34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTLYL QMNSLRaedtavyyCVRHGNFGNSYVSYFAYWGQGTTVT VSS
SEQ ID NO: 104 – домен VH5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY

гуманизированного SP34	LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSYFAYWGQGTTVT VSS
SEQ ID NO: 105 – домен VL21 гуманизированного SP34	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSGTAVTSNYANWVQEKP GQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDF AVYYCALWYSNLWVFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 106 – домен VL32 гуманизированного SP34	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSGTAVTAANYANWVQEKP PGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGSLSGDEATLTISLQSEDF FAVYYCALFYSNLWVFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 107 – Гуманизированное антитело против HER2 4D5 – scFv-фрагмент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSGGG GSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASAVGDRVTITCRASQDVN TAWAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYLSGVPSRSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 108 – Гуманизированное антитело против HER2 4D5 – тяжелая цепь FAB-фрагмента (VH- VH1) с заменой VH:G65S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKSRTFISADTSKNTAYLQM NNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 109 – Гуманизированное антитело против HER2 4D5 – scFv-фрагмент с заменой VH:G65S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSGGG GSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASAVGDRVTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYLSGVPSRSGSRSGTDFTL ISSLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 110 – Гуманизированное антитело против HER2 4D5 – тяжелая цепь FAB-фрагмента (VH- VH1) с заменой VH:N82aS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 111 – Гуманизированное антитело против HER2 4D5 – scFv-фрагмент с заменой VH:N82aS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMS NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSGGG GSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASAVGDRVTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYLSGVPSRSGSRSGTDFTL ISSLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 112 – домен VH OKT10 мыши	QVELVESGGSLKLSCAASGFDFRSRWMNWVRQAPGKGLEWI GEINPDSSTINYTTSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMTKVRSEDTA LYYCARYGNWFPYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 113 – домен VL OKT10 мыши	DILMTQSOKIMPTSVGDRVSVTCKASQNVDTNVAWYQQKPG QSPKALIYSASYRSVGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLA EYFCQQYDSYPLTFGAGTKLDLKR

SEQ ID NO: 114 – домен VH HB-7 мыши	KVQLQESGPSLVQPSQRSLITCTVSGFSLISYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIRWRRGGSTDYNAAFMSRLSITKDNNSKSQVFFKMNS LQADDTAIYFCAKTLITTCYAMDYWGQQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 115 – домен VL HB-7 мыши	DIELTQSPSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNA PRLLISGATSLLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYY CQQYWSTPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 116 – домен VH оптимального гуманизированного HB-7	QVQLQESGPSGLVKPSETSLTCTVSGFSLISYGVHWVRQPPGK GLEWLGVIRWRRGGSTDYNAAFMSRLTISKDNNSKNQVSLKLSSV TAADTAVYFCAKTLITTCYAMDYWGQQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 117 – домен VL оптимального гуманизированного HB-7	DIQLTQSPSSLASAVGDRVTITCRASEDIYNRLAWYQQKPGKA PKLLISGATSLLETGVPSRFSGSGSGKDYTLTISSLQPEDFATYY CQQYWSTPTFGQGTTKLEIK
SEQ ID NO: 118 – тяжелая цепь оптимального гуманизированного HB-7	QVQLQESGPSGLVKPSETSLTCTVSGFSLISYGVHWVRQPPGK GLEWLGVIRWRRGGSTDYNAAFMSRLTISKDNNSKNQVSLKLSSV TAADTAVYFCAKTLITTCYAMDYWGQQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPGCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 119 – Гуманизированный HB-7 с оптимальной легкой цепью	DIQLTQSPSSLASAVGDRVTITCRASEDIYNRLAWYQQKPGKA PKLLISGATSLLETGVPSRFSGSGSGKDYTLTISSLQPEDFATYY CQQYWSTPTFGQGTTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 120 – Гибридный HB-7, тяжелая цепь IgG1	KVQLQESGPSLVQPSQRSLITCTVSGFSLISYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIRWRRGGSTDYNAAFMSRLSITKDNNSKSQVFFKMNS LQADDTAIYFCAKTLITTCYAMDYWGQQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPGCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 121 – Гибридный HB-7, легкая цепь каппа человека	DIELTQSPSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNA PRLLISGATSLLETGVPSRFSGSGSGKDYTLITSLSLQTEDVATYY CQQYWSTPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 122 – 9G7, домен VH мыши	QVTLKESGPILQPSQLSLTCFSGLSLSSTSGKGVGWIRQPSG KGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIAS VDTADATYYCARIELGRSYVMDYWGQQGTTVTVSS~
SEQ ID NO: 123 – 9G7, домен VL мыши	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSISCKASQDVITSVAWFQQKPGQ SPKLLIYSASYRYTGVPDFRTGSQSGTDFITISSVQAEDLAVY YCQQHYTIPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO: 124 – Гуманизированный 9G7, оптимальная тяжелая цепь	QVTLKESGPILVKPTQTLTCTFSGLSLSSTSGKGVGWIRQPP GKALEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTITKDTSKNQVVLT MTNMDPVDTATYYCARIELGRSYVMDYWGQQGTLTVSSAS TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPAPELLGGPSVFLFPKP KDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEK TISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAWESENQGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK~
SEQ ID NO: 125 – первый прототип легкой цепи гуманизированного оптимального 9G7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVITSVAWFQQKPGK APKLLIYSASYRYTGVPSRFSQSGSGTDFITISSLQPEDIATYY CQQHYTIPLTFGQGTTKLEIKRTVAAPSVIDFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
SEQ ID NO: 126 – Гибридный 9G7, тяжелая цепь IgG1	QVTLKESGPILQPSQLSLTCFSGLSLSSTSGKGVGWIRQPSG KGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIAS VDTADATYYCARIELGRSYVMDYWGQQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPAPELLGGPSVFLFPKP KDTLM ISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNNAK TPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEK TISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDI AVESENQGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQ QGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK~
SEQ ID NO: 127 – Гибридный 9G7, легкая цепь каппа человека	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVITSVAWFQQKPGQ SPKLLIYSASYRYTGVPDFRTGSQSGTDFITISSVQAEDLAVY YCQQHYTIPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVIDFPPSDEQLKSGTAS ASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE EC
SEQ ID NO: 128 – легкая цепь гуманизированного оптимального 9G7 (прототип легкой цепи с заменой F36Y)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVITSVAWFQQKPGK APKLLIYSASYRYTGVPSRFSQSGSGTDFITISSLQPEDIATYY CQQHYTIPLTFGQGTTKLEIKRTVAAPSVIDFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
SEQ ID NO: 129 – домен VH гуманизированного оптимального 9G7	QVTLKESGPILVKPTQTLTCTFSGLSLSSTSGKGVGWIRQPP GKALEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTITKDTSKNQVVLT MTNMDPVDTATYYCARIELGRSYVMDYWGQQGTLTVSS

SEQ ID NO: 130 – домен VL гуманизированного оптимального 9G7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICQASQDVITSVAWFQQKPGK APKLLIYSASYRYTGVPSRSGSGSTDFTFTISSLQPEDIATYY CQQHYTIPLTFGQGTLEIK
SEQ ID NO: 131 – тяжелая цепь гуманизированного 9G7 с оптимальной каркасной частью	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGSLSTSGKGKVGVWIRQA PGKGLEWLAHIW~WDDDKRYNPALKSRLTISKDTSKNTVYL QMNSLRaedTA VYYCARIELGRSYVMDYWGQGTLTVSSAS TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 132 – легкая цепь гуманизированного 9G7 с оптимальной каркасной частью	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVITSVAWFQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPSRSGSGSTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTIPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVNDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 133 – домен VH гуманизированного 9G7 с оптимальной каркасной частью	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGSLSTSGKGKVGVWIRQA PGKGLEWLAHIW~WDDDKRYNPALKSRLTISKDTSKNTVYL QMNSLRaedTA VYYCARIELGRSYVMDYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 134 – домен VL гуманизированного 9G7 с оптимальной каркасной частью	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVITSVAWFQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPSRSGSGSTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTIPLTFGQGTKEIK
SEQ ID NO: 135 – домен VH клона 767 человека	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRaedTA VYYCAREGRTGYFDYWGQGTLTVSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTVDDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 136 – домен VL клона 767 человека	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSTSNI GTNYVYWYQQLPGT APKLLIYRNDRQPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEAD YYCAAWDDDSRGVYAFGTGTKVTL
SEQ ID NO: 137 – тяжелая цепь 767 человека	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRaedTA VYYCAREGRTGYFDYWGQGTLTVSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTVDDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 138 – легкая цепь антитела 767 человека	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSTSNGTNVYVYQQLPGT APKLLIYRNDQRPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEAD YYCAAWDDSRSGVYAFGTGKVTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
SEQ ID NO: 139 – антитела мыши против человека OX40, домен VH из WO2013/008171	QVTLKESGPILQPSQLSCTCSFGFLSTSGMGVGWIRQPSG KGLEWLHIIWWDDDKYYNTALKSGLTISKDTSKNQVFLKIA SVDTTDTATYYCARIDWDGFAYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 140 – антитело мыши против OX40 человека, домен VL из WO2013/008171	QIVLTQSPAIALSASPGEKVMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSP KPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTYSLTINRVEAEDAATYY CQQWSSNPWTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 141 – домен VH гуманизированного антитела против OX40 человека из WO2013/008171	QVTLKESGPALVKPTQTLTLCFSFGFLSTSGMGVGWIRQPP GKALEWLHIIWWDDDKYYNTALKTRLTISKDTSKNQVVLTM TNMDPVDTATYYCARIDWDGFAYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 142 – домен VL гуманизированного антитела против OX40 человека из WO2013/008171	EIVLTQSPATLSPGERATLSCRASSSVSYMHWYQQKPGQAP RPWIYATSNRATGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPWTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 143 – ритуксимаб, домен VH мыши	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSA VYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTTVSA
SEQ ID NO: 144 – ритуксимаб, домен VL мыши	QIVLSQSPAIALSASPGEKVMTETCRASSSVSYIHWFQQKPGSS PKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTYSLTISRVEAEDAATY YCQQWTSNPPTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 145 – цетуксимаб, домен VH мыши	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSICTVSGFLSTNYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIVSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNS LQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVSA
SEQ ID NO: 146 – цетуксимаб, домен VL мыши	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSP RLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQ QNNNWPTTFGAGTKLELK
SEQ ID NO: 147 – BTA CH3 №1; Исходная BTA 11	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYYTTPVLDSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
SEQ ID NO: 148 – BTA CH3 №2 BTA FTO 11	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYYTTPVLDSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

SEQ ID NO: 149 – BTA CH3 №3 BTA FTO 33 411D	GQPREP AVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWE SSGPENNYTTTPMLSDGSFSLVSWLDVDSRWQQGNIFS CSVMEALHNRTQKSLSLSPGK~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
SEQ ID NO: 150 – BTB CH3 №1; Исходная BTB	GQPREP EVATFPPSRDELTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTDPPLESRGSFALSSRLRVDKSRWQQGVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
SEQ ID NO: 151 – BTB CH3 №2, BTB 401R 11	GQPREP EVATFPPSRDELTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTDPPLESRGSFALSSRLRVDKSRWQQGVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
SEQ ID NO: 152 – BTB CH3 №3 BTB 401Q 11	GQPREP EVATFPPSRDELTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTDPPLESRGSFALSSRLRVDKSRWQQGVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
SEQ ID NO: 153 – BTA CH3 №4 BTA 11_FTO_N411T	GQPREP AVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYTTTPVLDSDGSFSLVSWLTVDKSRWQQGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 154 – BTA CH3 №5 BTA 33_FTO	GQPREP AVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWE SSGPENNYTTTPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFS CSVMEALHNRTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 155 – BTA CH3 №6 BTA 33_FTO_N411T	GQPREP AVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWE SSGPENNYTTTPMLSDGSFSLVSWLTVDKSRWQQGNIFS CSVMEALHNRTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 156 – BTB CH3 №4 BTB 33_D401Q	GQPREP EVATFPPSRDELTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWES SGQPENNYNTDPPLESRGSFALSSRLRVDKSRWQQGNIFSCS VMHEALHNRTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 157 – BTB CH3 №5 BTB 11_D401Q_R411T	GQPREP EVATFPPSRDELTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTDPPLESRGSFALSSRLRVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 158 – BTB CH3 №6 BTB 33_D401Q_R411T	GQPREP EVATFPPSRDELTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWES SGQPENNYNTDPPLESRGSFALSSRLRVDKSRWQQGNIFSCS VMHEALHNRTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 159 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к HER2/CD3-1 (фрагмент к CD3-	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTYADSVKGRTLSTDKSNTAYLQ MSSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTIVTSSAST KGPSVFPLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK

эпсилон – гуманизированное OKT3 с заменой N82aS)	PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPK DTLMisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYDGVEVHNAKT KPREEQYNTRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFY PSDIAVEWESSGQPENNYTTTPMLDSDGSFSLVSWLNVDKS RWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 160 – тяжелая цепь scFv антитела BEAT к HER2/CD3-1 (фрагмент против HER2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGTLTVSSGGG GSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASAVGDRVTITCRASQDVN TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSFLYSGVPSRSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTTKEIKRGGGGTDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMisRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTISKAKGQPREPEVA TFPFSRDELTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTDPPLESQDFALSSRLVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 161 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к HER2/CD3-2 (фрагмент против HER2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGTLTVSSAST NGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGA LTSVHVTFAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPAVYTLPPSDELTKNQVKLVCLVTGFY PSDIAVEWESNGQPENNYTTTPVLDSDGSFSLVSWLNVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 162 – тяжелая цепь scFv антитела BEAT к HER2/CD3-2 (фрагмент против CD3-эпсилон – гуманизированное OKT3 с заменой N82aS)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTYADSVKGRFTLSTDKSNTAYLQ MSSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGASDQLTQSPSSLASAVGDRVTITCRAS SSVSYVAWYQQKPGKAPKRWYDTSKLYSGVPSRSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTTKEIKGGGGT DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMisRTPEVTCVV VDVSHEDEPEVQFKWYVGVEVHNAKT KPREEQYNSTFRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTISKTKGQPREP EVATFPFSREEMTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQE NNYNTDPPLESQDFALSSRLVDKSRWQQGNIFSCSVMHE ALHNRTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 163 – антитело BEAT к HER2/CD3-3, тяжелая цепь FAB(фрагмент против CD3-эпсилон – гуманизированное OKT3 с заменой G65S)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTYADSVKSRFTLSTDKSNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALT SGVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVGVEVHNAKT KPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKTKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPS

	DIAVEWESSGQPENNYYTPPMULDSDGSFLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 164 – тяжелая цепь scFv антитела BEAT к HER2/CD3-3 (фрагмент против HER2 с дополнительной дисульфидной связью)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KCLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRWRGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGG SGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLIIYSASFYSGVPSRSGRSQDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIKGGGGTDKTH CPPCPAPEAAGGPSVFLPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPEVAT FPPSRDELTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TDPLLESQGSFALSSRLRVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 165 – тяжелая цепь антитела FAB BEAT к HER2/CD3(SP34) (CD3-эпсилон- фрагмент – VH гуманизированного SP34 из WO2008/119565)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAY LQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPAVYTLPPSRDELTKNQVKLVC LVTGFYPSDIAVEWESNGQPENNYYTPPVLDSDGSFLVSW LNVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 166 – легкая цепь FAB антитела BEAT к HER2/CD3(SP34) (фрагмент к CD3- эпсилон – VL гуманизированного SP34 из WO2008/119565)	QTVVTQEPLTVSPGGTVTLCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKP GQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 167 – тяжелая цепь scFv антитела BEAT к HER2/CD3(SP34) (фрагмент к HER2 с заменой N82aS)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMS SLRAEDTAVYYCSRWRGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGG SGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLIIYSASFYSGVPSRSGRSQDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGGTDKHT CPPCPAPEAAGGPSVFLPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKTKGQPREPEVATF PPSREEMTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNT DPLLESQGSFALSSRLRVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNR FTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 168 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к HER2/CD3(SP34)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSNTLY LQMNLSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS

каппа-1) (фрагмент к CD3-эпилон – VH1 гуманизированного SP34)	WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNTVKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRAVYTLPPSRDELTKNQVKLVCLVTGFPSDLVTGFYPSDIAVEWESNGQPENNYYTTPPVLDSDGSFSLVSWLNVDKSRWLNVDKSRWQQGNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 169 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к CD38-HB7(OIT)/CD3 (фрагмент к CD38 – гуманизированное оптимальное HB-7)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFLSISYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWRGGSTDYNAAFMSRLTISKDNKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCAKTLITGYAMDYWQGQTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRAVYTLPPSRDELTKNQVKLVCLVTGFPSDIAVEWESNGQPENNYYTTPPVLDSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 170 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к CD38-767/CD3 (фрагмент к CD38 – клон 767человека)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFLSISYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWRGGSTDYNAAFMSRLTISKDNKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCAKTLITGYAMDYWQGQTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKTKGQPRAVYTLPPSRREEMTKNQVKLVCLVTGFPSDIAVEWESSGQPENNYYTTPPMLSDSGFSLSVSWLNVDKSRWQQGNFSCSVMHEALHNRTFTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 171 – тяжелая цепь scFv антитела BEAT к CD38-767/CD3 (фрагмент к CD3-эпилон – гуманизированное ОКТ3 с заменой G65S)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLNKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAWYGQGTLTVVSSGGGGSGGGGSGGGSQTVTQEPLSTVSPGGTVTLCGSSTGAUTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGLLLGGKAALTLSGVQFPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGGTDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRAVYTLPPSRDELTKNQVTLVCLVTGFPSDIAVEWESNGQPENNYKTDPPPLLESQGSFALSSRLVDKSRWQQGNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 172 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к OX40/CD3 (фрагмент против OX40 с доменом VH гуманизированного антитела против	QVTLKESGPALVKPTQTLTLCFSGFLSSTSGMGVGWIRQPPGKALEWIAHLWWDDDKYYNTALKTRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVTATYYCARIDWDGFAYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRAVYTLPPSRDELTKNQVKLVCLVTGFPSDIAVEWESNGQPENNYKTDPPPLLESQGSFALSSRLVDKSRWQQGNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

человека ОХ40 из WO2013/008171)	IAVEWESNGQPENNYYTPPVLDSDGSFLVSWLNVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 173 – легкая цепь FAB антитела BEAT к ОХ40/CD3 (ОХ40 фрагмент с доменом VL гуманизированного антитела против человека ОХ40 из WO2013/008171)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWYQQKPGQAP RPWIYATSNRATGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGE
SEQ ID NO: 174 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к рЭФР/CD3 (фрагмент против рЭФР с доменом VH антитела мыши Эрбитукс)	QVQLKQSGPGLVQPSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIVSGGNTDYNTPTSRSLINKDNKSQLVFFKMNS LQSNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVSAASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYLFPPEPVTSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTOTYICNVNHNKPNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPFVKNWYVVGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPAVYTLPPSRDELTKNQVKLVCLVTGFYPSD IAVEWESNGQPENNYYTPPVLDSDGSFLVSWLNVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 175 – легкая цепь FAB антитела BEAT к рЭФР/CD3 (фрагмент против рЭФР с доменом VL антитела мыши Эрбитукс)	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWHYQQRTNGSP RLLIKYASESISGIPSRSFSGSGSGTDFTLISNSVESEDIAHYYCQ QNNNWPTTGFAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGE
SEQ ID NO: 176 – BEAT к CD38-HB7(OPT)/CD3(SP34) антитело тяжелая цепь FAB (фрагмент к CD38 – гуманизированное оптимальное HB-7)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLISYGVHWVRQPPGK GLEWLGVIVRGGSTDYNAAFMSRLTISKDNKSQLVFLKSSV TAADTAVYFCAKTLITTYGAMYDWGQGTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYLFPPEPVTSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTOTYICNVNHNKPNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPFVQFKWYVVGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKTKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPS DIAVEWESSIONYTTPPMLSDGSFLVSWLNVDKSRW WQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 177 – тяжелая цепь scFv антитела BEAT CD38-HB7(OPT)/CD3(SP34) (фрагмент к CD3 – домены VH/VL гуманизированного SP34 из WO2008/119565)	EVQLVESGGGLVQPGSLSKLSKAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAY LQMNLNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGKLT STGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKLAPGTPARFSG SLLGGKAALTSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL VLGGGGGGTDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPFVKNWYVVGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPEVATFPPSRDELTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVE

	WESNGQPENNYKTDPPLLESQGSFALSSRLRVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 178 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к CD38- 9G7(ОПТ)/CD3(SP34) (фрагмент к CD38 – VH гуманизированного оптимального 9G7)	QVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGLSLSTSGKGVGWIRQPP GKALEWLHIIWWDDDKRYNPALKSRLTTIKDTSKNQVVL MTNMDPVTATYYCARIELGRSYVMDYWGQGTDTVSSAS TKGSPVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGSPVFLFPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTIKTKQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGF YPSDIAVEWESSGQPENNYYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDK SRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 179 – тяжелая цепь scFv антитело BEAT к CD38- 9G7(ОПТ)/CD3(SP34- каппа-2) (фрагмент к CD3 – VH5/VL32 гуманизированного SP34)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYIATYYADSVKGRFTISRDDSKNLY LQMNSLRRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVT VSSGGGGGGGGGGGGSEIVVTQSPATLSPGERATLSCRS STGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIGGANKRAPGVPARFS GSLSGDXATLTSSLQSEDFAVYYCALWYSNLWVFGQGTKE IKGGGGTDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPKPDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVFKFWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISK AKGQPREPEVATFPPSRDELTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTDPPLLESQGSFALSSRLRVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 180 – антитело BEAT к CD20/CD3, тяжелая цепь FAB	QVQLQQPGAEVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQFKKGATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGSPVFLFPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTIKTKQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGF YPSDIAVEWESSGQPENNYYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDK SRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 181 – антитело BEAT к CD20/CD3, легкая цепь FAB	QIVLSQSPAIALSASPGEKVTMETTCRASSSVSYIHWFQQKPGSS PKPWIYATSNLASGPVPRSGSGSGTTSYLTISRVEAEDAATY YCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 182 – домен VH гуманизированного SP34 из WO2008/119565	QVQLQQPGAEVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQFKKGATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSA

SEQ ID NO: 183 – домен VL гуманизированного SP34 из WO2008/119565	QVQLQQPGAEVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA
SEQ ID NO: 184 – внеклеточная область CD3-гамма человека	QSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIC FLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSPLQVYYRM CQNCIELNAATIS
SEQ ID NO: 185 – внеклеточная область CD3-эпсилон человека	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKN IGGDDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDA NFYLYLRARVCENCMEMD
SEQ ID NO: 186 – пептидный линкер длиной 26 остатков	GSADDAAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGS
SEQ ID NO: 187 – гибридный белок CD3 гамма-эпсилон человека-Fc	QSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIC FLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSPLQVYYRM GSADDAAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGSDQDGNEEMGGITQTP YKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDDKNIGSD EDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGG GGTDKHTCPPCAPEELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFCSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 188 – последовательность аминокислот гибрида CD3-эпсилон человека /1-26	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVIL
SEQ ID NO: 189 – последовательность аминокислот CD3- эпсилон яванского макака/1-26	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVIL
SEQ ID NO: 190 – гибрид CD3-эпсилон человека/1-26 Fc	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILGGGGTDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFCSCVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
SEQ ID NO: 191 – гибрид CD3-эпсилон яванского макака 1-26 Fc	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILGGGGTDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFCSCVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 192 – внеклеточная область CD38 человека, соединенная с полигистидиновой меткой – последовательность аминокислот	VPRWRQQWSPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPREMHRVDCQ SVWDAFKGAFISKHPCNITEEEDYQPLMKGTVPCNKILLW SRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTWC GefNTSK INYQSCPDRWKDCSNNPVSFWKTVSRRFAEAACDVVHVML NGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLLQPEKVQTLEAWVIHGGREDS RDLCQDPTIKELESIISKRNIFCCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSS CTSEIHHHHHH
SEQ ID NO: 193 – внеклеточная область CD38 яванского макака, соединенная с полигистидиновой меткой – последовательность аминокислот	VPRWRQQWSPGTTSRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQ SVWDAFKGAFISKYPCNITEEEDYQPLVKGTVPCNKILLW SRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMILLGYLADDLTWC GefNTF EINYQSCPDRWKDCSNNPVSFWKTVSRRFAETACGVVHVM LNGRSRKIFDKNSTFGSVEVHNLLQPEKVQALEAWVIHGGRED SRDLCQDPTIKELESIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKNPEDS SCLSGIHIIHHHH
SEQ ID NO: 194 – CDR H1 антитела мыши OKT3 против CD3-эпсилон человека	GYTFTRYT
SEQ ID NO: 195 – CDR H2 антитела мыши OKT3 против CD3-эпсилон человека	INPSRGYT
SEQ ID NO: 196 – CDR H3 антитела мыши OKT3 против CD3-эпсилон человека	ARYYDDHYCLDY
SEQ ID NO: 197 – CDR L1 антитела мыши OKT3 против CD3-эпсилон человека	SSVSY
SEQ ID NO: 198 – CDR L2 антитела мыши OKT3 против CD3-эпсилон человека	DTS
SEQ ID NO: 199 – CDR L3 антитела мыши против CD3-эпсилон человека OKT3	QQWSSNPPT
SEQ ID NO: 200 – CDR H1 антитела мыши SP34 против CD3-эпсилон человека	GFTFNTYA
SEQ ID NO: 201 – CDR H2 антитела мыши SP34 против CD3-эпсилон человека	IRSKYNNYAT

SEQ ID NO: 202 – CDR H3 антитела мыши SP34 против CD3- эпсилон человека	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 203 – CDR L1 антитела мыши SP34 против CD3- эпсилон человека	TGAVTTSNY
SEQ ID NO: 204 – CDR L2 антитела мыши SP34 против CD3- эпсилон человека	GTN
SEQ ID NO: 205 – CDR L3 антитела мыши SP34 против CD3- эпсилон человека	ALWYSNLWV
SEQ ID NO: 206 – Герцептин (трастузумаб), CDR H1	GFNIKDTY
SEQ ID NO: 207 – Герцептин (трастузумаб), CDR H2	IYPTNGYT
SEQ ID NO: 208 – Герцептин (трастузумаб), CDR H3	SRWGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 209 – Герцептин (трастузумаб), CDR L1	QDVNTA
SEQ ID NO: 210 – Герцептин (трастузумаб), CDR L2	SAS
SEQ ID NO: 211 – Герцептин (трастузумаб), CDR L3	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 212 – CDR H1 антитела мыши против CD38 человека HB-7	GFSLISYG
SEQ ID NO: 213 – CDR H2 антитела мыши против CD38 человека HB-7	IWRGGST
SEQ ID NO: 214 – CDR H3 антитела мыши против CD38 человека HB-7	AKTLITTGYAMDY
SEQ ID NO: 215 – CDR L1 антитела мыши	EDIYNR

против CD38 человека HB-7	
SEQ ID NO: 216 – антитела мыши против CD38 человека HB-7 CDR L2	GAT
SEQ ID NO: 217 – CDR L3 антитела мыши против CD38 человека HB-7	QQYWSTPT
SEQ ID NO: 218 – CDR H1 антитела мыши ОКТ10 против CD38 человека	GFDFSRSW
SEQ ID NO: 219 – CDR H2 антитела мыши ОКТ10 против CD38 человека	INPDSSTI
SEQ ID NO: 220 – CDR H3 антитела мыши ОКТ10 против CD38 человека	ARYGNWFPY
SEQ ID NO: 221 – CDR L1 антитела мыши ОКТ10 против CD38 человека	QNVDTN
SEQ ID NO: 222 – CDR L2 антитела мыши ОКТ10 против CD38 человека	SAS
SEQ ID NO: 223 – CDR L3 антитела мыши ОКТ10 против CD38 человека	QQYDSYPLTFGAGTK
SEQ ID NO: 224 – CDR H1 антитела мыши против CD38 человека 9G7	GLSLSTSGKG
SEQ ID NO: 225 – CDR H2 антитела мыши против CD38 человека 9G7	IWWDDDK
SEQ ID NO: 226 – CDR H3 антитела мыши против CD38 человека 9G7	ARIELGRSYVMDY
SEQ ID NO: 227 – CDR L1 антитела мыши	QDVITS

против CD38 человека 9G7	
SEQ ID NO: 228 – CDR L2 антитела мыши против CD38 человека 9G7	SAS
SEQ ID NO: 229 – CDR L3 антитела мыши против CD38 человека 9G7	QQHYTIPLT
SEQ ID NO: 230 – антитело человека 767 против CD38 человека, CDR H1	GFTFSSYW
SEQ ID NO: 231 – антитело 767 человека против CD38 человека, CDR H2	IKQDGSEK
SEQ ID NO: 232 – антитело 767 человека против CD38 человека, CDR H3	AREGRTGYFDY
SEQ ID NO: 233 – антитело 767 человека против CD38 человека, CDR L1	TSNIGTNY
SEQ ID NO: 234 – CDR L2 антитела человека против CD38 человека 767	RND
SEQ ID NO: 235 – CDR L3 антитела человека против CD38 человека 767	AAWDDSRSGVYA
SEQ ID NO: 236 – CDR H1 антитела мыши против человека OX40 из WO2013/008171	GFSLSTSGMG
SEQ ID NO: 237 – CDR H2 антитела мыши против человека OX40 из WO2013/008171	IWWDDDK
SEQ ID NO: 238 – CDR H3 антитела мыши против человека OX40 из WO2013/008171	ARIDWDGFAY
SEQ ID NO: 239 – CDR L1 антитела мыши	SSVSY

против человека OX40 из WO2013/008171	
SEQ ID NO: 240 – CDR L2 антитела мыши против человека OX40 из WO2013/008171	ATS
SEQ ID NO: 241 – CDR L3 антитела мыши против человека OX40 из WO2013/008171	QQWSSNPWT
SEQ ID NO: 242 – Ритуксан (ритуксимаб), CDR H1	GYTFTSYN
SEQ ID NO: 243 – Ритуксан (ритуксимаб), CDR H2	IYPGNGDT
SEQ ID NO: 244 – Ритуксан (ритуксимаб), CDR H3	ARSTYYGGDWYFNV
SEQ ID NO: 245 – Ритуксан (ритуксимаб), CDR L1	ASSSVSY
SEQ ID NO: 246 – Ритуксан (ритуксимаб), CDR L2	ATS
SEQ ID NO: 247 – Ритуксан (ритуксимаб), CDR L3	QQWTSNPPT
SEQ ID NO: 248 – Эрбитукс (цетуксимаб), CDR H1	GFSLTNYG
SEQ ID NO: 249 – Эрбитукс (цетуксимаб), CDR H2	IWSGGNT
SEQ ID NO: 250 – Эрбитукс (цетуксимаб), CDR H3	ARALTYYDYEFAY
SEQ ID NO: 251 – Эрбитукс (цетуксимаб), CDR L1	QSIGTN
SEQ ID NO: 252 – Эрбитукс (цетуксимаб), CDR L2	YAS
SEQ ID NO: 253 – Эрбитукс (цетуксимаб), CDR L3	QQNNNWPTT
SEQ ID NO: 254 – Вектибикс	GGSVSSGDYY

(панитумумаб), CDR H1	
SEQ ID NO: 255 – Вектибикс (панитумумаб), CDR H2	IYYSGNT
SEQ ID NO: 256 – Вектибикс (панитумумаб), CDR H3	VRDRVTGAFDI
SEQ ID NO: 257 – Вектибикс (панитумумаб), CDR L1	QDISNY
SEQ ID NO: 258 – Вектибикс (панитумумаб), CDR L2	DAS
SEQ ID NO: 259 – Вектибикс (панитумумаб), CDR L3	QHFDHLPLA
SEQ ID NO: 260 – CDR H1 антитела мыши против CD19 человека из WO2010/095031	GVSLPDYG
SEQ ID NO: 261 – CDR H2 антитела мыши против CD19 человека из WO2010/095031	IWGSETT
SEQ ID NO: 262 – CDR H3 антитела мыши против CD19 человека из WO2010/095031	AKHYYYYGGSYAMDY
SEQ ID NO: 263 – CDR L1 антитела мыши против CD19 человека из WO2010/095031	QDISKY
SEQ ID NO: 264 – CDR L2 антитела мыши против CD19 человека из WO2010/095031	HTS
SEQ ID NO: 265 – CDR L3 антитела мыши против CD19 человека из WO2010/095031	QQGATLPYT
SEQ ID NO: 266 – Bsw17, CDR H1	GFTFSSYA

SEQ ID NO: 267 – Bsw17, CDR H2	ISSGNII
SEQ ID NO: 268 – Bsw17, CDR H3	TRGRSTYGGFDH
SEQ ID NO: 269 – Bsw17, CDR L1	SSVTF
SEQ ID NO: 270 – Bsw17, CDR L2	DTS
SEQ ID NO: 271 – Bsw17, CDR L3	QHWSGNPLT
SEQ ID NO: 272 – Омализумаб, CDR H1	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 273 – Омализумаб, CDR H2	ITYDGST
SEQ ID NO: 274 – Омализумаб, CDR H3	ARGSHYFGHWHFAV
SEQ ID NO: 275 – Омализумаб, CDR L1	QSVDYDGDSY
SEQ ID NO: 276 – Омализумаб, CDR L2	AAS
SEQ ID NO: 277 – Омализумаб, CDR L3	QQSHEDPYT
SEQ ID NO: 278 – гуманизированное антитело против OX40/минимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLSTSGMGMSWVRQ APGKGLEWVSAIWWDDDKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARIDWDGFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 279 – гуманизированное антитело против OX40/максимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLSTSGMGVGWIRQA PGKGLEWLAIHWDDDKYYNTALKSGLTISKDTSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCARIDWDGFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 280 – гуманизированное антитело против OX40/минимально привитый домен VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLNWYQQKPGKA PKLLIYATSSLQSGVPSRSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYC QQWSSNPWTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 281 – гуманизированное антитело против OX40/максимально привитый домен VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKA PKPWIYATSNLASGVPSRSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQWSSNPWTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 282 – Гуманизированный Ритуксимаб/минималь но привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMSWVRQAP GKGLEWVSAIYPGNGDTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVVGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 283 – Гуманизированный Ритуксимаб/максимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMSWVRQAP GKGLEWIGAIYPGNGDYYADSVKGRATLSADSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 284 – Гуманизированный Ритуксимаб/минимально привитый домен VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASASSSVSYLNWYQQKPGK APKLLIYATSSLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQWTSNPPTFGQGTLKVEIK
SEQ ID NO: 285 – Гуманизированный Ритуксимаб/максимально привитый домен VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRLSASSSVSYLNWFQQKPGK APKWIYATSSLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQWTSNPPTFGQGTLKVEIK
SEQ ID NO: 286 – Гуманизированный Эрбитукс/минимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGMSWVRQAP GKGLEWVSAIWSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 287 – Гуманизированный Эрбитукс/максимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAP GKGLEWLGAIWGGNTDYNTPFTGRLTISKDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 288 – Гуманизированный Эрбитукс/минимально привитый домен VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGHTNLNWYQQKPGK APKLLIYYASSLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQNNNWPTTFGQGTLKVEIK
SEQ ID NO: 289 – Гуманизированный Эрбитукс/максимально привитый домен VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGHTNIHWYQQKPGKA PKLLIYKASESISGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQNNNWPTTFGQGTLKVEIK
SEQ ID NO: 290 – домен VH Вектибикса	QVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQS PGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSS VTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 291 – домен VL Вектибикса	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGK APKLLIYDASNLETGVPSRFSFGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYF CQHFDHLPLAFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 292 – Гуманизированный Вектибикс/минимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSVSSGDYYMSWVRQ APGKGLEWVSAIYYSGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRDRVTGAFDIWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 293 – Гуманизированный Вектибикс/максимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSVSSGDYYMSWVRQ APGKGLEWIGAIYYSGNTYYADSVKGRLTISIDTSKNTFYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRDRVTGAFDIWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 294 – Гуманизированный Вектибикс/минимально привитый домен VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGK APKLLIYDASSLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQHFDHLPLAFGQGTLKVEIK

SEQ ID NO: 295 – Гуманизированный Вектибикс/максимально привитый домен VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGK APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYF CQHFDHPLAFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 296 – домен VH против CD19 человека из WO2010/095031	QVQLVQSGGGVVQPGRSRLSCAASGVSLPDYGVSWVRQAP GKGLEWVAIWGETTYNNSALKSRTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 297 – домен VL против CD19 человека из WO2010/095031	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISKYLNWYQQKPGK AIKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGATLPYTFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 298 – Омализумаб, домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAP GKGLEWVASITYDGSTNYADSVKGRFTISRDDSKNTFYLQM NSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWFAVWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 299 – Омализумаб, домен VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVYDGDSYMWNWYQQ KPGKAPKLLIYAASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQQSHEDPYTFGQGTTKEIK
SEQ ID NO: 300 – Стабилизированный Омализумаб/максимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAP GKGLEWVASITYDGSTNYADSVKGRFTISRDDSKNTFYLQM NSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWFAVWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 301 – Стабилизированный Омализумаб/минимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYISITSGYSMSWVRQAP GKGLEWVASITYDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWFAVWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 302 – Стабилизированный Омализумаб/максимально привитый домен VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVYDGDSYMWNWYQQ KPGKAPKLLIYAASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQQSHEDPYTFGQGTTKEIK
SEQ ID NO: 303 – Стабилизированный Омализумаб/минимально привитый домен VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVYDGDSYMWNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQQSHEDPYTFGQGTTKEIK
SEQ ID NO: 304 – домен VH Bsw17 мыши	EVQLLESGGGFVKPGGSLKLSCVSGFTFSSYAMSWVRQTPE KRLEWVASISSGNIIYYPDNVKGRTFISRDNVRNILYLQMSSL RSEDTAMYCYTRGRSTYGGFDHWGQGTTLVSS
SEQ ID NO: 305 – домен VL Bsw17 мыши	ELVMTQSPAAMSASPGEKVTMTCASSSVTFIHWRQKSGTSP KGWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTYSLTISTMEAEDAATY YCQHWSGNPLTFGTGTKEIK
SEQ ID NO: 306 – Гуманизированный Bsw17/минимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVASISSGNIIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCYTRGRSTYGGFDHWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 307 – Гуманизированный Bsw17/максимально привитый домен VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTFSSYAMSWVRQAP GKLEWVASISSGNIIYPDNVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCTRGRSTYGGFDHWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 308 – Гуманизированный Bsw17/минимально привитый домен VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSVTFLNWYQQKPGKAP KLLIYDTSSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHWSGNPLTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 309 – Гуманизированный Bsw17/максимально привитый домен VL	DLQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSVTFLNWYQQKPGKA PWLLIYDTSSLQSGVPSRFSGSGTDFYTLTISSMQPEDFATYYC QHWSGNPLTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 310 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к HER2/CD3(SP34-каппа-2) (FAB-фрагмент антитела против HER2 с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPFGSRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKSRTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWRGGDFYAMDYWGQGTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVLFPPKPKD TLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKT PREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKTKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPS DIAVEWESSGQPENNYYTPPMULDSDGSFSLVSWLNVDKSR WQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 311 – тяжелая цепь scFv антитела BEAT SP34-каппа-2 (фрагмент против CD3-эпсилон – VH/VL32 гуманизированного SP34 BT11 LALA)	EVQLVESGGGLVQPFGSRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFAYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVTQSPLTSVSPGERATLSCR S STGAVTAANYANWVQEKGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFS GSLSGDEATLTISLQSEDFAVYYCALFYNSNLWVFGQGTLK EI KGGGGTDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVLFPPKPKDLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKEPQEEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKA KGQPREPEVATFPPSRDELTKNQVTLVCLVTGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTDPPLLESQGSFALSSRLRVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 312 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к CD38-9G7опт.каркасн./CD3(SP34-каппа-2) (FAB-фрагмент против CD38 с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPFGSRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFAYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPPKPKDLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEV HNAKTKEPQEEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCL VTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYYTPPMULDSDGSFSLVSWL NVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 313 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT	EVQLVESGGGLVQPFGSRLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVT

CD38-767/CD3(SP34-каппа-2) (FAB-фрагмент против CD38 с заменой G65S BT33 LALA)	VSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKTKGQPREPavyTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRTQKSLSPG
SEQ ID NO: 314 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к OX40МАКСП/CD3(SP34-каппа-2) (максимально привитый FAB-фрагмент против OX40 с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLSTSGMVGWIRQAPGKGLEWLAIWWDDDKEYNTALKSGLTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARIDWDGFAYWGQGTLTVVSSASTKGPSVFPAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKTKGQPREPavyTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRTQKSLSPG
SEQ ID NO: 315 – легкая цепь FAB антитела BEAT к OX40МАКСП/CD3(SP34-каппа-2 (LC максимально привитого FAB-фрагмента против OX40))	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPIWYATSNLASGVPSRSGSGTDTYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 316 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к OX40МИНГ/CD3(SP34-каппа-2) (минимально привитый FAB-фрагмент против OX40с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLSTSGMGMSWVRQAPGKGLEWVSAJWWDDDKYYADSVKSRTFISRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARIDWDGFAYWGQGTLTVVSSASTKGPSVFPAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKTKGQPREPavyTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRTQKSLSPG
SEQ ID NO: 317 – легкая цепь FAB антитела BEAT к OX40МИНГ/CD3(SP34-каппа-2) (LC минимально привитого FAB-фрагмента против OX40))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLNWYQQKPGKAPKLLIYATSSLQSGVPSRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 318 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMSWVRQAPGKGLEWIGAIYPGNGDTYYADSVKSRTTLSADKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWQGQGTLTVSSA

CD20МАКСII/CD3(SP3-каппа-2) (максимально привитый FAB-фрагмент против CD20 с заменой G65S BT33 LALA)	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVVDGVEVHNATKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKTKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGYPDSIAVEWESSGQPENNYYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 319 – BEAT к CD20МАКСII/CD3(SP3-каппа-2) легкая цепь FAB антитела (LC максимально привитого FAB-фрагмента против CD20)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRLSASSSVSYLNWFQQKPGKAPKPWIYATSSLQSGVPSRFSGSGSTDYTLTISSLQPEDFATYCYQQWTSNPPTFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDISTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 320 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к CD20МИНП/CD3(SP3-4-каппа-2) (минимально привитый FAB-фрагмент против CD20с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMSWVRQAPGKGLEWVSAIYPGNGDYYADSVKSRSFTISRDNSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGQGTLTVSSASTKGPVSPVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVVDGVEVHNATKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKTKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGYPDSIAVEWESSGQPENNYYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 321 – легкая цепь FAB антитела BEAT к CD20МИНП/CD3(SP3-4-каппа-2) (LC минимально привитого FAB-фрагмента против CD20)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASASSSVSYLNWYQQKPGKAPKLIIYATSSLQSGVPSRFSGSGSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWTSNPPTFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDISTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 322 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT EGFRcetux-МАКСII/CD3(SP34-каппа-2) (максимально привитый FAB-фрагмент цетуксимаба против рЭФР с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWLGAWSGGNTDYNTPTSRSLTISKDNKNLTYLQMN SLRAEDTAVYYCARALTYDYEFAWVGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVVDGVEVHNATKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKTKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 323 – легкая цепь FAB антитела BEAT	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGTNIHWWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNNNWPTTFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS

EGFRcetux-MAKСП/CD3(SP34-каппа-2) (максимально привитый FAB-фрагмент цетуксимаба против рЭФР)	VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 324 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT EGFRcetux-МИНП/CD3(SP34-каппа-2) (минимально привитый FAB-фрагмент цетуксимаба против рЭФР с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGFSLTNYGMSWVRQAPGKGLEWVSAIWSGGNTYYADSVKSRTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYPFPEPVTVWNNGALTSGVHTFPALQSSGLYSSVTVPSQLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVGVEVHNAKTKEEQYNSTFRVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPRAPEAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 325 – легкая цепь FAB антитела BEAT EGFRcetux-МИНП/CD3(SP34-каппа-2) (минимально привитый FAB-фрагмент цетуксимаба против рЭФР)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGTNLNWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFSGSGTDFLTISSSLQPEDFATYCYQQQNNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 326 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT EGFRpani-МАКСП/CD3(SP34-каппа-2) (максимально привитый FAB-фрагмент панитумумаба против рЭФР с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSVSSGDYYMSWVRQAPGKGLEWIGAIYYSGNTYYADSVKSRLTISIDTSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCVRDRVTGAFDIWQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYPFPEPVTVWNNGALTSGVHTFPALQSSGLYSSVTVPSQLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVGVEVHNAKTKEEQYNSTFRVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPRAPEAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 327 – легкая цепь FAB антитела BEAT EGFRpani-МАКСП/CD3(SP34-каппа-2) (максимально привитый FAB-фрагмент панитумумаба против рЭФР)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGTDFFTISSSLQPEDIATYFCQHFDHPLAFIGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 328 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSVSSGDYYMSWVRQAPGKGLEWVSAIYYSGNTYYADSVKSRTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRDRVTGAFDIWQGTLTVSSASTKG

EGFRpani- МИНП/CD3(SP34- каппа-2) (минимально привитый FAB- фрагмент панитумаба против рЭФР с заменой G65S BT33 LALA)	PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYTTTPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 329 – легкая цепь FAB антитела BEAT EGFRpani- МИНП/CD3(SP34- каппа-2) (минимально привитый FAB- фрагмент панитумаба против рЭФР)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRSRFSGSGSGTDFLTISQLQPEDFATYYCQCQHFDDHPLAFGQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
SEQ ID NO: 330 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT CD19/CD3(SP34- каппа-2) (FAB- фрагмент против CD19 с заменой G65S BT33 LALA)	QVQLVQSGGGVVQPGRLSRLSCAASGVSLPDYGVSWVRQAPGKGLEWVAIVGSETTYYNSALKSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYTTTPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 331 – легкая цепь FAB антитела BEAT CD19/CD3(SP34- каппа-2) (FAB- фрагмент против CD19)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAIKLLIYHTSRLHSGVPSRSRFSGSGSGTDFLTISQLQPEDFATYYCQQGATLPYTFPGPTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
SEQ ID NO: 332 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT IgEomali- МАКСП/CD3(SP34- каппа-2) (максимально привитый FAB- фрагмент омализумаба против IgE с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNVIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNYADSVKSRFTISRDDSNTFYLQMN SLRAEDTAVYYCARGSHYFGWHFAVVGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKKGQPREPAVYTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPSDIAVEWESSGQPENNYTTTPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 333 – легкая цепь FAB антитела BEAT	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSDYDGDSYMWNWYQQKPGKAPKLLIYAAESLGVPSRSRFSGSGSGTDFLTISQLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL

IgEomali-МАКСП/CD3(SP34-каппа-2) (максимально привитый FAB-фрагмент омализумаба против IgE)	KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 334 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT IgEomali-МИНП/CD3(SP34-каппа-2) (минимально привитый FAB-фрагмент омализумаба против IgE с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITSGYSMSWVRQAP GKGLEWVSAITYDGSTYYADSVKSRTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWFAVWGQGTLTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPK DTLMSIRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVGVEVHNAKT KPREEQYNSTRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKTKGQPREPavyTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFY PSDIAVEWESSQGPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKS RWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 335 – легкая цепь FAB антитела BEAT IgEomali-МИНП/CD3(SP34-каппа-2) (минимально привитый FAB-фрагмент омализумаба против IgE с заменой G65S BT33 LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVYDGDSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTISLQPED FATYYCQQSHEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 336 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT IgEbsw17-МАКСП/CD3(SP34-каппа-2) (максимально привитый FAB-фрагмент омализумаба против IgE с заменой G65S BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVASISSGNIYYPDNVKSRTISRDNAKNSLYLQMN S LRAEDTAVYYCTRGRSTYGGFDHWGQGTTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPKNT KVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVGVEVHNAKT KPR EEQYNSTRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKTKGQPREPavyTLPPSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPS DIAVEWESSQGPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKS RWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 337 – легкая цепь FAB антитела BEAT IgEbsw17-МАКСП/CD3(SP34-каппа-2) (максимально привитый FAB-фрагмент омализумаба против IgE)	DLOMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTFLNWYQQKPGKA PWLLIYDTSSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTISMQPEDFATYY CQHWSGNPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGE C
SEQ ID NO: 338 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT IgEbsw17-	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVASISSGNIYADSVKSRTISRDNSKNTLYLQMN S LRAEDTAVYYCTRGRSTYGGFDHWGQGTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

МИНП/CD3(SP34-каппа-2) (минимально привитый FAB-фрагмент омализумаба против IgE с заменой G65S BT33 LALA)	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSLGTQTYICNVNHPKSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPCTPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTPR EEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKTKGQPREPASYTLPSSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPS DIAVEWESSGGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSR WQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 339 – легкая цепь FAB антитела BEAT IgEbsw17- МИНП/CD3(SP34-каппа-2) (минимально привитый FAB-фрагмент омализумаба против IgE)	DIQMTQSPSSLASVGDRVITICRASSSVTFLNWYQQKPGKAP KLIIVDTSSIQSGVPSRSFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHWSGNPLTFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 340 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к OX40/CD3(SP34-каппа-2) (FAB-фрагмент против OX40 ID4 BT33 LALA)	QVTLKESGPALVKPTQTLTLCFSFGFSLSTSGMGVGWIRQPP GKALEWIAHIWWDDDKYYNTALKTRLTISKDTSKNQVVLTM TNMDPVDTATYYCARIDWDGFAYWGQGTLVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSLGTQTYICNVNHPKSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPCTPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTPR EEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKTKGQPREPASYTLPSSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPS DIAVEWESSGGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSR WQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 341 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT к CD20/CD3(SP34-каппа-2) (FAB-фрагмент ритуксимаба против CD20 с BT33 LALA)	QVQLQQPGAAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQFKGKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSA VYYCARSTYYGGDWYFVNNGAGTTVTSAA STKGPSPVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSLGTQTYICNVN H KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCTPAPEAAGGPSVFLFPPK P KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTKGQPREPASYTLPSSREEMTKNQVKLVCLVTGF YPSDIAVEWESSGGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDK SRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 342 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT EGFRcetux/CD3(SP34-каппа-2) (FAB-фрагмент цетуксимаба против рЭФР с BT33 LALA)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSICTVSGFSLTNYGHVWVRQSPG KGLEWLGVIVWSGGNTDYNTPFTSRSLINKDNKSQVFHKMNS LQSNNDTAIYCARALTYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSLGTQTYICNVNHPKSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPCTPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTPR EEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKTKGQPREPASYTLPSSREEMTKNQVKLVCLVTGFYPS DIAVEWESSGGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSR WQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 343 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT EGFRpani/CD3(SP34-каппа-2) (FAB-фрагмент панигурумаба против рЭФР с BT33 LALA)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQS PGKGLEWIGHIYSGNTNYPNSLKSRLTISIDTSKTQFSKLSS VTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQQGTMVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPPKPDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCVSNKALPAIEKTI SKTKGQPRAVYTLPPSREEMTKNQVVLVCLVTGFYPSDIA VEWESSGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQ GNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSPG
SEQ ID NO: 344 – легкая цепь FAB антитела BEAT EGFRpani/CD3(SP34-каппа-2) (FAB-фрагмент панигурумаба против рЭФР)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGK APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFIFTISSLQPEDIATYF CQHFDHPLAFLGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
SEQ ID NO: 345 – тяжелая цепь FAB антитела BEAT IgEomali/CD3(SP34-каппа-2), (FAB-фрагмент омализумаба против IgE BT33 LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNIRQAP GKGLLEWVASITYDGSTNYADSVKGRFTISRDDSKNTFYLQMN SLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWFVAVGQGTLTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNMN PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISITPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCVSNKALPA PIEKTISKTKGQPRAVYTLPPSREEMTKNQVVLVCLVTGFY PSDIAVEWESSGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKS RWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSPG
SEQ ID NO: 346 – антитело BEAT IgEomali/CD3(SP34-каппа-2), легкая цепь FAB (FAB-фрагмент омализумаба против IgE)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDYDGDSYMWNWYQQ KPGKAPKLLIYAAASYLESVGPSSRFSGSGSGTDFLTISISSLQPED FATYYCQQSHEDPYTFGGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 347 – антитело BEAT IgEbsw17/CD3(SP34-каппа-2), тяжелая цепь FAB (FAB-фрагмент Bsw17 против IgE BT33 LALA)	EVQLLESGGGFVKPGGSLKLSCVVSGBTFFSYAMSWVRQTPE KRLEWVASISSGNIYYPDNVKGRFTISRDNVRNILYLOMSSL RSEDTAMYCYTRGRSTYGGFDHWGQGTTLVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPPKPDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCVSNKALPAIEKTI SKTKGQPRAVYTLPPSREEMTKNQVVLVCLVTGFYPSDIA VEWESSGQPENNYTTPPMLSDGSFSLVSWLNVDKSRWQQ GNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSPG
SEQ ID NO: 348 – антитело BEAT	ELVMTQSPAIMSASPGEKVTMTCASSTVTIFIHWYRQKSGTSP KGWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTMEAEDAATY

IgEbsw17/CD3(SP34-каппа-2), легкая цепь FAB (FAB-фрагмент против IgE Bsw17)	YCQHWSGNPLTFTGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDISTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRC
SEQ ID NO: 349 – scFv-фрагмент VH1- VL24 гуманизированного SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRS SAAAVTTSNYANWVQEKGPGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFS GSLSGDEATLISSLQSEDFAVYYCALWYSNLWVFGQGKTLE IKGGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPDKTLMIS RTP EVCVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 350 – scFv-фрагмент VH1- VL25 гуманизированного SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRS STGAAATSNYANWVQEKGPGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFS GSLSGDEATLISSLQSEDFAVYYCALWYSNLWVFGQGKTLE IKGGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPDKTLMIS RTP EVCVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 351 – scFv-фрагмент VH1- VL26 гуманизированного SP34– гибрид с Fc IgG1 человека	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQQGTTVT VSSGGGGSGGGGGGGSEIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRS STGAVTAANYANWVQEKGPGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFS GSLSGDEATLISSLQSEDFAVYYCALWYSNLWVFGQGKTLE IKGGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPDKTLMIS RTP EVCVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 352 – Гуманизированное SP34 против CD3-эпсилон человека, VH5 CDR H1	GFTFNTYA
SEQ ID NO: 353 – Гуманизированное SP34 против CD3-эпсилон человека, VH5 CDR H2	IRSKYNNYAT

SEQ ID NO: 354 – Гуманизированное SP34 против CD3-эпсилон человека, VH5 CDR H3	VRHGNFGNSYVSYFAY
SEQ ID NO: 355 – Гуманизированное SP34 против CD3-эпсилон человека, VL32 CDR L1	TGAVTAANY
SEQ ID NO: 356 – Гуманизированное SP34 против CD3-эпсилон человека, VL32 CDR L2	GAN
SEQ ID NO: 357 – Гуманизированное SP34 против CD3-эпсилон человека, VL32 CDR L3	ALFYSNLWV
SEQ ID NO: 358 – ОКТ3, гуманизированный домен VH9	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTYYADSVKSRTLSTDKSNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 359 – SP34, гуманизированная тяжелая цепь IgG1 с VH5	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARISKVNYYATYYADSVKGRFTISRDDSNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSYFAYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYPPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFL FPPKPKDITLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 360 – Гуманизированная легкая цепь SP34 с VL32	EIVVTQSPATLSVSPGERATLSCRSSGTAVTAANYANWVQEKG PGQAFRGLIGGANKRAPGVPARFSGLSGDEATLTISLQSED FAVYYCALFYSNLWVFGQGTKLEIKKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKF SNRGECE

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеродимерный иммуноглобулин, который содержит:

(а) первый полипептид, содержащий область связывания эпитопа, которая связывает первый эпитоп, и константную область иммуноглобулина; и

(б) второй полипептид, содержащий область связывания эпитопа, которая связывает второй эпитоп, и константную область иммуноглобулина;

при этом указанный гетеродимерный иммуноглобулин способен связываться с

i) белковым комплексом CD3 и HER2, причем указанный первый полипептид имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 159, соединен с легкой цепью с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 47 и связывает CD3-эпсилон; и указанный второй полипептид имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 160 и связывает HER2;

ii) белковым комплексом CD3 и HER2, причем указанный первый полипептид имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 161, соединен с когнатной легкой цепью с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3 и связывает HER2; и указанный второй полипептид имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 162 и связывает CD3-эпсилон;

iii) белковым комплексом CD3 и HER2, причем указанный первый полипептид имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 163, соединен с легкой цепью с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 47 и связывает CD3-эпсилон; и указанный второй полипептид имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 164 и связывает HER2;

iv) белковым комплексом CD3 и HER2, причем указанный первый полипептид имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 165, соединен с легкой цепью с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 166 и связывает CD3-эпсилон; и указанный второй полипептид имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 167 и связывает HER2;

v) белковым комплексом CD3 и HER2, причем указанный первый полипептид имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 168, соединен с легкой цепью с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 89 и связывает CD3-эпсилон; и указанный второй полипептид имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 167 и связывает HER2.

2. Способ получения гетеродимерного иммуноглобулина *in vitro* по п.1, включающий следующие

этапы:

ia) обеспечение ДНК-вектора, кодирующего тяжелую цепь первого полипептида, и ДНК-вектора, кодирующего тяжелую цепь второго полипептида, при этом один или оба ДНК-вектора или третий ДНК-вектор кодируют общую легкую цепь, или легкую цепь, соединяемую с тяжелой цепью указанного первого или второго полипептида; или

ib) обеспечение одного ДНК-вектора, кодирующего тяжелые цепи указанных первого и второго полипептидов, при этом указанный ДНК-вектор кодирует общую легкую цепь или легкую цепь, соединяемую с тяжелой цепью указанного первого или второго полипептида; и при этом указанные ДНК-векторы подходят для транзиентной или стабильной экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего;

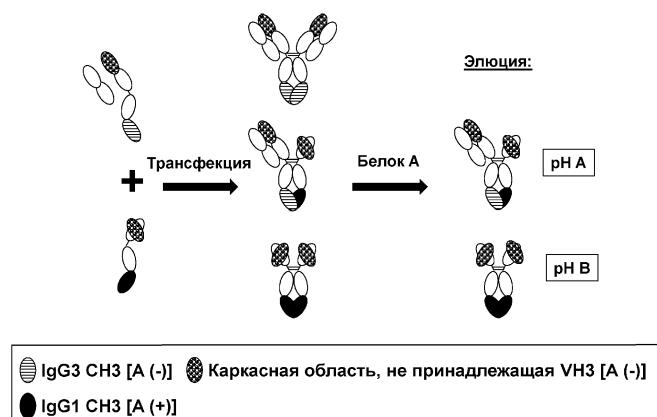
ii) трансфекция или совместная трансфекция ДНК-вектором(ами) по (ia) или (ib) клеток-хозяев линии клеток млекопитающих;

iii) культивирование трансфицированной клеточной линии или ее стабильно селектируемого клона и сбор клеточного культурального супернатанта;

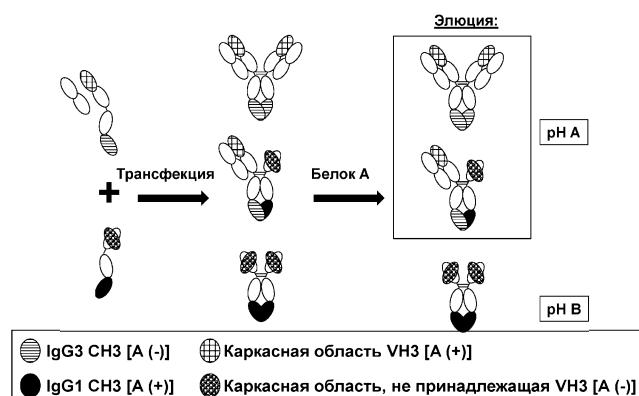
iv) приведение в контакт клеточного культурального супернатанта со смолой для аффинной хроматографии с белком А и

v) элюирование и сбор указанного гетеродимерного иммуноглобулина.

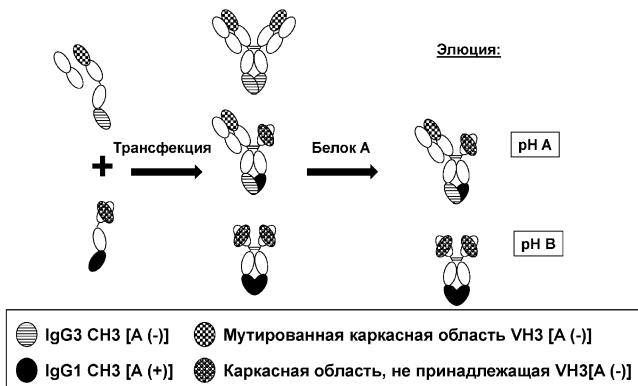
3. Способ по п.2, отличающийся тем, что чистота указанного гетеродимерного иммуноглобулина, обнаруживаемого в очищенном материале этапа (v), составляет по меньшей мере 95% по оценке с применением капиллярного электрофореза.



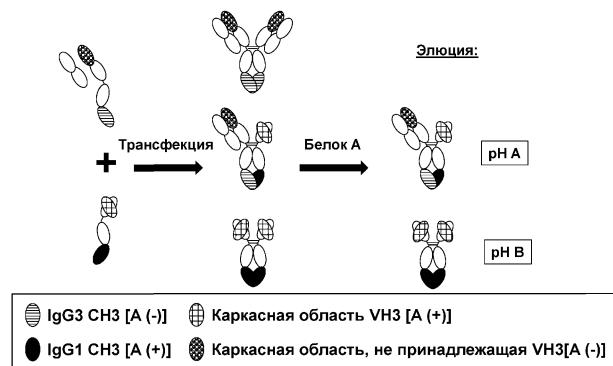
Фиг. 1



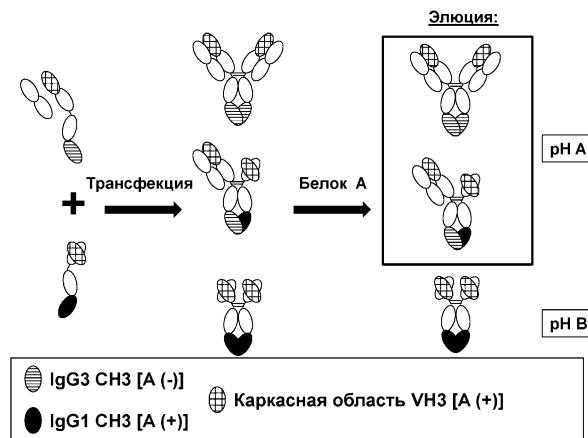
Фиг. 2А



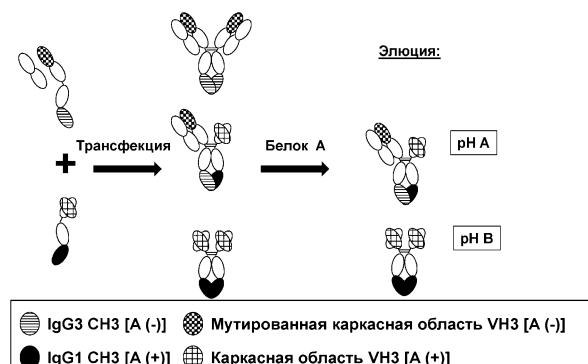
Фиг. 2В



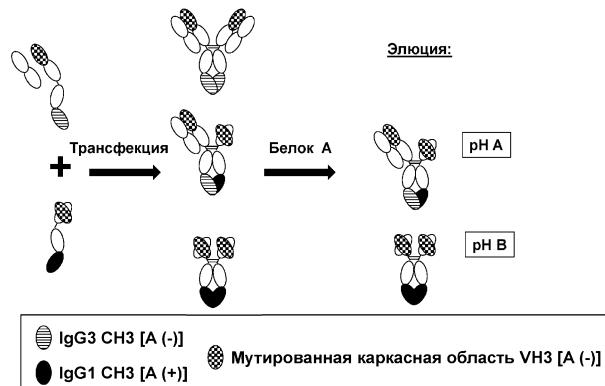
Фиг. 2С



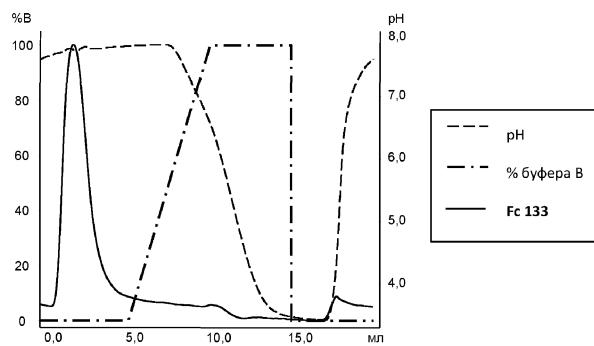
Фиг. 2Д



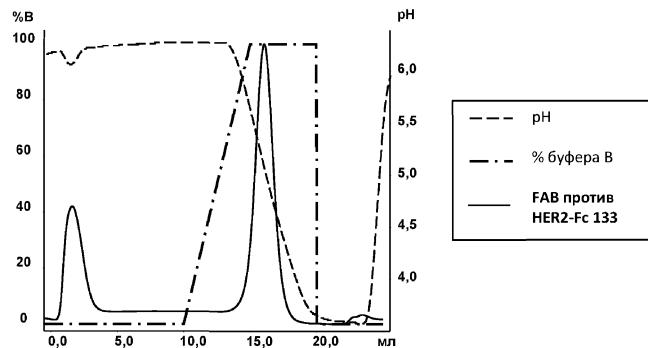
Фиг. 2Е



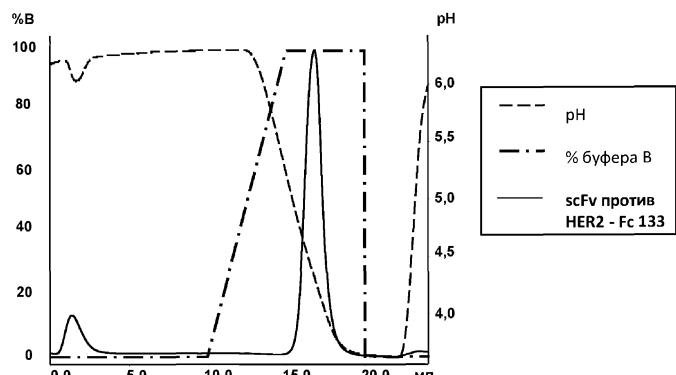
Фиг. 2F



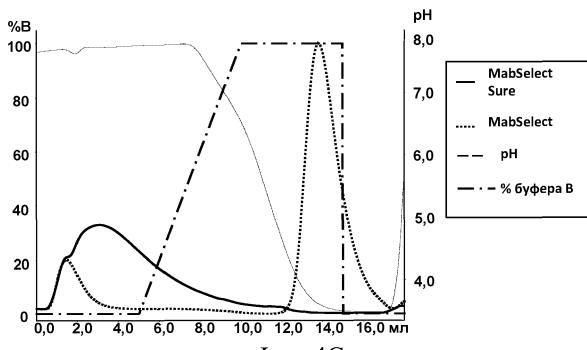
Фиг. 3



Фиг. 4А

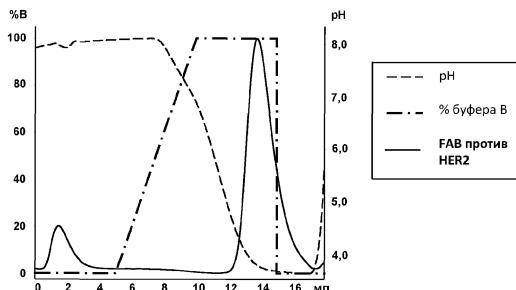


Фиг. 4В

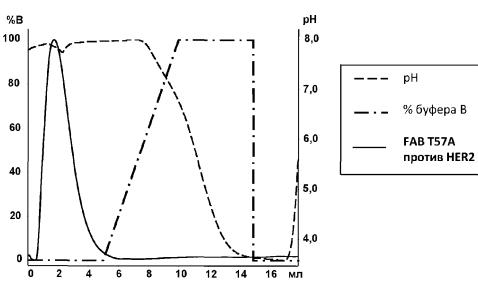


Фиг. 4С

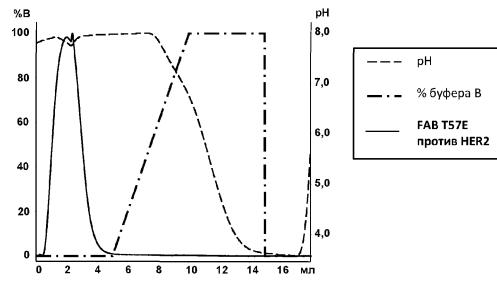
Фиг. 5



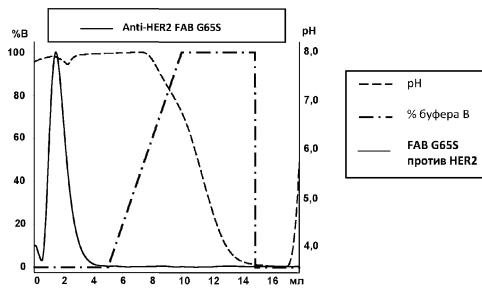
Фиг. 6А



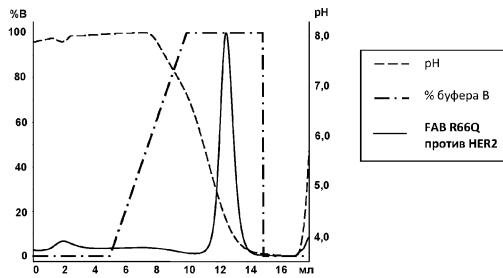
Фиг. 6В



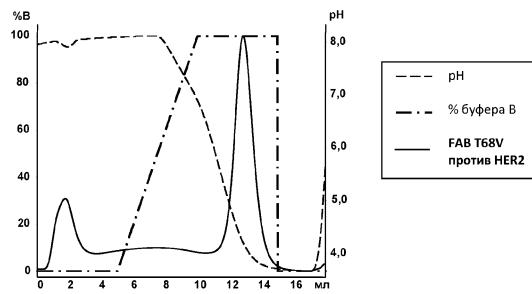
Фиг. 6С



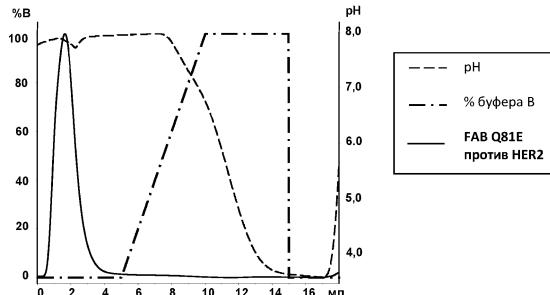
Фиг. 6Д



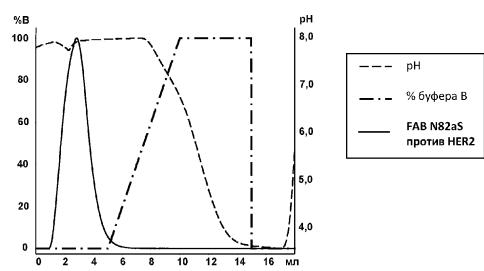
Фиг. 6Е



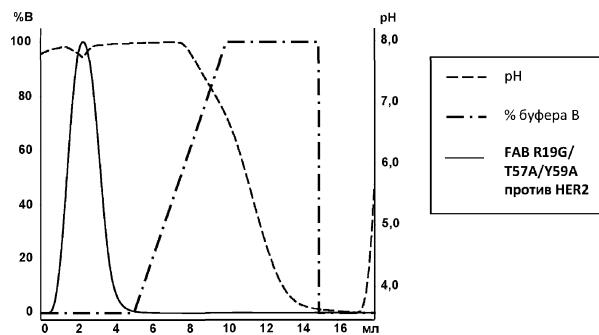
Фиг. 6F



Фиг. 6Г



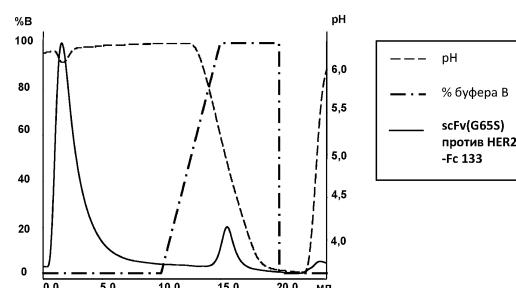
Фиг. 6Н



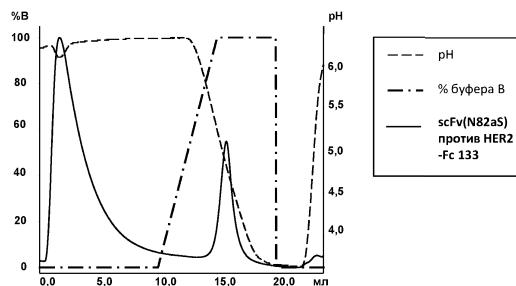
Фиг. 6I

	KD (nM)
FAB против HER2	153 ± 9
FAB против HER2 N82aS	162 ± 19
FAB против HER2 G65S	142 ± 30

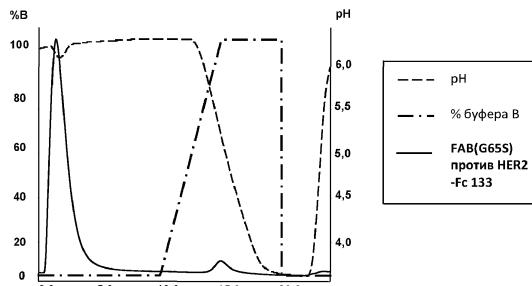
Фиг. 7



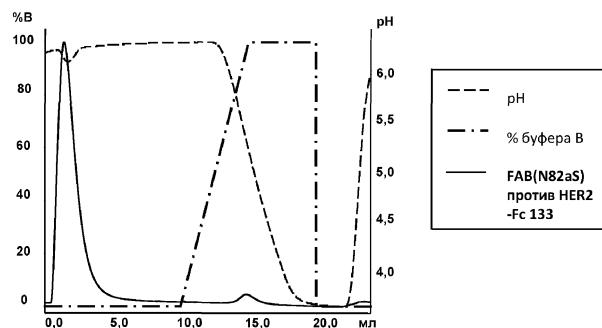
Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 8С



Фиг. 8Д

Антитело	Обратные мутации VH / VL	SEQ ID NO цепей H / L	Транзиентная экспрессия (мг/л)	FAB Tm (°C)	Окрашивание HPB-ALL по сравнению с гибридным ОКТ3
Гибридное ОКТ3	H/O	25/26	20	80,7	+++
VH/VL	- / -	27/39	50	88,1	-
VH/VL2	- / M4L	27/41	47	90,6	-
VH/VL3	- / M4L- F71Y	27/42	43	89,8	+
VH1/VL1	A49G / F71Y	28/40	22	90,1	-
VH1/VL2	A49G / M4L	28/41	42	90,5	-
VH1/VL3	A49G / M4L-F71Y	28/42	40	90,7	+
VH2/VL1	I34M-A49G / F71Y	29/40	51	89,5	-
VH2/VL2	I34M-A49G / M4L	29/41	43	90,1	-
VH2/VL3	I34M-A49G / M4L- F71Y	29/42	42,5	89,5	+
VH3/VL1	A49G-A71T / F71Y	30/40	33,5	89,7	-
VH3/VL2	A49G-A71T / M4L	30/41	42	90,4	-
VH3/VL3	A49G-A71T / M4L- F71Y	30/42	56,5	89,8	+

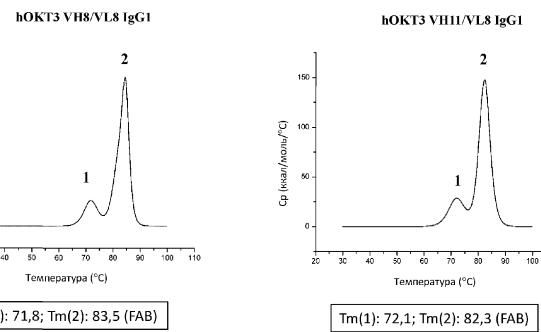
Фиг. 9А

Антитело	Обратные мутации	SEQ ID NO цепей H / L	Транзиентная экспрессия (мг/л)	FAB Tm (°C)	Окрашивание HPB-ALL по сравнению с гибридным ОКТ3
VH4/VL2	I34M-A49G-A71T / M4L	31/41	20	88,4	++
VH4/VL3	I34M-A49G-A71T / M4L-F71Y	31/42	34	88,7	++
VH5/VL2	I34M-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L	32/41	40	87	++
VH5/VL3	I34M-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L- F71Y	32/42	36	87,2	++
VH5/VL4	I34M-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L- L46R-L47W-F71Y	32/43	12	80,3	+++
VH5/VL6	I34M-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L- L46R-L47W-F71Y-P96F	32/45	15,6	78,6	+++
VH5/VL7	I34M-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L- V33M-A34N-F71Y-P96F	32/46	35,4	84,1	++
VH6/VL3	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-F71Y	33/42	23	88,3	++
VH6/VL4	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-F71Y	33/43	14	80,8	+++
VH6/VL5	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-V33M-A34N-F71Y	33/44	26	86,1	++
VH6/VL6	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-F71Y-P96F	33/45	14,8	79,1	+++
VH6/VL7	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-V33M-A34N-F71Y-P96F	33/46	32	85,3	++

Фиг. 9В

Антитело	Обратные мутации	SEQ ID NO цепей H / L	Транзиентная экспрессия (мг/л)	FAB Tm (°C)	Окрашивание HPB-ALL по сравнению с гибридным ОКТ3
VH6/VL8	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L- L46R-L47W-R66G-F71Y	33/47	7	80,6	+++
VH7/VL3	I34M-A49G-R58N-I69L-A71T-T73K / M4L- F71Y	34/42	21	86,1	++
VH7/VL4	I34M-A49G-R58N-I69L-A71T-T73K / M4L- L46R-L47W-F71Y	34/43	25	80,5	+++
VH7/VL5	I34M-A49G-R58N-I69L-A71T-T73K / M4L- V33M-A34N-F71Y	34/44	26	84,12	++
VH8/VL4	I34M-V48I-A49G-R58Y-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-F71Y	35/43	7	80,9	+++
VH8/VL8	I34M-V48I-A49G-R58Y-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	35/47	23	83,5	+++
VH9/VL8	I34M-V48I-A49G-R58Y-G65S-I69L-A71T- T73K / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	36/47	13	82	+++
VH10/VL4	I34M-V48I-A49G-R58Y-G65S-F67A-I69L- A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	37/43	7	78,6	+++
VH10/VL8	I34M-V48I-A49G-R58Y-G65S-F67A-I69L- A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	37/47	10	80,4	+++
VH11/VL4	I34M-V48I-A49G-R58Y-I69L-A71T-T73K- N82aS / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	38/43	8	80,3	+++
VH11/VL8	I34M-V48I-A49G-R58Y-I69L-A71T-T73K- N82aS / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	38/47	15	82,3	+++

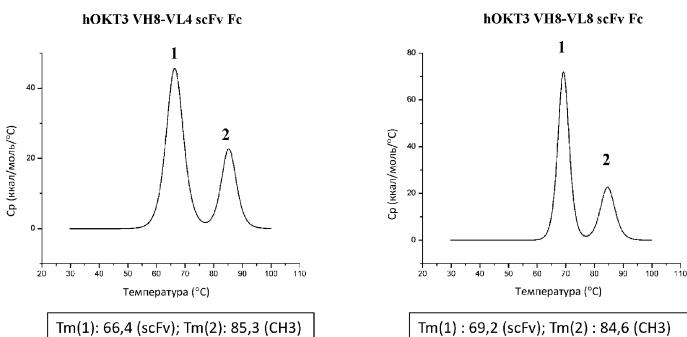
Фиг. 9С



Фиг. 9Д

Гибрид scFv-Fc	SEQ ID NO	Транзиентная экспрессия (мг/л)	scFv Tm (°C)	Окрашивание НРВ-ALL по сравнению с гибридом ОКТ3
ОКТ3 мыши	52	0.35	-	++
VH5-VL3	53	21	71,2	+
VH6-VL4	54	29	65,3	++
VH6-VL5	55	27	71,2	++
VH8-VL4	56	28	66,4	+++
VH8-VL8	57	28	69,2	+++

Фиг. 9Е



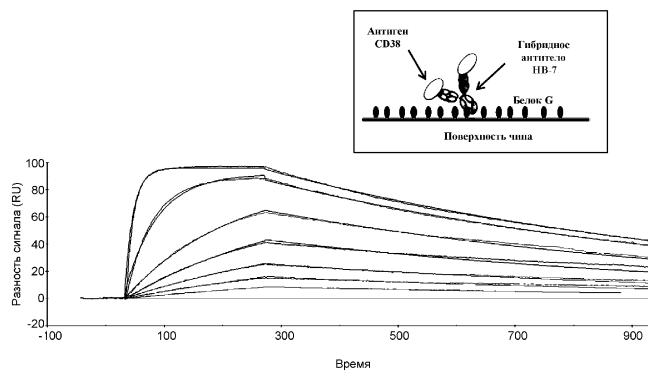
Фиг. 9F

Антитело	Обратные мутации VH/VL	SEQ ID NO цепей H/L	формат	Транзиентная экспрессия (мг/л)	ППР-данные по связыванию с белками CD3-эпсилон человека/японского макака + 1-26_Fc
Гибридное SP34	H/O	62/63	IgG1	7	++++
VH1/VL1	./-	64/69	IgG1	8	+
VH1/VL2	./Q89A	64/70	IgG1	1	+++
VH1/VL3	./deleted 8P	64/71	IgG1	0,5	-
VH1/VL4	./deleted 8P-Q89A	64/72	IgG1	0,5	+++
VH1/VL5	./A2I-Q89A	64/73	IgG1	2,6	+++
VH1/VL6	./F44P-Q89A	64/74	IgG1	0,9	+++
VH1/VL7	./A2I-F44P-Q89A	64/75	IgG1	Экспрессия отсутствует	Не тестировалось
VH1/VL8	./L66G-Q89A	64/76	IgG1	0,08	+
VH1/VL9	./A2I-L66G-Q89A	64/77	IgG1	Экспрессия отсутствует	Не тестировалось
VH1/VL10	./F87Y-Q89A	64/78	IgG1	6	++++
VH1/VL11	./L66G-D69T-Q89A	64/79	IgG1	0,8	+
VH1/VL12	./D69T-Q89A	64/80	IgG1	1,5	++
VH1/VL13	./S25A-Q89A	64/81	IgG1	1	+++
VH1/VL14	./G46L-Q89A	64/82	IgG1	3	-
VH1/VL15	./E38Q-Q89A	64/83	IgG1	3	+++
VH1/VL16	./A2I-D69T-Q89A	64/84	IgG1	0,5	+
VH1/VL17	./A2I-S25A-Q89A	64/85	IgG1	1	++
VH1/VL18	./A2I-Q89A-Q100G	64/86	IgG1	1	++
VH1/VL19	./A2I-D69T-F87Y-Q89A	64/87	IgG1	0,2	+
VH1/VL20	./A2I-E38Q-D69T-F87Y-Q89A	64/88	IgG1	Экспрессия отсутствует	Не тестировалось
VH1/VL21	./A2I-F87Y-Q89A	64/89	IgG1	8	+++
VH1/VL22	./A2I-E38Q-F87Y-Q89A	64/90	IgG1	2	+++

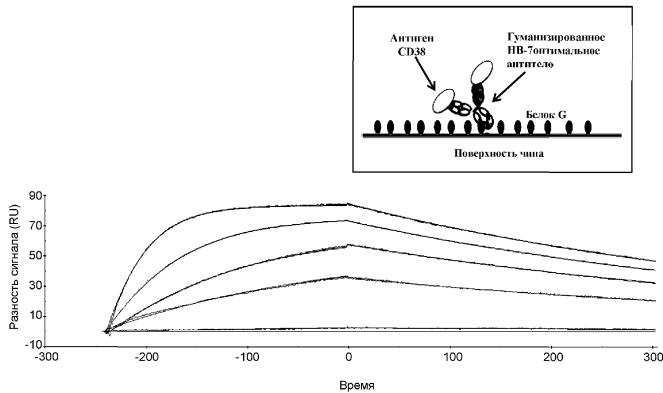
Фиг. 10А

Гибрид ScFv-Fc	Обратные мутации VH/VL	SEQ ID NO цепей H/L	Формат	Транзиентная экспрессия (мг/л)	ППР-данные по связыванию с белками CD3-эпсилон человека/яванского макака + 1-26 Fc
VH2/VL21	G65S /A2I-F87Y-Q89A	91	scFv-Fc	5	+++
VH3/VL23	G65S-W100eY /A2I-F87Y-Q89A-W91F	92	scFv-Fc	10	++
VH4/VL23	G65S-W100eF /A2I-F87Y-Q89A-W91F	93	scFv-Fc	5,5	++++
VH5/VL23	W100eY/A2I-F87Y-Q89A-W91F	94	scFv-Fc	15	++++
VH1/VL24	-/A2I-T27A-G27aA-F87Y-Q89A	349	scFvFc	Экспрессия отсутствует	Не тестировалось
VH1/VL25	-/A2I-V27cA-T28A-F87Y-Q89A	350	scFvFc	4	-
VH1/VL26	-/A2I-T29A-S30A-F87Y-Q89A	351	scFvFc	12	++++
VH1/VL27	-/A2I-N31A-Y32A-F87Y-Q89A	95	scFvFc	2	-
VH1/VL28	-/A2I-N52A-K53A-F87Y-Q89A	96	scFvFc	Экспрессия отсутствует	Не тестировалось
VH1/VL29	-/A2I-R54A-P56A-F87Y-Q89A	97	scFvFc	4	-
VH1/VL30	-/A2I-Y92A-S93A-F87Y-Q89A	98	scFvFc	2	+
VH1/VL31	-/A2I-N94A-F87Y-Q89A	99	scFvFc	2	++
VH5/VL32	W100eY/A2I-T29A-S30A-T51A-F87Y-Q89A-W91F	100	scFvFc	25	++++

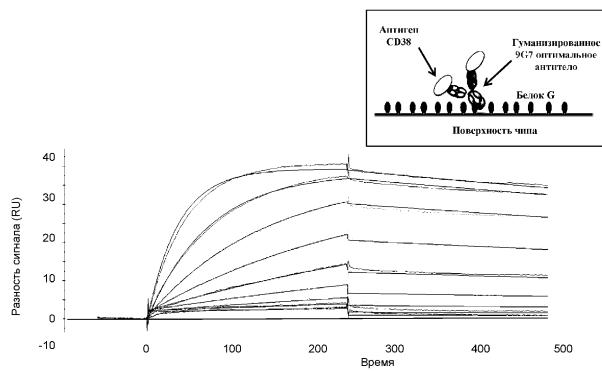
Фиг. 10В



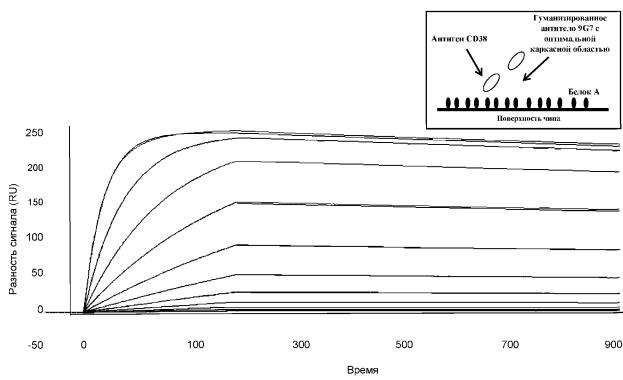
Фиг. 11А



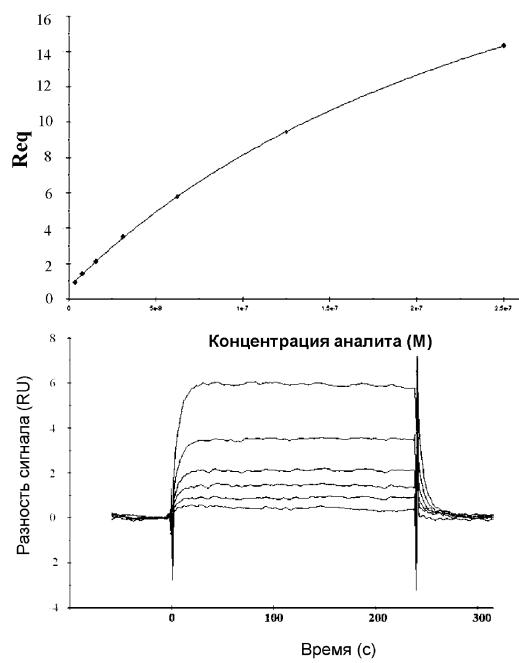
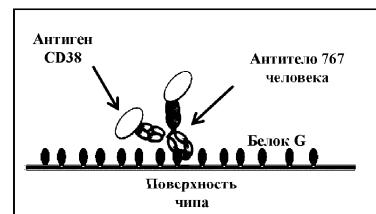
Фиг. 11В



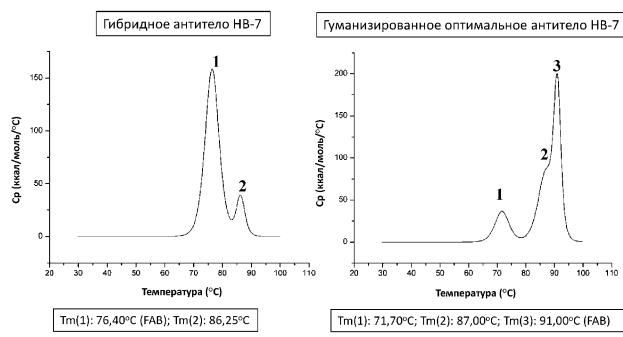
Фиг. 11С



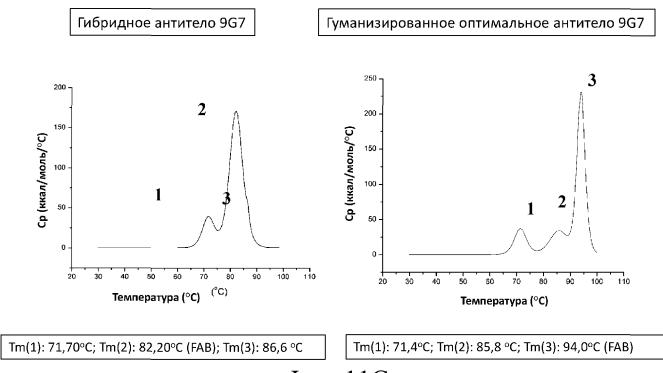
Фиг. 11D



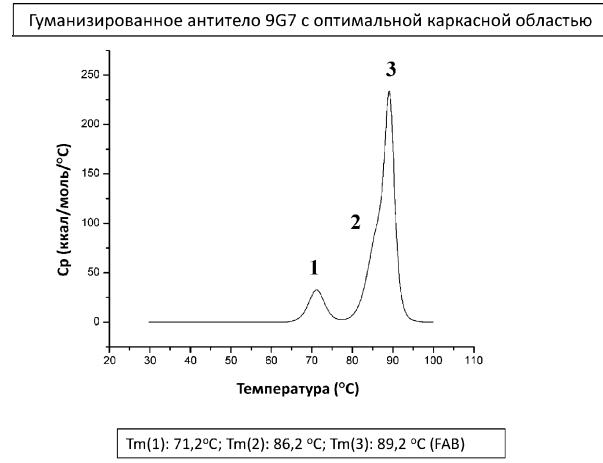
Фиг. 11E



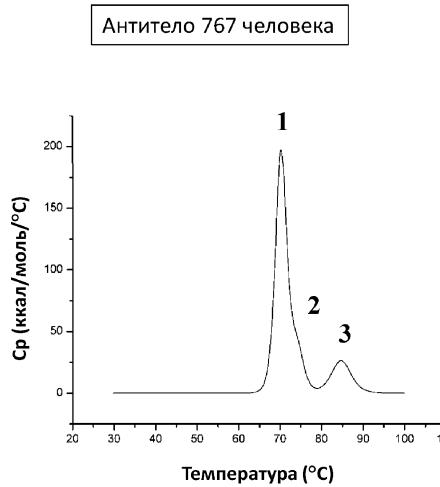
Фиг. 11F



Фиг. 11Г



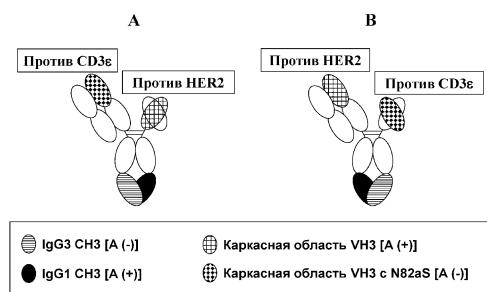
Фиг. 11Н



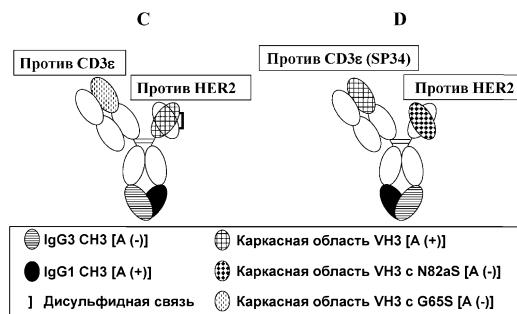
Фиг. 11И

	Гибридное антитело 9G7	Гуманизированное оптимальное 9G7 антитело	Гуманизированное антитело 9G7 с оптимальной каркасной областью
HC/LC SEQ ID NO	126/127	124/128	131/132
Уровни транзинтной экспрессии (мг/л)	20	11	17
KD для гибридного белка CD3-эпилон человека + 1-26_Fc (нМ)	0,4	0,5	0,4
KD для гибридного белка CD3-эпилон яванского макака + 1-26_Fc (нМ)	1	3,2	1
FAB Tm (°C)	82,2	94	89,2

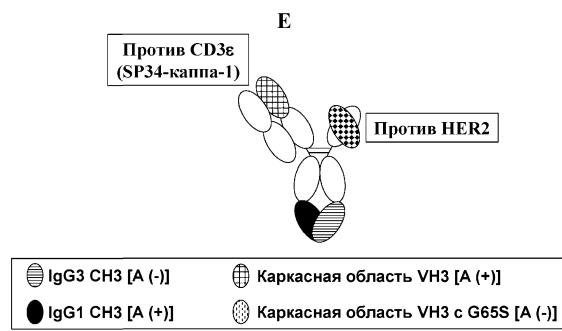
Фиг. 11J



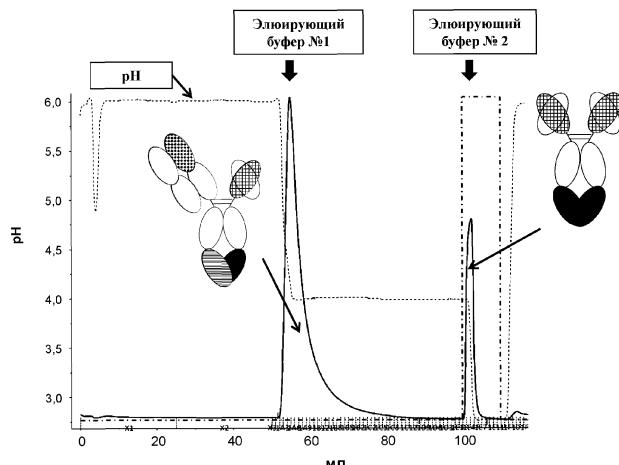
Фиг. 12А



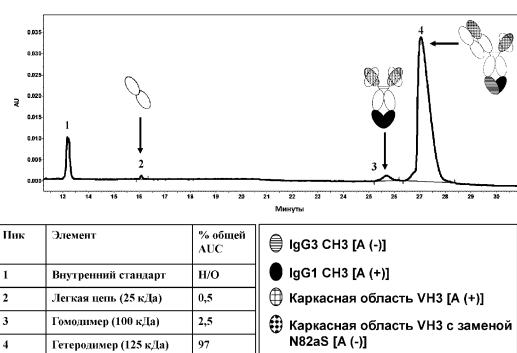
Фиг. 12В



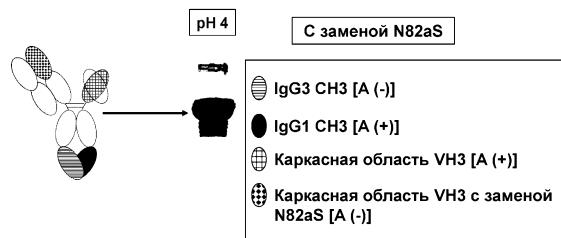
Фиг. 12С



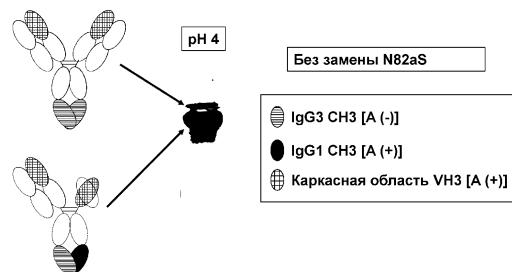
Фиг. 13



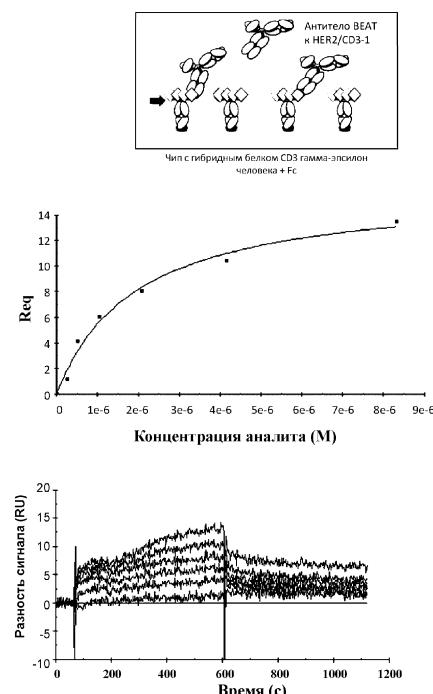
Фиг. 14



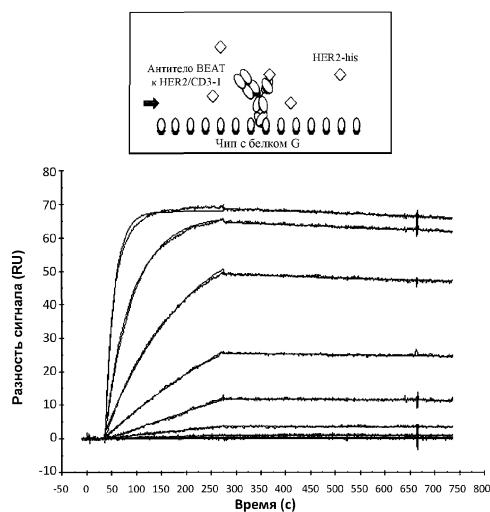
Фиг. 15А



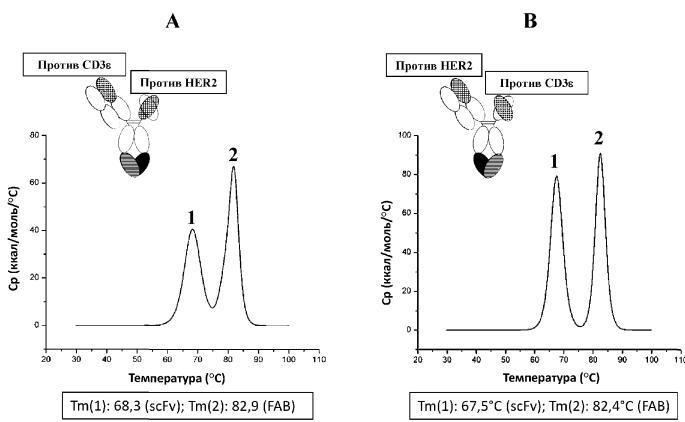
Фиг. 15В



Фиг. 16А

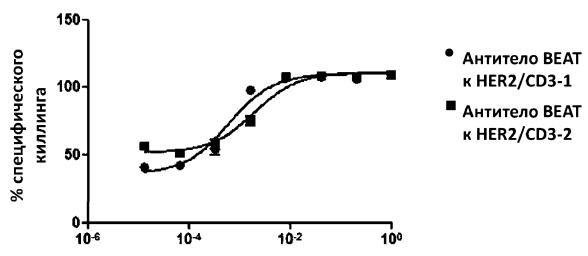


Фиг. 16Б



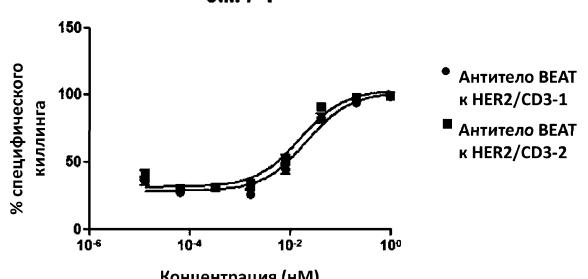
Фиг. 16С

BT-474



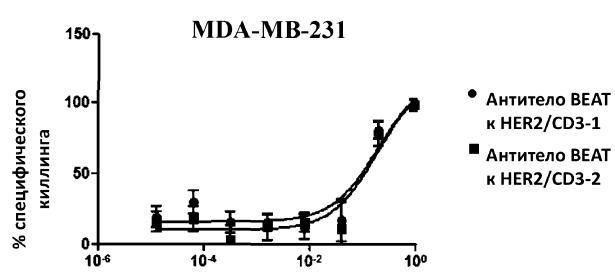
Фиг. 17А

JIMT-1



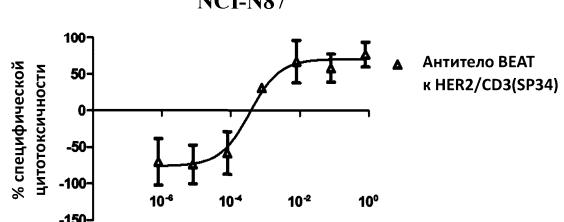
Фиг. 17В

MDA-MB-231



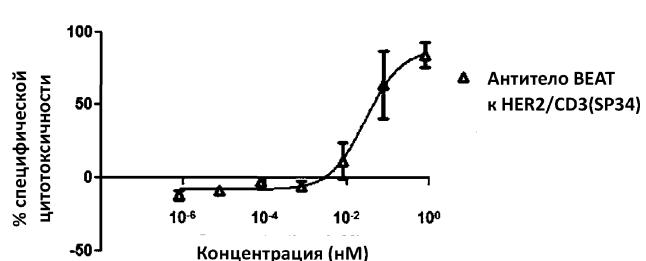
Фиг. 17С

NCI-N87



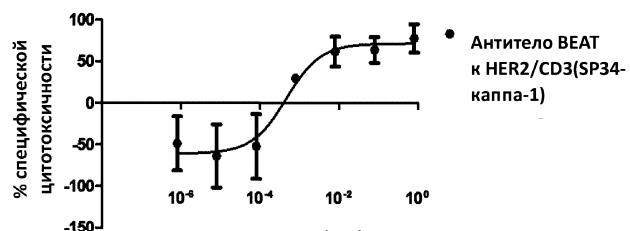
Фиг. 17Д

HT-1080



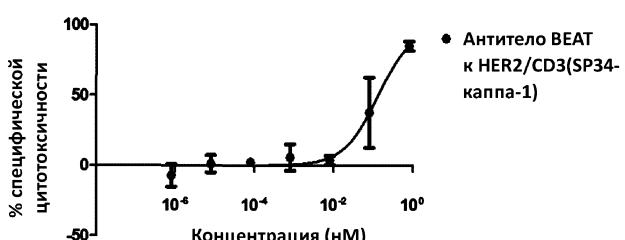
Фиг. 17Е

NCI-N87

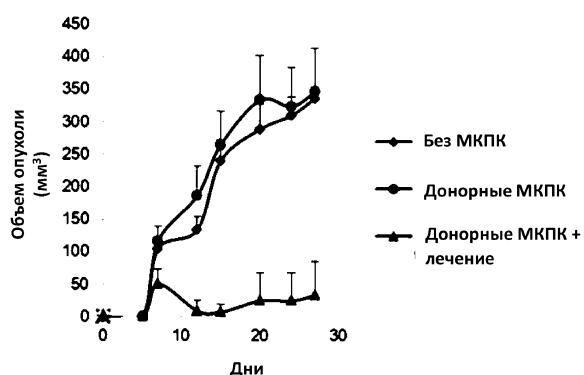


Фиг. 17F

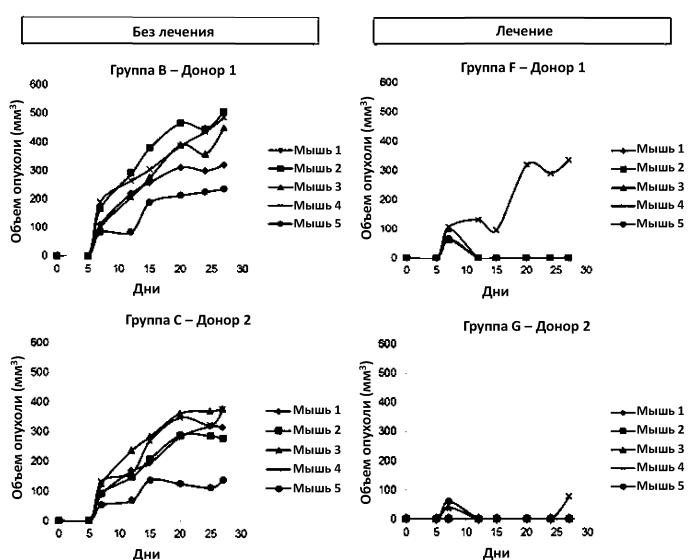
HT-1080



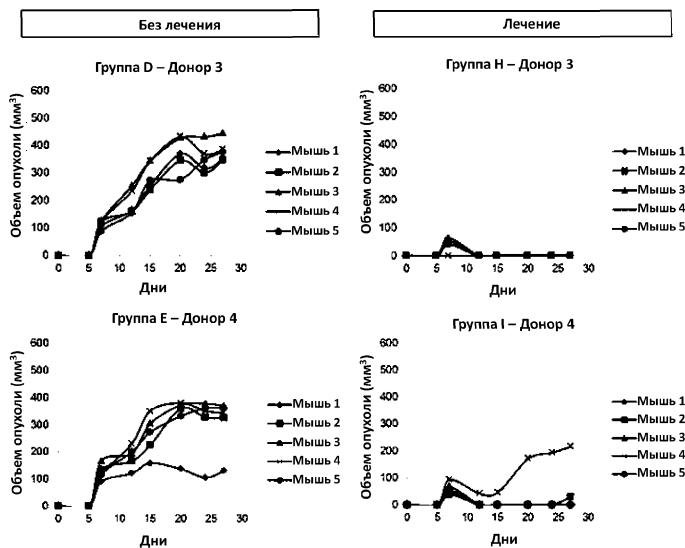
Фиг. 17G



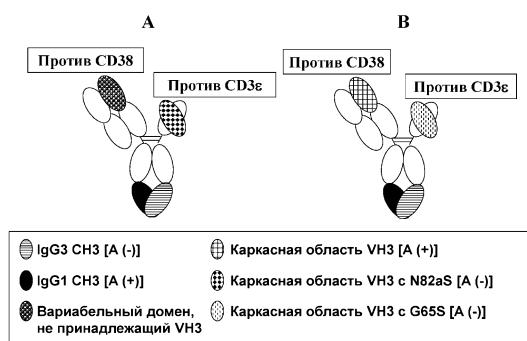
Фиг. 18А



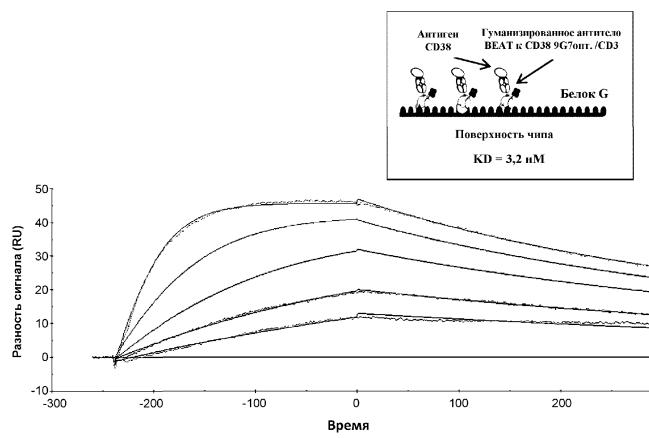
Фиг. 18В



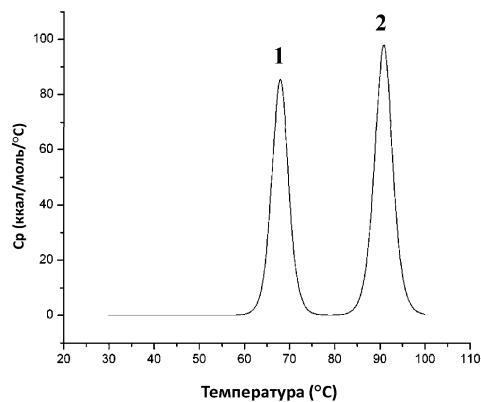
Фиг. 18С



Фиг. 19



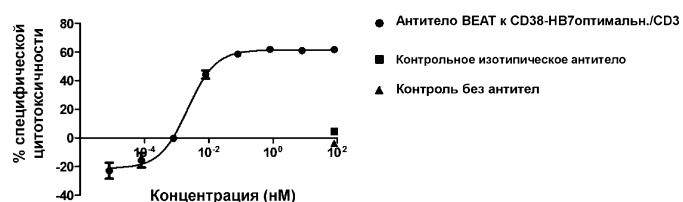
Фиг. 20А



Tm(1): 67,9°C (scFv); Tm(2): 90,8°C (FAB)

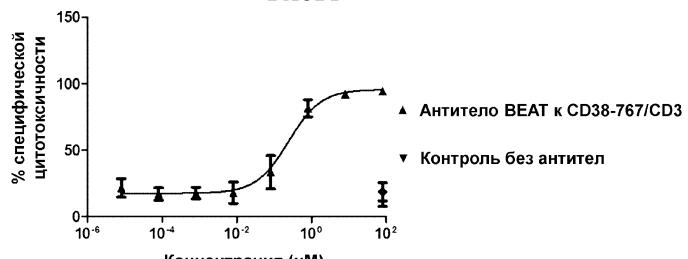
Фиг. 20В

RPMI 8226

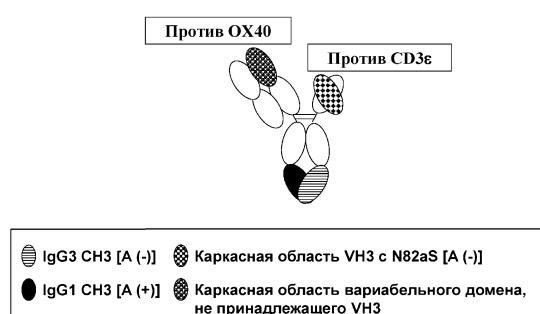


Фиг. 21

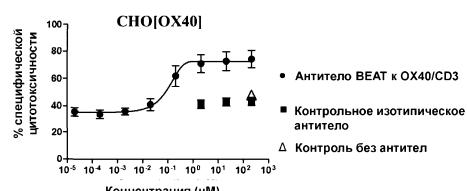
DAUDI



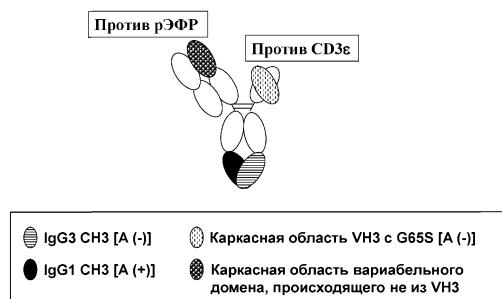
Фиг. 22



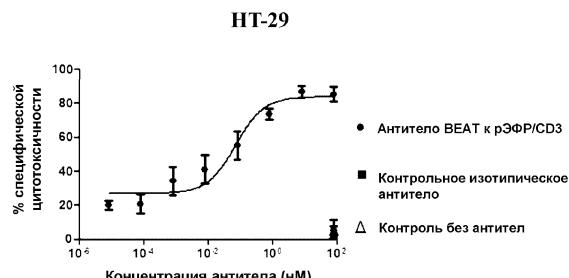
Фиг. 23



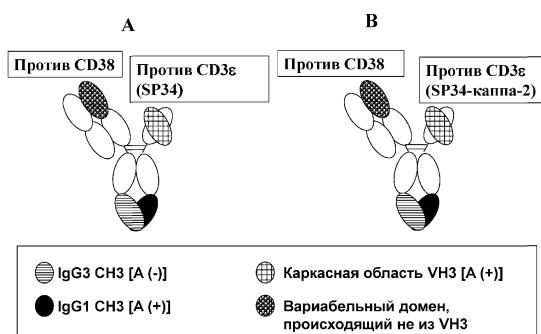
Фиг. 24



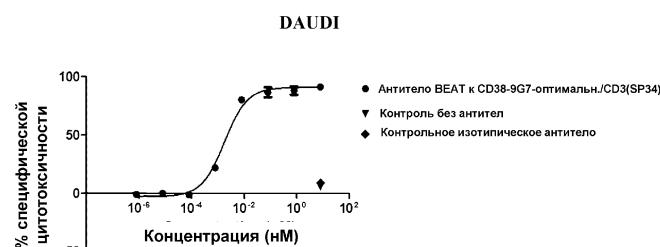
Фиг. 25



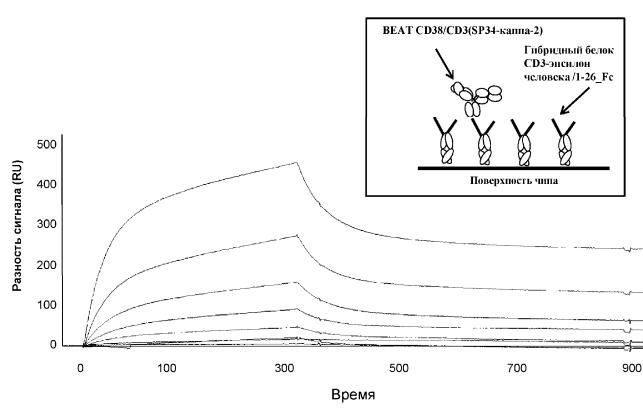
Фиг. 26



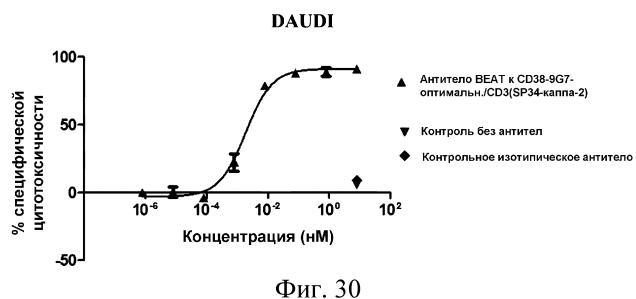
Фиг. 27



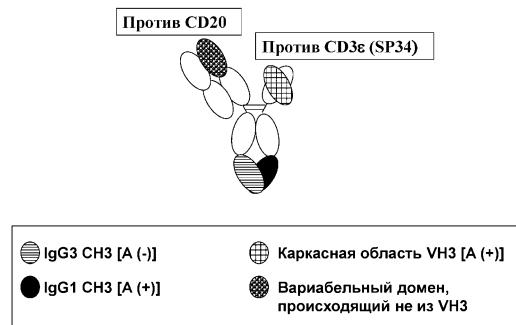
Фиг. 28



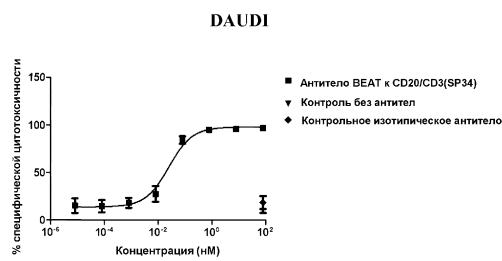
Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2