

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201992692** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.04.29

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 47/48* (2006.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.05.11

(54) **НАЦЕЛЕННЫЕ НА MSLN ТРИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/505,747; 62/657,434

(32) 2017.05.12; 2018.04.13

(33) US

(86) PCT/US2018/032427

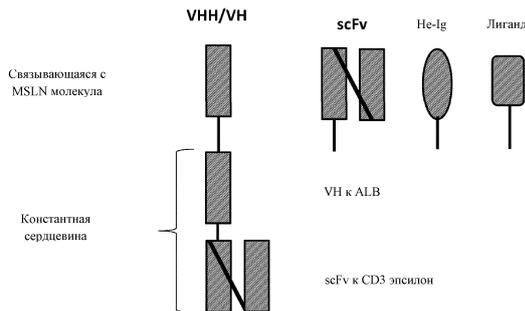
(87) WO 2018/209304 2018.11.15

(71) Заявитель:  
**ХАРПУН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.**  
(US)

(72) Изобретатель:  
**Веше Хольгер, Лемон Брайан Д.,  
Остин Ричард Дж., Дабридж Роберт Б.**  
(US)

(74) Представитель:  
**Строкова О.В., Глухарёва А.О., Лыгу  
Т.Н., Угрюмов В.М., Христофоров  
А.А., Гизатуллина Е.М., Гизатуллин  
Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Лебедев  
В.В., Парамонова К.В.** (RU)

(57) В настоящем документе предусмотрены нацеленные на мезотелин (MSLN) триспецифические белки, содержащие домен, связывающийся с CD3, домен продления периода полужизни и домен, связывающийся с MSLN. Также предусмотрены их фармацевтические композиции, а также нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии и клетки-хозяева для создания таких нацеленных на MSLN триспецифических белков. Также раскрыты способы применения раскрытых нацеленных на MSLN триспецифических белков в профилактике и/или лечении заболеваний, состояний и нарушений.



**A1**

**201992692**

**201992692**

**A1**

# **НАЦЕЛЕННЫЕ НА MSLN ТРИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Ссылка**

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/505747, поданной 12 мая 2017 г., и 62/657434, поданной 13 апреля 2018 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

### **Перечень последовательностей**

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 11 мая 2018 г., характеризуется именем 47517-720\_601\_SL.txt и размером 293251 байт.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Селективное разрушение отдельной клетки или определенного типа клеток часто желательно в различных клинических ситуациях. Например, основной целью терапии рака является специфическое разрушение опухолевых клеток, в то же время оставляя здоровые клетки и ткани нетронутыми и неповрежденными. Одним из таких способов является индукция иммунного ответа против опухоли, заставляющая иммунные эффекторные клетки, такие как клетки натуральные киллеры (NK) или цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), атаковать и разрушать опухолевые клетки.

Мезотелин (MSLN) представляет собой связанный с GPI мембраносвязанный опухолевый антиген. MSLN сверхэкспрессируется при раке яичников, поджелудочной железы, легких и тройном негативном раке молочной железы и мезотелиоме. Нормальная тканевая экспрессия MSLN ограничивается одноклеточными мезотелиальными слоями, выстилающими плевральную, перикардальную и брюшную полости. Сверхэкспрессия MSLN связана с плохим прогнозом при аденокарциноме легких и тройном негативном раке молочной железы. MSLN использовали в качестве ракового антигена для многочисленных способов воздействия, включая в себя иммунотоксины, вакцины, конъюгаты антител с лекарственными средствами и клетки CAR-T. Ранние признаки клинической эффективности подтвердили, что MSLN является мишенью, но для лечения

экспрессирующих MSLN форм рака необходимы способы лечения с улучшенной эффективностью.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен связывающий мезотелин триспецифический белок, причем указанный белок содержит

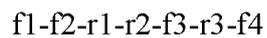
(a) первый домен (A), который специфически связывается с CD3 человека;

(b) второй домен (B), который представляет собой домен продления периода полужизни; а также

(c) третий домен (C), который специфически связывается с MSLN,

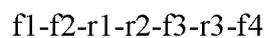
причем домены связаны в следующем порядке: H<sub>2</sub>N-(A)-(C)-(B)-COOH, H<sub>2</sub>N-(B)-(A)-(C)-COOH, H<sub>2</sub>N-(C)-(B)-(A)-COOH или с помощью линкеров L1 и L2. Согласно некоторым вариантам осуществления первый домен содержит переменный легкий домен и переменный тяжелый домен, каждый из которых способен специфически связываться с CD3 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления первый домен является гуманизированным или человеческим. Согласно некоторым вариантам осуществления второй домен связывает альбумин. Согласно некоторым вариантам осуществления второй домен содержит scFv, переменный тяжелый домен (VH), переменный легкий домен (VL), пептид, лиганд или небольшую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления третий домен содержит домен VHH, scFv, домен VH, домен VL, домен не-Ig, лиганд, ноттин или низкомолекулярный объект, который специфически связывается с MSLN. Согласно некоторым вариантам осуществления третий домен содержит домен VHH. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит одну или более консервативных областей, содержащих последовательность, идентичную SEQ ID NO: 41, 42, 43 или 44 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 41 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 42 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 43 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит консервативный

домен, содержащий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 44 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит (i) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 41; (ii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 42; (iii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 43; и (iv) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 44. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH характеризуется следующей формулой:



где r1 идентичен SEQ ID NO: 51 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее; r2 идентичен SEQ ID NO: 52 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее и r3 идентичен SEQ ID NO: 53 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее и где f1, f2, f3 и f4 представляют собой каркасные остатки. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-29. Согласно некоторым вариантам осуществления третий домен содержит выбранную последовательность из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-29. Согласно некоторым вариантам осуществления третий домен представляет собой гуманизированный домен VHH. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный гуманизированный домен VHH содержит одну или более консервативных областей, содержащих последовательность, идентичную SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 или 50 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 45 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 46 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 47 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 48 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий

последовательность, идентичную SEQ ID NO: 49 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 50 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный домен VHH содержит (i) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 45; (ii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 46; (iii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 47, (iv) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 48, (v) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 49, и (vi) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 50. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный гуманизированный домен VHH характеризуется следующей формулой:



где r1 идентичен SEQ ID NO: 54 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее; r2 идентичен SEQ ID NO: 55 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее и r3 идентичен SEQ ID NO: 56 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее и где f1, f2, f3 и f4 представляют собой каркасные остатки. Согласно некоторым вариантам осуществления третий домен содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30-40 и 102-105. Согласно некоторым вариантам осуществления третий домен связывается с белком мезотелина человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым вариантам осуществления третий домен связывается с эпитопом мезотелина, причем указанный эпитоп расположен в области I, содержащей аминокислотные остатки 296-390 из SEQ ID NO: 57, области II, содержащей аминокислотный остаток 391-486 из SEQ ID NO: 57, или области III, содержащей аминокислотные остатки 487-598 из SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый из линкеров L1 и L2 независимо выбран из  $(GS)_n$  (SEQ ID NO: 87),  $(GGS)_n$  (SEQ ID NO: 88),  $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO: 89),  $(GGSG)_n$  (SEQ ID NO: 90),  $(GGSGG)_n$  (SEQ ID NO: 91) или  $(GGGGS)_n$  (SEQ ID NO: 92), где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый из линкеров L1 и L2 независимо представляет собой  $(GGGGS)_4$  (SEQ ID NO: 95) или  $(GGGGS)_3$  (SEQ ID NO: 96). Согласно некоторым вариантам осуществления домены связаны в следующем порядке:  $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ . Согласно некоторым вариантам осуществления белок составляет менее чем приблизительно 80 кДа. Согласно некоторым вариантам осуществления белок составляет от приблизительно 50 до приблизительно 75 кДа. Согласно некоторым вариантам

осуществления белок составляет менее чем приблизительно 60 кДа. Согласно некоторым вариантам осуществления белок характеризуется периодом полувыведения по меньшей мере приблизительно 50 часов. Согласно некоторым вариантам осуществления белок характеризуется периодом полувыведения по меньшей мере приблизительно 100 часов. Согласно некоторым вариантам осуществления белок характеризуется повышенным проникновением в ткани по сравнению с IgG для того же MSLN. Согласно некоторым вариантам осуществления белок содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101. Согласно одному варианту осуществления предусмотрен связывающий мезотелин триспецифический белок, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98. Согласно одному варианту осуществления предусмотрен связывающий мезотелин триспецифический белок, причем указанный белок содержит: (a) первый домен (A), который специфически связывается с CD3 человека; (b) второй домен (B), который представляет собой домен продления периода полужизни; и (c) третий домен (C), который специфически связывается с MSLN, причем домены связаны в следующем порядке: H<sub>2</sub>N-(A)-(C)-(B)-COOH, H<sub>2</sub>N-(B)-(A)-(C)-COOH, H<sub>2</sub>N-(C)-(B)-(A)-COOH или линкерами L1 и L2, причем указанный третий домен содержит одну или более последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 51-56 и 106-222. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный третий домен содержит CDR1, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 51, 54 и 106-144. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный третий домен содержит CDR2, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 52, 55 и 145-183. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный третий домен содержит CDR2, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 53, 56 и 184-222. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный третий домен содержит каркасную область 1 (f1), содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 262-300. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный третий домен содержит последовательность каркасной области (f2), представленную в любой из SEQ ID NO: 301-339. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный третий домен содержит последовательность каркасной области (f3), представленную в любой из SEQ ID NO: 340-378. Согласно некоторым вариантам осуществления белок содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101. Согласно некоторым вариантам осуществления белок содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая (i) связывающий MSLN триспецифический белок в соответствии

с любым из приведенных выше вариантов осуществления и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно еще одному варианту осуществления предусмотрен процесс получения связывающего мезотелин триспецифического белка в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления, причем указанный процесс предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающий мезотелин триспецифический белок в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления в условиях, позволяющих экспрессию связывающего мезотелин триспецифического белка и выделение и очистку полученного белка из культуры.

Согласно одному варианту осуществления предложен способ лечения или ослабления пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение связывающего мезотелин триспецифического белка в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления нуждающемуся в этом субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение средства в комбинации с однодоменным связывающим мезотелин белком в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий мезотелин триспецифический белок селективно связывается с опухолевыми клетками, экспрессирующими мезотелин. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий мезотелин триспецифический белок обеспечивает уничтожение Т-клетками экспрессирующих мезотелин опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевое заболевание включает в себя заболевание солидной опухолью. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание солидной опухолью включает в себя мезотелиому, рак легкого, рак желудка, рак яичника или тройной негативный рак молочной железы. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание солидной опухолью является метастатическим.

Согласно одному варианту осуществления предложен способ лечения или ослабления пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение связывающего мезотелин триспецифического белка, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий мезотелин триспецифический белок селективно связывается с экспрессирующими мезотелин опухолевыми клетками. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий

мезотелин триспецифический белок направляет уничтожение Т-клетками экспрессирующих мезотелин опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевое заболевание включает в себя заболевание солидной опухолью. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание солидной опухолью включает в себя мезотелиому, рак легкого, рак желудка, рак яичника или тройной негативный рак молочной железы. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание солидной опухолью является метастатическим.

Согласно одному варианту осуществления предложен способ лечения или ослабления пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение связывающего мезотелин триспецифического белка, содержащего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение связывающего мезотелин триспецифического белка в дозе до 10 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления белок вводят один раз в неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления белок вводят два раза в неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления белок вводят каждую вторую неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления белок вводят каждые три недели.

### **Включение по ссылке**

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки и как если бы они были полностью изложены.

### **Краткое описание графических материалов**

Новые особенности настоящего изобретения изложены с особым вниманием в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание особенностей и преимуществ настоящего изобретения будет получено со ссылкой на следующее подробное описание, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения, и прилагаемые графические материалы:

**Фиг. 1** представляет собой схематическое изображение иллюстративного нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка, причем белок содержит константный сердцевинный элемент, содержащий анти-CD3ε одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) и анти-ALB переменную область тяжелой цепи; и

связывающий анти-MSLN домен, который может представлять собой VHH, VH, scFv, связывающую молекулу не-Ig или лиганд.

На **фиг. 2** показана эффективность иллюстративных молекул TriTAC (2A2 и 2A4) в уничтожении клеток OVCAR8, которые экспрессируют белок-мишень MSLN.

На **фиг. 3** показано, что иллюстративная молекула TriTAC по настоящему раскрытию (MH6T TriTAC) была способна направлять Т-клетки от пяти доноров (донор 02; донор 86; донор 41; донор 81 и донор 35) на уничтожение клеток Саov3. На фигуре также показано, что контрольная молекула TriTAC (GFP TriTAC) не была способна направлять Т-клетки от пяти доноров (донор 02; донор 86; донор 41; донор 81 и донор 35) на уничтожение клеток Саov3.

На **фиг. 4** показано, что иллюстративная молекула TriTAC по настоящему раскрытию (MH6T TriTAC) была способна направлять Т-клетки от пяти доноров (донор 02; донор 86; донор 41; донор 81 и донор 35) на уничтожение клеток OVCAR3. На фигуре также показано, что контрольная молекула TriTAC (GFP TriTAC) не была способна направлять Т-клетки от пяти доноров (донор 02; донор 86; донор 41; донор 81 и донор 35) на уничтожение клеток OVCAR3.

На **фиг. 5** показано, что иллюстративная молекула TriTAC по настоящему раскрытию (MH6T TriTAC) была способна направлять Т-клетки от здорового донора на уничтожение клеток, которые экспрессируют MSLN (клетки OVCAR3; клетки Саov4; клетки OVCAR3 и клетки OVCAR8). На фигуре также показано, что MH6T TriTAC не была способна направлять Т-клетки от здорового донора на уничтожение клеток, которые не экспрессируют MSLN (клетки MDAPCa2b и клетки NCI-H510A).

На **фиг. 6** показано, что иллюстративная молекула TriTAC по настоящему раскрытию (MH6T TriTAC) была способна направлять Т-клетки от яванских макаков на уничтожение раковых клеток яичника человека (клетки OVCAR3; клетки Саov3). На фигуре также показано, что контрольная молекула TriTAC (GFP TriTAC) не была способна направлять Т-клетки от яванских макаков на уничтожение клеточных линий рака яичника человека (клетки OVCAR3; клетки Саov3).

На **фиг. 7** показано, что иллюстративная молекула TriTAC по настоящему раскрытию (MH6T TriTAC) была способна направлять уничтожение экспрессирующих MSLN клеток мезотелиомы NCI-H2052 с помощью Т-клеток в присутствии сывороточного альбумина человека (HSA) или в его отсутствие.

На **фиг. 8** показано, что иллюстративная молекула TriTAC по настоящему раскрытию (MH6T TriTAC) была способна активировать Т-клетки от четырех здоровых

доноров (донор 2; донор 86; донор 35; и донор 81), как продемонстрировано секрецией TNF- $\alpha$  из Т-клеток, в присутствии МН6Т TriTAC и экспрессирующих MSLN клеток Caov4.

На **фиг. 9** показано, что иллюстративная молекула TriTAC по настоящему раскрытию (МН6Т TriTAC) была способна активировать Т-клетки от четырех здоровых доноров (донор 2; донор 86; донор 35 и донор 81), что продемонстрировано активацией экспрессии CD69 на Т-клетках в присутствии МН6Т TriTAC и экспрессирующих MSLN клеток OVCAR8.

На **фиг. 10** показано связывание иллюстративной молекулы TriTAC по настоящему раскрытию (МН6Т TriTAC) с линиями экспрессирующих MSLN клеток или линиями клеток, не экспрессирующих MSLN. На **фиг. 10А** показано связывание МН6Т TriTAC с экспрессирующими MSLN клетками (клетки Caov3 - верхняя левая панель; клетки Caov4 - верхняя правая панель; клетки OVCAR3 - нижняя левая панель; клетки OVCAR8 - нижняя правая панель); на **фиг. 10А** дополнительно показано отсутствие связывания контрольной TriTAC (GFP TriTAC) с теми же клеточными линиями. На **фиг. 10В** показано отсутствие связывания как МН6Т TriTAC, так и GFP TriTAC с линиями не экспрессирующих MSLN клеток (клетки MDCA2b на левой панели; клетки NCI-H510A на правой панели).

На **фиг. 11** показано связывание иллюстративной молекулы TriTAC по настоящему раскрытию (МН6Т) с Т-клетками от четырех здоровых доноров (донор 2 - верхняя левая панель; донор 35 - верхняя правая панель; донор 41 - нижняя левая панель; донор 81 - нижняя правая панель).

На **фиг. 12** показано, что иллюстративная молекула TriTAC по настоящему раскрытию (МН6Т TriTAC) была способна ингибировать рост опухоли у мышей NCG, которым имплантированы экспрессирующие MSLN клетки NCI-H292.

На **фиг. 13** показан фармакокинетический профиль иллюстративной молекулы TriTAC по настоящему раскрытию, МН6Т TriTAC. На графике показано содержание в сыворотке молекулы МН6Т TriTAC по настоящему раскрытию в различные моменты времени после инъекции двум яванским макакам.

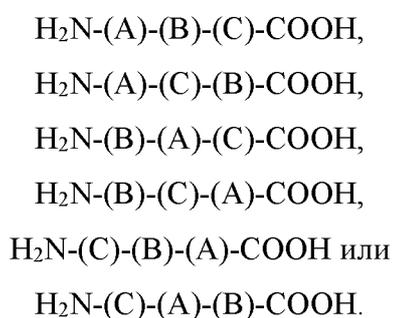
На **фиг. 14** показаны результаты измерений аффинности связывания двух иллюстративных триспецифических молекул по настоящему раскрытию, TriTAC 74 и TriTAC 75, и значения  $EC_{50}$  для уничтожения клеток SKOV3 и OVCAR двумя молекулами TriTAC.

На **фиг. 15** показаны фармакокинетические профили двух иллюстративных молекул TriTAC по настоящему раскрытию, TriTAC 75 и TriTAC 74. На графике показано содержание в сыворотке молекул TriTAC в различные моменты времени после инъекции яванским макакам.

### **Подробное описание настоящего изобретения**

В настоящем документе предусмотрены триспецифические белки, которые нацелены на мезотелин (MSLN), их фармацевтические композиции, а также нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения таких белков. Также представлены способы применения раскрытых нацеленных на MSLN триспецифических белков для профилактики и/или лечения заболеваний, состояний и нарушений. Нацеленные на MSLN триспецифические белки способны специфически связываться с MSLN, а также с CD3 и содержат домен продления периода полужизни, такой как домен связывания с человеческим альбумином (ALB). На фиг. 1 показан один неограничивающий пример триспецифического связывающего MSLN белка.

Согласно одному аспекту нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат домен (A), который специфически связывается с CD3, домен (B), который специфически связывается с человеческим альбумином (ALB), и домен (C), который специфически связывается с MSLN. Три домена в нацеленных на MSLN триспецифических белках расположены в любом порядке. Таким образом, предполагается, что порядок доменов нацеленных на MSLN триспецифических белков представляет собой:



Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются порядком доменов  $\text{H}_2\text{N}-(\text{A})-(\text{B})-(\text{C})-\text{COOH}$ . Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются порядком доменов  $\text{H}_2\text{N}-(\text{A})-(\text{C})-(\text{B})-\text{COOH}$ . Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются порядком доменов  $\text{H}_2\text{N}-(\text{B})-(\text{A})-(\text{C})-\text{COOH}$ . Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются порядком доменов  $\text{H}_2\text{N}-(\text{B})-(\text{C})-(\text{A})-\text{COOH}$ . Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются порядком доменов  $\text{H}_2\text{N}-(\text{C})-(\text{B})-(\text{A})-\text{COOH}$ . Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются порядком доменов  $\text{H}_2\text{N}-(\text{C})-(\text{A})-(\text{B})-\text{COOH}$ .

Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат связывающий HSA домен в качестве среднего домена, так что порядок доменов составляет H<sub>2</sub>N-(A)-(B)-(C)-COOH или H<sub>2</sub>N-(C)-(B)-(A)-COOH. Предполагается, что согласно таким вариантам осуществления, где связывающий ALB домен представлен в качестве среднего домена, связывающие домены CD3 и MSLN характеризуются дополнительной гибкостью для связывания с их соответствующими мишенями.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат полипептид, характеризующийся последовательностью, описанной в таблице 1 (SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101), и ее подпоследовательностями. Согласно некоторым вариантам осуществления триспецифический антигенсвязывающий белок содержит полипептид, характеризующийся гомологией, составляющей по меньшей мере 70-95% или более по отношению к последовательности, описанной в таблице 1 (SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101). Согласно некоторым вариантам осуществления триспецифический антигенсвязывающий белок содержит полипептид, характеризующийся гомологией, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более по отношению к последовательности, описанной в таблице 1 (SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101).

Описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки предназначены для обеспечения специфического нацеливания на экспрессирующие MSLN клетки путем рекрутинга цитотоксических Т-клеток. Это улучшает эффективность по сравнению с ADCC (антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью), которая использует полноразмерные антитела, направленные на единственный антиген, и не способна напрямую рекрутировать цитотоксические Т-клетки. Напротив, путем вовлечения молекул CD3, экспрессируемых конкретно в этих клетках, нацеленные на MSLN триспецифические белки могут сшивать цитотоксические Т-клетки с экспрессирующими MSLN клетками высокоспецифическим образом, тем самым направляя цитотоксический потенциал Т-клетки в направлении клетки-мишени. Описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки вовлекают цитотоксические Т-клетки посредством связывания с экспрессируемыми на поверхности белками CD3, которые образуют часть TCR. Одновременное связывание нескольких триспецифических антигенсвязывающих белков MSLN с CD3 и с MSLN, экспрессируемыми на поверхности отдельных клеток, вызывает активацию Т-клеток и опосредует последующий лизис конкретной экспрессирующей MSLN клетки. Таким образом, предполагается, что нацеленные на MSLN триспецифические белки

демонстрируют сильное, специфическое и эффективное уничтожение клеток-мишеней. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки стимулируют уничтожение клеток-мишеней цитотоксическими Т-клетками для уничтожения патогенных клеток (например, экспрессирующих MSLN опухолевых клеток). Согласно некоторым из таких вариантов осуществления клетки избирательно удаляются, тем самым снижая вероятность токсических побочных эффектов.

Описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки придают дополнительные терапевтические преимущества по сравнению с традиционными моноклональными антителами и другими более мелкими биспецифическими молекулами. Как правило, эффективность фармацевтических препаратов с рекомбинантным белком сильно зависит от внутренней фармакокинетики самого белка. Одним из таких преимуществ в настоящем документе является то, что описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются увеличенным временем фармакокинетической элиминации благодаря наличию домена продления периода полужизни, такого как специфический для HSA домен. В этом отношении описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются увеличенным временем полувыведения из сыворотки, составляющим приблизительно два, три, приблизительно пять, приблизительно семь, приблизительно 10, приблизительно 12 или приблизительно 14 дней согласно некоторым вариантам осуществления. Это контрастирует с другими связывающими белками, такими как молекулы ViTE или DART, которые характеризуются относительно значительно более коротким временем выведения. Например, биспецифическая слитая молекула ViTE CD19×CD3 scFv-scFv требует непрерывной доставки лекарственного средства посредством внутривенной инфузии (в/в) из-за ее короткого периода полувыведения. Более длительные собственные периоды полувыведения для нацеленных на MSLN триспецифических белков решают эту проблему, тем самым обеспечивая повышенный терапевтический потенциал, такой как низкие дозы фармацевтических составов, уменьшенное периодическое введение и/или новые фармацевтические композиции.

Описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки также характеризуются оптимальным размером для улучшенного проникновения в ткань и распределения в ткани. Большие размеры ограничивают или предотвращают проникновение или распределение белка в тканях-мишенях. Описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки избегают этого благодаря небольшому размеру, который обеспечивает улучшенное проникновение и распределение

в ткани. Соответственно, описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки согласно некоторым вариантам осуществления характеризуются размером от приблизительно 50 кДа до приблизительно 80 кДа, от приблизительно 50 кДа до приблизительно 75 кДа, от приблизительно 50 кДа до приблизительно 70 кДа или от приблизительно 50 кДа до приблизительно 65 кДа. Таким образом, размер нацеленных на MSLN триспецифических белков является преимущественным по сравнению с антителами IgG, которые составляют приблизительно 150 кДа, и молекулами диатела ViTE и DART, которые составляют приблизительно 55 кДа, но не характеризуются увеличенным временем полужизни и, следовательно, быстро выводятся через почку.

Согласно другим вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются оптимальным размером для улучшенного проникновения и распределения в ткани. Согласно этим вариантам осуществления нацеленные на MSLN триспецифические белки конструируют так, чтобы они были как можно меньше, при этом сохраняя специфичность по отношению к своим мишеням. Соответственно, согласно этим вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются размером от приблизительно 20 кДа до приблизительно 40 кДа или от приблизительно 25 кДа до приблизительно 35 кДа, до приблизительно 40 кДа, до приблизительно 45 кДа, до приблизительно 50 кДа, до приблизительно 55 кДа, до приблизительно 60 кДа, до приблизительно 65 кДа. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются размером приблизительно 50 кДа, 49 кДа, 48 кДа, 47 кДа, 46 кДа, 45 кДа, 44 кДа, 43 кДа, 42 кДа, 41 кДа, 40 кДа, приблизительно 39 кДа, приблизительно 38 кДа, приблизительно 37 кДа, приблизительно 36 кДа, приблизительно 35 кДа, приблизительно 34 кДа, приблизительно 33 кДа, приблизительно 32 кДа, приблизительно 31 кДа, приблизительно 30 кДа, приблизительно 29 кДа, приблизительно 28 кДа, приблизительно 27 кДа, приблизительно 26 кДа, приблизительно 25 кДа, приблизительно 24 кДа, приблизительно 23 кДа, приблизительно 22 кДа, приблизительно 21 кДа или приблизительно 20 кДа. Иллюстративный подход к малому размеру заключается в использовании фрагментов однодоменного антитела (sdAb) для каждого из доменов. Например, конкретный триспецифический антигенсвязывающий белок MSLN содержит sdAb к CD3, sdAb к ALB и sdAb для MSLN. Это уменьшает размер иллюстративного триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN до менее чем 60 кДа. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления все домены нацеленных на MSLN триспецифических белков представляют собой все фрагменты однодоменного антитела (sdAb). Согласно

другим вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат связующие молекулы низкой молекулярной массы (SME) для ALB и/или MSLN. Связующие молекулы SME представляют собой небольшие молекулы в среднем размером от 500 до 2000 Да и они прикрепляются к нацеленным на MSLN триспецифическим белкам известными способами, такими как лигация или конъюгация сортазой. В этих случаях одним из доменов триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN является последовательность распознавания сортазой, например, LPETG (SEQ ID NO: 97). Чтобы присоединить связующую молекулу SME к триспецифическому антигенсвязывающему белку MSLN с последовательностью распознавания сортазой, белок инкубируют с сортазой и связующей молекулой SME, посредством чего сортаза присоединяет связующую молекулу SME к последовательности распознавания. Известные связующие молекулы SME включают в себя MIP-1072 и MIP-1095, которые связываются с мезотелином. Согласно еще другим вариантам осуществления домен, который связывается с MSLN нацеленных на MSLN триспецифических белков, описанных в настоящем документе, содержит пептид ноттин для связывания MSLN. Ноттины представляют собой стабилизированные дисульфидом пептиды с каркасом цистеинового узла и имеют средние размеры приблизительно 3,5 кДа. Предполагалось, что ноттины связываются с определенными молекулами опухоли, такими как MSLN. Согласно другим вариантам осуществления домен, который связывается с MSLN описанных в настоящем документе нацеленных на MSLN триспецифических белков, содержит природный MSLN.

Другая особенность описанных в настоящем документе нацеленных на MSLN триспецифических белков заключается в том, что они представляют собой конструкцию из одного полипептида с гибкой связью их доменов. Это позволяет легко производить и изготавливать нацеленные на MSLN триспецифические белки, поскольку они могут кодироваться одной молекулой кДНК и легко включаться в вектор. Кроме того, поскольку описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки представляют собой мономерную одиночную полипептидную цепь, нет проблем спаривания цепей или необходимости димеризации. Предполагается, что описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки характеризуются пониженной тенденцией к агрегации в отличие от других известных молекул, таких как биспецифические белки с доменами Fc-гамма-иммуноглобулина.

В описанных в настоящем документе нацеленных на MSLN триспецифических белках домены связаны внутренними линкерами L1 и L2, где L1 связывает первый и второй домен нацеленных на MSLN триспецифических белков, а L2 связывает второй и третий

домены нацеленных на MSLN триспецифических белков. Линкеры L1 и L2 характеризуются оптимизированной длиной и/или аминокислотным составом. Согласно некоторым вариантам осуществления линкеры L1 и L2 характеризуются одинаковой длиной и аминокислотным составом. Согласно другим вариантам осуществления L1 и L2 различны. Согласно некоторым вариантам осуществления внутренние линкеры L1 и/или L2 являются «короткими», т.е. состоят из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков. Таким образом, в некоторых случаях внутренние линкеры состоят приблизительно из 12 или менее аминокислотных остатков. В случае 0 аминокислотных остатков внутренний линкер представляет собой пептидную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления внутренние линкеры L1 и/или L2 являются «длинными», т.е. состоят из 15, 20 или 25 аминокислотных остатков. Согласно некоторым вариантам осуществления эти внутренние линкеры состоят из от приблизительно 3 до приблизительно 15, например, 8, 9 или 10 смежных аминокислотных остатков. Что касается аминокислотного состава внутренних линкеров L1 и L2, пептиды отбираются со свойствами, которые придают гибкость нацеленным на MSLN триспецифическим белкам, не влияют на связывающие домены, а также противостоят расщеплению от протеаз. Например, остатки глицина и серина, как правило, обеспечивают устойчивость к протеазам. Примеры внутренних линкеров, подходящих для связывания доменов в нацеленных на MSLN триспецифических белках включают в себя, без ограничения,  $(GS)_n$  (SEQ ID NO: 87),  $(GGS)_n$  (SEQ ID NO: 88),  $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO: 89),  $(GGSG)_n$  (SEQ ID NO: 90),  $(GGSGG)_n$  (SEQ ID NO: 91),  $(GGGGS)_n$  (SEQ ID NO: 92),  $(GGGGG)_n$  (SEQ ID NO: 93) или  $(GGG)_n$  (SEQ ID NO: 94), где  $n$  равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Согласно одному варианту осуществления внутренний линкер L1 и/или L2 представляет собой  $(GGGGS)_4$  (SEQ ID NO: 95) или  $(GGGGS)_3$  (SEQ ID NO: 96).

### **CD3-связывающий домен**

Специфичность ответа Т-клеток опосредуется узнаванием антигена (отображенного в контексте основного комплекса гистосовместимости, МНС) с помощью TCR. Как часть TCR, CD3 представляет собой белковый комплекс, который включает в себя цепь CD3 $\gamma$  (гамма), цепь CD3 $\delta$  (дельта) и две цепи CD3 $\epsilon$  (эпсилон), которые присутствуют на поверхности клетки. CD3 ассоциируется с  $\alpha$  (альфа) и  $\beta$  (бета) цепями TCR, а также с CD3 $\zeta$  (дзета) в целом, образуя полный TCR. Кластеризация CD3 на Т-клетках, например, с помощью иммобилизованных антител к CD3, приводит к активации Т-клеток, сходной с вовлечением рецептора Т-клеток, но не зависящей от его клон-типичной специфичности.

Согласно одному аспекту описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат домен, который специфически связывается с CD3.

Согласно одному аспекту описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат домен, который специфически связывается с CD3 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат домен, который специфически связывается с CD3 $\gamma$ . Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат домен, который специфически связывается с CD3 $\delta$ . Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат домен, который специфически связывается с CD3 $\epsilon$ .

Согласно дополнительным вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат домен, который специфически связывается с TCR. В некоторых случаях описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат домен, который специфически связывается с  $\alpha$ -цепью TCR. В некоторых случаях описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат домен, который специфически связывается с  $\beta$ -цепью TCR.

Согласно определенным вариантам осуществления CD3-связывающий домен описанных в настоящем документе нацеленных на MSLN триспецифических белков проявляет не только сильную аффинность связывания CD3 к человеческим CD3, но также демонстрируют превосходную перекрестную реактивность с соответствующими белками CD3 яванского макака. В некоторых случаях CD3-связывающий домен нацеленных на MSLN триспецифических белков перекрестно реагирует с CD3 от яванского макака. В некоторых случаях отношение  $K_D$  человека к  $K_D$  яванского макака для CD3 составляет от 5 до 0,2.

Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN может представлять собой любой домен, который связывается с CD3, включая в себя, без ограничения, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, антитела человека, гуманизированного антитела. В некоторых случаях полезно, чтобы CD3-связывающий домен происходил из того же вида, в котором в конечном итоге будет использоваться триспецифический антигенсвязывающий белок MSLN. Например, для применения у людей для CD3-связывающего домена триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN может быть полезно содержать человеческие или гуманизированные остатки антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

Таким образом, согласно одному аспекту антигенсвязывающий домен содержит гуманизованное или человеческое антитело или фрагмент антитела или мышинное антитело или фрагмент антитела. Согласно одному варианту осуществления гуманизованный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит одну или более (например, все три) определяющих комплементарность областей 1 легкой цепи (LC CDR1), определяющих комплементарность областей 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющих комплементарность областей 3 легкой цепи (LC CDR3) гуманизованного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, описанного в настоящем документе, и/или одну или более (например, все три) определяющих комплементарность областей 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющих комплементарность областей 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющих комплементарность областей 3 тяжелой цепи (HC CDR3) гуманизованного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, описанного в настоящем документе, например, гуманизованный или человеческий анти-CD3-связывающий домен, содержащий одну или более, например, все три, LC-CDR, и одну или более, например, все три, CDR HC.

Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизованный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит переменную область гуманизованной или человеческой легкой цепи, специфическую для CD3, где переменная область легкой цепи, специфическая для CD3, содержит человеческую или отличную от человеческой CDR легкой цепи в каркасной области легкой цепи человека. В определенных случаях каркасная область легкой цепи представляет собой каркас легкой цепи  $\lambda$  (лямбда). В других случаях каркасная область легкой цепи представляет собой каркас легкой цепи  $\kappa$  (каппа).

Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизованный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит гуманизованную или переменную область тяжелой цепи человека, специфическую для CD3, где переменная область тяжелой цепи, специфическая для CD3, содержит человеческую или отличную от человеческой CDR тяжелой цепи в каркасной области тяжелой цепи человека.

В определенных случаях определяющие комплементарность области тяжелой цепи и/или легкой цепи получают из известных антител к CD3, таких как, например, муромонаб-CD3 (ОКТ3), отеликсизумаб (TRX4), теплизумаб (MGA031), висилизумаб (Nuvion), SP34, TR-66 или X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, ОКТ3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCNT-1 и WT-31.

Согласно одному варианту осуществления анти-CD3-связывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь представленной в настоящем документе аминокислотной последовательности. Используемый в настоящем документе термин «одноцепочечный переменный фрагмент» или «scFv» относится к фрагменту антитела, содержащему переменную область легкой цепи и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, причем переменные области легкой и тяжелой цепи непрерывно связаны через короткий гибкий полипептидный линкер и способны к экспрессии в виде одной полипептидной цепи, и причем scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого оно получено. Согласно одному варианту осуществления анти-CD3-связывающий домен содержит: переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более чем 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности представленной в настоящем документе переменной области легкой цепи, или последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей 95-99% по отношению к аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе; и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более чем 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности представленной в настоящем документе переменной области тяжелой цепи, или последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей 95-99% по отношению к аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен представляет собой scFv, и переменная область легкой цепи, содержащая описанную в настоящем документе аминокислотную последовательность, присоединяется к переменной области тяжелой цепи, содержащей описанную в настоящем документе аминокислотную последовательность, через scFv линкер. Переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи scFv могут находиться, например, в любой из следующих ориентаций: переменная область легкой цепи - линкер scFv - переменная область тяжелой цепи или переменная область тяжелой цепи - линкер scFv - переменная область легкой цепи.

В некоторых случаях scFv, которые связываются с CD3, получают в соответствии с известными способами. Например, молекулы scFv могут быть получены путем связывания

областей VH и VL вместе с использованием гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат линкер scFv (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотным составом. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления длина линкера scFv такова, что домен VH или VL может ассоциироваться межмолекулярно с другим переменным доменом с образованием сайта связывания CD3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие линкеры scFv являются «короткими», т.е. состоят из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков. Таким образом, в некоторых случаях линкеры scFv состоят из приблизительно 12 или менее аминокислотных остатков. В случае 0 аминокислотных остатков линкер scFv представляет собой пептидную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления эти линкеры scFv состоят из приблизительно 3-15, например, 8, 9 или 10 смежных аминокислотных остатков. Что касается аминокислотного состава линкеров scFv, отбираются пептиды, которые придают гибкость, не влияют на переменные домены, а также позволяют межцепочечному свертыванию соединять два переменных домена, образуя функциональный сайт связывания CD3. Например, линкеры scFv, содержащие остатки глицина и серина, как правило, обеспечивают устойчивость к протеазам. Согласно некоторым вариантам осуществления линкеры в scFv содержат остатки глицина и серина. Аминокислотная последовательность линкеров scFv может быть оптимизирована, например, способами фагового дисплея для улучшения связывания CD3 и выхода продукции scFv. Примеры пептидных линкеров scFv, подходящих для связывания переменного легкого домена и переменного тяжелого домена в scFv, включают в себя, без ограничения, (GS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 87), (GGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 88), (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 89), (GGSG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 90), (GGSGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 91), (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 92), (GGGGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 93) или (GGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 94), где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Согласно одному варианту осуществления линкер scFv может представлять собой (GGGGS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 95) или (GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 96). Изменения в длине линкера могут сохранять или усиливать активность, вызывая превосходную эффективность в исследованиях активности.

Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN имеет аффинность к CD3 на CD3-экспрессирующих клетках с K<sub>D</sub> 1000 нМ или менее, 500 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 80 нМ или менее, 50 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ или менее или 0,5 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN имеет аффинность к CD3ε, γ или δ с K<sub>D</sub> 1000 нМ или менее, 500 нМ или менее, 200

нМ или менее, 100 нМ или менее, 80 нМ или менее, 50 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ или менее или 0,5 нМ или менее. Согласно другим вариантам осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN имеет низкую аффинность к CD3, т.е. приблизительно 100 нМ или более.

Аффинность к связыванию с CD3 может быть определена, например, по способности самого триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN или его связывающего CD3 домена связываться с CD3, нанесенным на аналитический планшет; отображается на поверхности микробной клетки; в растворе и т.д. Активность связывания самого триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN или его CD3-связывающего домена по настоящему изобретению с CD3 можно анализировать путем иммобилизации лиганда (например, CD3) или самого триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN или его CD3-связывающего домена, к шарик, субстрату, клетке и т.д. Средства могут быть добавлены в соответствующий буфер, и партнеры по связыванию инкубируются в течение некоторого времени при данной температуре. После промывки для удаления несвязанного материала связанный белок может высвобождаться, например, с помощью SDS, буферов с высоким значением pH и т.п., и анализироваться, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

#### **Продлевающий время полужизни домен**

В настоящем документе рассматриваются домены, которые продлевают период полужизни антигенсвязывающего домена. Предполагается, что такие домены включают в себя, без ограничения, альбумин-связывающие домены, Fc-домены, малые молекулы и другие домены продления периода полураспада, известные в настоящей области техники.

Человеческий альбумин (ALB) (молекулярная масса ~ 67 кДа) представляет собой наиболее распространенный белок в плазме, присутствует в концентрации приблизительно 50 мг/мл (600 мкМ) и имеет период полужизни у людей приблизительно 20 дней. ALB служит для поддержания pH в плазме, способствует коллоидному кровяному давлению, выполняет функцию переносчика многих метаболитов и жирных кислот и служит основным транспортным белком для лекарственных средств в плазме.

Нековалентная ассоциация с альбумином продлевает период полужизни короткоживущих белков. Например, рекомбинантное слияние альбумин-связывающего домена с фрагментом Fab приводило к клиренсу *in vivo* в 25 и 58 раз и увеличению периода полужизни в 26 и 37 раз при внутривенном введении мышам и кроликам, соответственно, по сравнению с введением одного только Fab-фрагмента. В другом примере, когда инсулин ацилируют жирными кислотами для стимуляции ассоциации с альбумином, наблюдается

длительный эффект при подкожной инъекции кроликам или свиньям. Вместе эти исследования демонстрируют связь между связыванием альбумина и пролонгированным действием.

Согласно одному аспекту описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки содержат домен продления периода полужизни, например, домен, который специфически связывается с ALB. Согласно некоторым вариантам осуществления домен связывания ALB триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN может представлять собой любой домен, который связывается с ALB, включая в себя, без ограничения, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления ALB-связывающий домен представляет собой одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен (VHH) полученного от верблюдовых однодоменного антитела, пептид, лиганд или низкомолекулярный объект, специфический для HSA. Согласно некоторым вариантам осуществления ALB-связывающий домен представляет собой однодоменное антитело. Согласно другим вариантам осуществления HSA-связывающий домен представляет собой пептид. Согласно дополнительным вариантам осуществления HSA-связывающий домен представляет собой небольшую молекулу. Предполагается, что HSA-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN является довольно маленьким и составляет не более чем 25 кДа, не более чем 20 кДа, не более чем 15 кДа или не более чем 10 кДа согласно некоторым вариантам осуществления. В некоторых случаях связывание ALB составляет 5 кДа или менее, если он представляет собой пептид или низкомолекулярный объект.

Домен продления периода полужизни триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN обеспечивает измененную фармакодинамику и фармакокинетику самого триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN. Как указано выше, домен продления периода полураспада увеличивает период полувыведения. Домен продления периода полужизни также изменяет фармакодинамические свойства, включая в себя изменение распределения в ткани, проникновения и диффузии триспецифического антигенсвязывающего белка. Согласно некоторым вариантам осуществления домен продления периода полужизни обеспечивает улучшенное нацеливание на ткань (включая в себя опухоль), распределение в ткани, проникновение в ткань, диффузию в ткани и повышенную эффективность по сравнению с белком без домена продления периода полужизни. Согласно одному варианту осуществления в терапевтических способах

эффективно применяется уменьшенное количество триспецифического антигенсвязывающего белка, что приводит к уменьшенным побочным эффектам, таким как пониженная цитотоксичность неопухолевых клеток.

Кроме того, аффинность связывания домена продления периода полужизни может быть выбрана так, чтобы нацеливаться на специфическое время полувыведения в конкретном триспецифическом антигенсвязывающем белке. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления домен продления периода полужизни обладает высокой аффинностью связывания. Согласно другим вариантам осуществления домен продления периода полужизни обладает средней аффинностью связывания. Согласно другим вариантам осуществления домен продления периода полужизни обладает низкой или незначительной аффинностью связывания. Иллюстративные аффинности связывания включают в себя концентрации  $K_D$  при 10 нМ или менее (высокая), от 10 нМ до 100 нМ (средняя) и более чем 100 нМ (низкая). Как указано выше, аффинность связывания с ALB определяют известными способами, такими как поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе ALB-связывающие домены содержат однодоменное антитело.

#### **Связывающий мезотелин (MSLN) домен**

Мезотелин представляет собой гликопротеин, присутствующий на поверхности клеток мезотелиальной слизистой оболочки полостей брюшины, плевры и перикарда. Ген мезотелина (*MSLN*) кодирует белок-предшественник размером 71 кДа, который процессируется в белок с молекулярной массой 40 кДа, называемый мезотелином, который представляет собой гликозилфосфатидилинозитол-закрепленный гликопротеин, присутствующий на поверхности клетки (Chang, et al, Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93:136-40). кДНК мезотелина клонировали из библиотеки, полученной из линии клеток НРС-Y5 (Kojima et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:21984-21990). кДНК также клонировали с использованием моноклонального антитела K1, которое распознает мезотелиомы (Chang and Pastan (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:136-40). Мезотелин представляет собой антиген дифференцировки, экспрессия которого в нормальных тканях человека ограничена мезотелиальными клетками, выстилающими полость тела, такими как плевра, перикард и брюшина. Мезотелин также высоко экспрессируется при нескольких различных формах рака человека, включая в себя мезотелиомы, аденокарциномы поджелудочной железы, формы рака яичников, аденокарциномы желудка и легких. (Hassan, et al., Eur J Cancer (2008) 44:46-53) (Ordóñez, Am J Surg Pathol (2003) 27:1418-28; Ho, et al., Clin Cancer Res (2007) 13:1571-5). Мезотелин сверхэкспрессируется в подавляющем большинстве первичных

аденокарцином поджелудочной железы с редкой и слабой экспрессией, наблюдаемой в доброкачественной ткани поджелудочной железы. Argani P, et al. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(12):3862-3868. Эпителиальная злокачественная плевральная мезотелиома (МРМ) универсально экспрессирует мезотелин, в то время как саркоматоидная МРМ, вероятно, не экспрессирует мезотелин. Большинство серозных эпителиальных карцином яичников и связанные с ними первичные перитонеальные карциномы экспрессируют мезотелин.

Мезотелин также может быть использован в качестве маркера для диагностики и прогноза некоторых типов рака, потому что следовые количества мезотелина могут быть обнаружены в крови некоторых пациентов с мезотелин-положительным раком (Cristaudo et al., *Clin. Cancer Res.* 13:5076-5081, 2007). Сообщалось, что мезотелин может высвободиться в сыворотку путем делеции на его карбоксильном конце или путем протеолитического отщепления от его мембраносвязанной формы (Hassan et al., *Clin. Cancer Res.* 10:3937-3942, 2004). Увеличение растворимой формы мезотелина было обнаружено за несколько лет до появления злокачественных мезотелиом среди рабочих, подвергшихся воздействию асбеста (Creaney and Robinson, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 19:1025-1040, 2005). Кроме того, пациенты с раком яичников, поджелудочной железы и легких также характеризуются повышенным растворимым мезотелином в сыворотке крови (Cristaudo et al., *Clin. Cancer Res.* 13:5076-5081, 2007; Hassan et al., *Clin. Cancer Res.* 12:447-453, 2006; Croso et al., *Cancer Detect. Prev.* 30:180-187, 2006). Соответственно, мезотелин представляет собой подходящую мишень для способов профилактики или лечения заболеваний, и существует потребность в эффективных антителах, специфических к мезотелину.

Было показано, что зрелый мезотелин клеточной поверхности содержит три отдельных домена, а именно области I (содержащие остатки 296–390), II (содержащие остатки 391–486) и III (содержащие остатки 487–598). (Tang et al., A human single-domain antibody elicits potent antitumor activity by targeting an epitope in mesothelin close to the cancer cell surface, *Mol. Can. Therapeutics*, 12(4): 416-426, 2013). Первые антитела, произведенные против мезотелина для терапевтического вмешательства, были разработаны для вмешательства во взаимодействие между мезотелином и СА-125. Фаговый дисплей идентифицировал Fv SS, который был оптимизирован по аффинности и использован для производства нацеленного на мезотелин рекомбинантного иммунотоксина, SS1P. Антитело MORAb-009 аматуксимаб, которое также использует SS1, распознает нелинейный эпитоп в аминоконцевых 64 аминокислотах мезотелина в области I. Fv SS1 также использовался для производства Т-клеток, сконструированных с химерным антигенным рецептором. Недавно появились новые антитела к мезотелину, которые распознают другие области белка мезотелина.

Все еще существует потребность в доступных дополнительных вариантах лечения солидных опухолевых заболеваний, связанных со сверхэкспрессией мезотелина, таких как рак яичников, рак поджелудочной железы, мезотелиома, рак легких, рак желудка и тройной негативный рак молочной железы. В настоящем раскрытии предусмотрены, согласно некоторым вариантам осуществления, нацеленные на MSLN триспецифические белки, содержащие связывающие домены, которые специфически связываются с MSLN на поверхности опухолевых клеток-мишеней.

Описанная в настоящем документе конструкция нацеленных на MSLN триспецифических белков позволяет домену связывания с MSLN быть гибкому в том, что домен связывания с MSLN может быть любого типа связывающего домена, включая в себя, без ограничения, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления домен связывания с MSLN представляет собой одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен (VHH) полученного от верблюдовых однодоменного антитела. Согласно другим вариантам осуществления домен связывания с MSLN представляет собой не-Ig-связывающий домен, т.е. миметик антитела, такой как антикарины, аффилины, молекулы аффител, аффимеры, аффитины, альфа-тела, авимеры, DARPIn, финомеры, пептиды домена Куниц и монотела. Согласно дополнительным вариантам осуществления домен связывания с MSLN представляет собой лиганд или пептид, который связывается или ассоциирует с MSLN. Согласно еще дополнительным вариантам осуществления домен связывания с MSLN представляет собой ноттин. Согласно еще дополнительным вариантам осуществления домен связывания с MSLN представляет собой низкомолекулярный объект.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен связывается с белком, содержащим последовательность SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность, по сравнению с SEQ ID NO: 57.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе связывающие MSLN домены распознают полноразмерный мезотелин. В некоторых случаях раскрытые в настоящем документе связывающие MSLN домены распознают эпитоп в области I (содержащей аминокислотные остатки 296-390 SEQ ID NO: 57), области II (содержащей аминокислотные остатки 391-486 SEQ ID NO: 57) или области III (содержащей аминокислотные остатки 487-598 SEQ ID NO: 57) мезотелина. Предполагается, что связывающие MSLN домены по настоящему раскрытию могут,

согласно некоторым вариантам осуществления, распознавать и связываться с эпитопами, которые расположены вне областей I, II или III мезотелина. Согласно еще другим вариантам осуществления раскрыты связывающие MSLN домены, которые распознают и связываются с эпитопом, отличным от антитела MORAb-009.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен представляет собой антитело к MSLN или вариант антитела. Используемый в настоящем документе термин «вариант антитела» относится к вариантам и производным антитела, описанным в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления рассматриваются варианты аминокислотной последовательности антител к MSLN, описанных в настоящем документе. Например, согласно определенным вариантам осуществления варианты аминокислотной последовательности антител к MSLN, описанные в настоящем документе, рассматриваются для улучшения аффинности связывания и/или других биологических свойств антител. Иллюстративный способ получения вариантов аминокислот предусматривает, без ограничения, введение соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают в себя, например, делеции и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела.

Может быть сделана любая комбинация делеции, вставки и замены для достижения конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например, связыванием антигена. Согласно определенным вариантам осуществления предусмотрены варианты антител, содержащие одну или более аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают в себя CDR и каркасные области. Примеры таких замен описаны ниже. Аминокислотные замены могут быть введены в представляющее интерес антитело, и продукты будут подвергнуты скринингу на предмет желаемой активности, например, сохраненного/улучшенного связывания антигена, сниженной иммуногенности или улучшенной Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности (TDCC). Для получения вариантов антител рассматриваются как консервативные, так и неконсервативные аминокислотные замены.

В другом примере замены для создания варианта антитела к MSLN заменяют один или более остатков гипервариабельной области исходного антитела. В общем, варианты затем выбирают на основании улучшений желаемых свойств по сравнению с исходным антителом, например, повышенной аффинности, пониженной аффинности, пониженной иммуногенности, повышенной зависимости связывания от pH.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен нацеленного на MSLN триспецифического белка представляет собой однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен (VHH) происходящего от ламы sdAb, пептид, лиганд или малую молекулу, специфическую к мезотелину. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе связывающий мезотелин домен нацеленного на MSLN триспецифического белка представляет собой любой домен, который связывается с мезотелином, включая в себя, без ограничения, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен представляет собой однодоменное антитело. Согласно другим вариантам осуществления связывающий MSLN домен представляет собой пептид. Согласно другим вариантам осуществления связывающий MSLN домен представляет собой небольшую молекулу.

В целом, следует отметить, что используемый в настоящем документе термин «однодоменное антитело» в своем самом широком смысле не ограничен конкретным биологическим источником или конкретным способом получения. Однодоменные антитела представляют собой антитела, чьи определяющие комплементарность области являются частью однодоменного полипептида. Примеры включают в себя, без ограничения, антитела с тяжелой цепью, антитела, естественно лишенные легких цепей, однодоменные антитела, полученные из обычных 4-цепочечных антител, сконструированные антитела и однодоменные каркасы, отличные от таковых, полученных из антител. Однодоменные антитела могут представлять собой любые из настоящей области техники или любые будущие однодоменные антитела. Однодоменные антитела могут быть получены из любых видов, включая в себя, без ограничения, мышь, человека, верблюда, ламу, козу, кролика, быка. Например, согласно некоторым вариантам осуществления однодоменные антитела по настоящему раскрытию получают: (1) путем выделения домена VHH природного антитела с тяжелой цепью; (2) путем экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей встречающийся в природе домен VHH; (3) путем «гуманизации» встречающегося в природе домена VHH или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой гуманизированный домен VHH; (4) путем «камелизирования» встречающегося в природе домена VH от любых видов животных и, в частности, от вида млекопитающего, такого как человек, или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой камелизированный домен VH; (5) путем «камелизирования» «доменного антитела» или «Dab» или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой камелизированный домен VH; (6) с использованием синтетических или

полусинтетических технологий получения белков, полипептидов или других аминокислотных последовательностей; (7) путем получения нуклеиновой кислоты, кодирующей однодоменное антитело, с использованием технологий синтеза нуклеиновой кислоты, известных в настоящей области техники, с последующей экспрессией полученной таким образом нуклеиновой кислоты; и/или (8) любой комбинацией одного или более из вышеперечисленных.

Согласно одному варианту осуществления однодоменное антитело соответствует доменам V<sub>H</sub>H природных антител с тяжелыми цепями, направленных против MSLN. Как дополнительно описано в настоящем документе, такие последовательности V<sub>H</sub>H можно, как правило, производить или получать путем соответствующей иммунизации видов ламы MSLN (т.е., чтобы вызвать иммунный ответ и/или антитела с тяжелыми цепями, направленные против MSLN), путем получения подходящего биологического образца от указанной ламы (такой как образец крови, образец сыворотки или образец В-клеток) и путем производства последовательностей V<sub>H</sub>H, направленных против MSLN, начиная с указанного образца, используя любую подходящую технологию, известную в настоящей области техники.

Согласно другому варианту осуществления такие встречающиеся в природе домены V<sub>H</sub>H против MSLN получают из исходных библиотек последовательностей V<sub>H</sub>H верблюдовых, например, путем скрининга такой библиотеки с использованием MSLN или по меньшей мере одной ее части, фрагмента, антигенной детерминанты или эпитопа с использованием одной или более технологий скрининга, известных в настоящей области техники. Такие библиотеки и технологии описаны, например, в WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 и WO 03/035694. Альтернативно, используются улучшенные синтетические или полусинтетические библиотеки, полученные из интактных библиотек V<sub>H</sub>H, такие как библиотеки V<sub>H</sub>H, полученные из интактных библиотек V<sub>H</sub>H такими технологиями, как случайный мутагенез и/или перетасовка CDR, как, например, описано в WO 00/43507.

Согласно дополнительному варианту осуществления еще одна технология получения последовательностей V<sub>H</sub>H, направленных против MSLN, включает в себя подходящую иммунизацию трансгенного млекопитающего, которое способно экспрессировать антитела с тяжелыми цепями (т.е., чтобы вызвать иммунный ответ и/или антитела с тяжелыми цепями, направленные против MSLN), получение подходящего биологического образца от указанного трансгенного млекопитающего (такого как образец крови, образец сыворотки или образец В-клеток) и затем производство последовательностей V<sub>H</sub>H, направленных против MSLN, начиная с указанного образца, с использованием любой подходящей технологии, известной в настоящей области.

Например, для этой цели можно использовать крыс или мышей, экспрессирующих антитела с тяжелыми цепями, и дополнительные способы и технологии, описанные в WO 02/085945 и в WO 04/049794.

Согласно некоторым вариантам осуществления однодоменное антитело к MSLN нацеленного на MSLN триспецифического белка содержит однодоменное антитело с аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности природного VHH-домена, но которая была «гуманизирована», т.е. путем замещения одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности указанной природной последовательности VHH (и, в частности, в каркасных последовательностях) одним или более аминокислотными остатками, которые находятся в соответствующем положении(ях) в домене VH из обычного 4-цепочечного антитела человека (например, как указано выше). Это может быть выполнено известным в настоящей области техники способом, который будет понятен специалисту в настоящей области техники, например, на основе дальнейшего описания, приведенного в настоящем документе. Опять же, следует отметить, что такие гуманизированные однодоменные антитела к MSLN по настоящему раскрытию получают любым подходящим способом, известным *per se* (т.е. как указано в пунктах (1) - (8) выше), и, таким образом, строго не ограничиваются полипептидами, которые были получены с использованием полипептида, который содержит природный домен VHH в качестве исходного материала. Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления однодоменное антитело к MSLN, как описано в настоящем документе, содержит однодоменное антитело с аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности природного VH-домена, но которая была «камелизирована», т.е. путем замещения одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности встречающегося в природе домена VH из обычного 4-цепочечного антитела одним или более аминокислотными остатками, которые находятся в соответствующем положении(ях) в домене VHH антитела с тяжелыми цепями. Такие «камелизирующие» замены предпочтительно вставляются в положениях аминокислот, которые образуют и/или присутствуют на границе VH-VL, и/или в так называемых характерных для Camelidae остатках (смотрите, например, WO 94/04678 и Davies and Riechmann (1994 and 1996)). Предпочтительно, последовательность VH, которая используется в качестве исходного материала или отправной точки для создания или разработки камелизированного одиночного домена, предпочтительно представляет собой последовательность VH от млекопитающего, более предпочтительно последовательность VH человека, такую как последовательность VH3. Однако следует отметить, что такие камелизированные

однодоменные антитела к MSLN по настоящему раскрытию согласно определенным вариантам осуществления получают любым подходящим способом, известным в настоящей области техники (т.е. как указано в пунктах (1) - (8) выше), и таким образом, строго не ограничиваются полипептидами, которые были получены с использованием полипептида, который содержит природный домен VH в качестве исходного материала. Например, как дополнительно описано в настоящем документе, как «гуманизация», так и «камелизация» выполняются путем предоставления нуклеотидной последовательности, которая кодирует встречающийся в природе домен VHH или домен VH, соответственно, и затем путем изменения одного или более кодонов в указанной нуклеотидной последовательности таким образом, чтобы новая нуклеотидная последовательность кодировала «гуманизованное» или «камелизованное» однодоменное антитело, соответственно. Затем эту нуклеиновую кислоту можно экспрессировать, чтобы получить желаемое однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию. Альтернативно, согласно другим вариантам осуществления на основе аминокислотной последовательности встречающегося в природе домена VHH или домена VH, соответственно, разрабатывают аминокислотную последовательность требуемого гуманизованного или камелизованного однодоменного антитела к MSLN по настоящему раскрытию, соответственно, и затем синтезируют *de novo* с использованием известных технологий синтеза пептидов. Согласно некоторым вариантам осуществления на основе аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности встречающегося в природе домена VHH или домена VH, соответственно, разрабатывают нуклеотидную последовательность, кодирующую требуемое гуманизованное или камелизованное однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию, соответственно, и затем синтезируют *de novo* с использованием известных технологий синтеза нуклеиновой кислоты, после чего полученную таким образом нуклеиновую кислоту экспрессируют с использованием известных технологий экспрессии, чтобы получить требуемое однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию.

Другие подходящие способы и технологии получения однодоменного антитела к MSLN по настоящему раскрытию и/или кодирующих его нуклеиновых кислот, например, начиная с встречающихся в природе последовательностей VH или последовательностей VHH, например, включают в себя объединение одной или более частей одной или более встречающихся в природе последовательностей VH (таких как одна или более каркасных (FR) последовательностей и/или последовательностей определяющей комплементарности области (CDR)), одной или более частей одной или более встречающихся в природе последовательностей VHH (таких как одна или более последовательностей FR или

последовательностей CDR) и/или одной или более синтетических или полусинтетических последовательностей подходящим образом, чтобы обеспечить однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию или кодирующую его нуклеотидную последовательность или нуклеиновую кислоту.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен, представляет собой специфическое антитело к MSLN, содержащее переменную определяющую комплементарность область CDR1 тяжелой цепи, переменную CDR2 тяжелой цепи, переменную CDR3 тяжелой цепи, переменную CDR1 легкой цепи, переменную CDR2 легкой цепи и переменную CDR3 легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен содержит любой домен, который связывается с MSLN, включая в себя, без ограничения, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела или антигенсвязывающих фрагментов, таких как однодоменные антитела (sdAb), фрагменты Fab, Fab', F(ab)2 и Fv, фрагменты, состоящие из одной или более CDR, одноцепочечные антитела (например, одноцепочечные фрагменты Fv (scFv)), стабилизированные дисульфидом фрагменты Fv (dsFv), гетероконъюгатные антитела (например, биспецифические антитела), фрагменты pFv, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей и димеры, состоящие из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен представляет собой однодоменное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления однодоменное антитело к MSLN содержит переменные определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR), CDR1, CDR2 и CDR3.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая состоит из четырех каркасных областей/последовательностей (f1-f4), прерываемых тремя определяющими комплементарность областями/последовательностями, как представлено формулой: f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4, где r1, r2 и r3 представляют собой определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, а f1, f2, f3 и f4 представляют собой остатки каркаса. Остатки каркаса связывающего MSLN белка по настоящему изобретению содержат, например, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 или 94 аминокислотных остатка, и определяющие комплементарность области содержат, например, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 аминокислотных остатков. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

SEQ ID NO: 1-40 и 102-105. Согласно некоторым вариантам осуществления каркасная область 1 связывающего MSLN триспецифического белка по настоящему раскрытию содержит последовательность, как в любой из SEQ ID NO: 223-261. Согласно некоторым вариантам осуществления каркасная область 2 связывающего MSLN триспецифического белка по настоящему раскрытию содержит последовательность, как в любой из SEQ ID NO: 262-300. Согласно некоторым вариантам осуществления каркасная область 3 связывающего MSLN триспецифического белка по настоящему раскрытию содержит последовательность, как в любой из SEQ ID NO: 301-339. Согласно некоторым вариантам осуществления каркасная область 4 связывающего MSLN триспецифического белка по настоящему раскрытию содержит последовательность, как в любой из SEQ ID NO: 340-378.

Согласно некоторым вариантам осуществления CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, или вариант, содержащий одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен в SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, или вариант, содержащий одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен в SEQ ID NO: 52. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR3 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, или вариант, содержащий один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен в SEQ ID NO: 53.

Согласно некоторым вариантам осуществления CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, или вариант, содержащий одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен в SEQ ID NO: 54. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, или вариант, содержащий одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен в SEQ ID NO: 55. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR3 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56, или вариант, содержащий один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен в SEQ ID NO: 56.

Согласно некоторым вариантам осуществления CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 106-144, или вариант, содержащий одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен в любой из SEQ ID NO: 106-144. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR2 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID

NO: 145-183, или вариант, содержащий одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен в любой из SEQ ID NO: 145-183. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR3 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 184-222, или вариант, содержащий одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен в любой из SEQ ID NO: 184-222.

Связывающие MSLN домены по настоящему раскрытию в некоторых примерах содержат одну или более консервативных областей. Консервативные области содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 41-49, или варианты, содержащие одну или более замен аминокислотных остатков относительно указанных последовательностей. Иллюстративные варианты осуществления включают в себя связывающие MSLN белки, содержащие одну или более консервативных областей, выбранных из SEQ ID NO: 41-44, или варианты, содержащие одну или более замен аминокислотных остатков относительно указанных последовательностей. В некоторых случаях связывающий MSLN домен содержит (i) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 41, (ii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 42, (iii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 43, и (iv) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 44.

Дополнительные иллюстративные варианты осуществления включают в себя связывающие MSLN домены, содержащие одну или более консервативных областей, выбранных из SEQ ID NO: 45-50, или варианты, содержащие одну или более замен аминокислотных остатков относительно указанных последовательностей. В некоторых случаях связывающий MSLN домен содержит (i) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 45, (ii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 46, (iii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 47, (iv) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 48, (v) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 49, и (vi) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 50.

Согласно различным вариантам осуществления связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию по меньшей мере приблизительно на 75%, приблизительно на 76%, приблизительно на 77%, приблизительно на 78%, приблизительно на 79%, приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%,

приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичен аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-29.

Согласно различным вариантам осуществления связывающий MSLN домен по настоящему изобретению по меньшей мере приблизительно на 75%, приблизительно на 76%, приблизительно на 77%, приблизительно на 78%, приблизительно на 79%, приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичен аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30-40 и 102-105.

Согласно различным вариантам осуществления определяющая комплементарность область связывающего MSLN домена по настоящему изобретению по меньшей мере приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70% приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 54 или любой из SEQ ID NO: 106-144.

Согласно различным вариантам осуществления определяющая комплементарность область связывающего MSLN домена по настоящему изобретению по меньшей мере приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70% приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100%

идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55 или любой из SEQ ID NO: 145-183.

Согласно различным вариантам осуществления определяющая комплементарность область связывающего MSLN домена по настоящему изобретению по меньшей мере приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70% приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 56 или любой из SEQ ID NO: 184-222.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность SEQ ID NO: 3. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления







103. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления представляет собой гуманизованное однодоменное антитело, содержащее последовательность SEQ ID NO:

104. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления представляет собой гуманизованное однодоменное антитело, содержащее последовательность SEQ ID NO: 105.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен является перекрестно реактивным с мезотелином человека и яванского макака. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN домен является специфическим к мезотелину человека. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе связывающий MSLN домен связывается с мезотелином человека с Kd человека (hKd). Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе связывающий MSLN домен связывается с мезотелином яванского макака с супо Kd (сKd). Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе связывающие MSLN домены связываются как с мезотелином яванского макака, так и с мезотелином человека, с супо Kd (сKd) и Kd человека (hKd), соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок связывается с мезотелином человека и яванского макака с сопоставимыми аффинностями связывания (т.е. значения hKd и сKd не отличаются более чем на  $\pm 10\%$ ). Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и сKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 500 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и сKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 450 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и сKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 400 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и сKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 350 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и сKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 300 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и сKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 250 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и сKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 200 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и сKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 150 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и сKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 100 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и сKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 90 нМ. Согласно

некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,2 нМ до приблизительно 80 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,3 нМ до приблизительно 70 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,4 нМ до приблизительно 50 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 30 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,6 нМ до приблизительно 10 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,7 нМ до приблизительно 8 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,8 до приблизительно 6 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,9 нМ до приблизительно 4 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 1 нМ до приблизительно 2 нМ.

Согласно некоторым вариантам осуществления любой из указанных выше связывающих MSLN доменов (например, однодоменные антитела к MSLN с SEQ ID NO: 1-40) представляет собой аффинный пептид, меченный для простоты очистки. Согласно некоторым вариантам осуществления аффинная пептидная метка представляет собой шесть последовательных остатков гистидина, также называемых 6X-his (SEQ ID NO: 379).

Согласно определенным вариантам осуществления связывающие MSLN домены по настоящему раскрытию предпочтительно связывают мембраносвязанный мезотелин по сравнению с растворимым мезотелином. Мембраносвязанный мезотелин относится к наличию мезотелина внутри поверхности клеточной мембраны или на ней клетки, которая экспрессирует мезотелин. Растворимый мезотелин относится к мезотелину, который больше не находится внутри или на поверхности клеточной мембраны клетки, которая экспрессирует или экспрессировала мезотелин. В определенных случаях растворимый мезотелин присутствует в крови и/или лимфатической системе у субъекта. Согласно одному варианту осуществления связывающие MSLN домены связывают мембраносвязанный мезотелин по меньшей мере в 5 раз, в 10 раз, в 15 раз, в 20 раз, в 25 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 100 раз, в 500 раз или в 1000 раз больше, чем растворимый мезотелин. Согласно одному варианту осуществления нацеленные на MSLN триспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению предпочтительно связывают мембраносвязанный мезотелин в 30 раз больше, чем растворимый мезотелин. Определение предпочтительного связывания антигенсвязывающего белка с мембраносвязанным MSLN по сравнению с растворимым

MSLN может быть легко определено с использованием анализов, хорошо известных в настоящей области техники.

### **Молекулы TriTAC**

Различные варианты осуществления настоящего раскрытия обеспечивают триспецифическую молекулу (также называемую в настоящем документе молекулой TriTAC), содержащую связывающий MSLN домен, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула TriTAC содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула TriTAC по настоящему раскрытию содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, приблизительно на 76%, приблизительно на 77%, приблизительно на 78%, приблизительно на 79%, приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула TriTAC по настоящему раскрытию содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, приблизительно на 76%, приблизительно на 77%, приблизительно на 78%, приблизительно на 79%, приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична полноразмерной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула TriTAC по настоящему раскрытию содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, приблизительно на 76%, приблизительно на 77%, приблизительно на 78%, приблизительно на 79%, приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на

на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична фракции полноразмерной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101.

### **Интеграция в химерные антигенные рецепторы (CAR)**

Нацеленные на MSLN триспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему раскрытию в некоторых примерах могут быть включены в химерный антигенный рецептор (CAR). Сконструированная иммунная эффекторная клетка, например, Т-клетка или NK-клетка, может быть использована для экспрессии CAR, который включает в себя описанный в настоящем документе нацеленный триспецифический белок к MSLN, содержащий однодоменное антитело к MSLN. Согласно одному варианту осуществления CAR, включающий в себя описанный в настоящем документе нацеленный триспецифический белок к MSLN, соединен с трансмембранным доменом через шарнирную область и, кроме того, с костимулирующим доменом, например, функциональным сигнальным доменом, полученным из OX40, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) или 4-1BB. Согласно некоторым вариантам осуществления CAR дополнительно содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен, такой как 4-1BB и/или CD3 дзета.

### **Свойства снижения роста опухоли**

Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленные на MSLN триспецифические белки по настоящему изобретению уменьшают рост опухолевых клеток *in vivo* при введении субъекту, у которого есть опухолевые клетки, которые экспрессируют мезотелин. Измерение уменьшения роста опухолевых клеток может быть определено множеством различных методологий, хорошо известных в настоящей области техники. Неограничивающие примеры включают в себя прямое измерение размера опухоли, измерение массы иссеченной опухоли и сравнение с контрольными субъектами, измерение с помощью способов визуализации (например, КТ или МРТ), которые могут использовать или не использовать изотопы или люминесцентные молекулы (например, люциферазу) для расширенного анализа, и т.п. Согласно конкретным вариантам осуществления введение триспецифических белков по настоящему раскрытию приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим средством по меньшей мере приблизительно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%, с приблизительно 100% снижением роста опухоли, указывающим на полный ответ и исчезновение опухоли. Согласно дополнительным вариантам осуществления введение

триспецифических белков по настоящему раскрытию приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим средством приблизительно на 50-100%, приблизительно на 75-100% или приблизительно на 90-100%. Согласно дополнительным вариантам осуществления введение триспецифических белков по настоящему раскрытию приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим средством приблизительно на 50-60%, приблизительно на 60-70%, приблизительно на 70-80%, приблизительно на 80-90% или приблизительно на 90-100%.

### **Модификации триспецифических MSLN белков**

Описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки охватывают производные или аналоги, в которых (i) аминокислота замещена аминокислотным остатком, который не кодируется генетическим кодом, (ii) зрелый полипептид слит с другим соединением, таким как полиэтиленгликоль или (iii) дополнительные аминокислоты слиты с белком, такие как лидерная или секреторная последовательность или последовательность для очистки белка.

Типичные модификации включают в себя, без ограничения, ацетилирование, ацилирование, ADP-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гемового фрагмента, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, сшивание, циклизация, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных сшивок, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитическая обработка, фосфорилирование, пренилирование, рацемизация, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное переносом РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование.

Модификации осуществляются в любом месте в описанных в настоящем документе нацеленных на MSLN триспецифических белках, включая в себя пептидный остов, аминокислотные боковые цепи и амино- или карбоксильный конец. Некоторые обычные модификации пептидов, которые могут быть использованы для модификации нацеленных на MSLN триспецифических белков включают в себя гликозилирование, липидное присоединение, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксилирование, блокирование амино- или карбоксильной группы в полипептиде или и то и другое, путем ковалентной модификации, и АДФ-рибозилирование.

### **Полинуклеотиды, кодирующие нацеленные на MSLN триспецифические белки**

Согласно некоторым вариантам осуществления также предусмотрены полинуклеотидные молекулы, кодирующие описанный в настоящем документе триспецифический связывающий белок к MSLN. Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотидные молекулы предусмотрены в виде конструкции ДНК. Согласно другим вариантам осуществления полинуклеотидные молекулы предусмотрены в качестве транскрипта информационной РНК.

Молекулы полинуклеотидов конструируют известными способами, такими как объединение генов, кодирующих три связывающих домена, либо разделенных пептидными линкерами, либо, согласно другим вариантам осуществления, прямо связанных пептидной связью в единой генетической конструкции, функционально связанных с подходящим промотором и, необязательно, подходящим терминатором транскрипции, и экспрессия его в бактериях или другой подходящей системе экспрессии, такой как, например, клетки CHO. Согласно вариантам осуществления, где связывающий MSLN домен представляет собой небольшую молекулу, полинуклеотиды содержат гены, кодирующие связывающий CD3 домен и домен продления периода полужизни. Согласно вариантам осуществления, где домен продления периода полужизни представляет собой небольшую молекулу, полинуклеотиды содержат гены, кодирующие домены, которые связываются с CD3 и MSLN. В зависимости от используемой векторной системы и хозяина может использоваться любое количество подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая в себя конститутивные и индуцибельные промоторы. Промотор выбирают так, чтобы он управлял экспрессией полинуклеотида в соответствующей клетке-хозяине.

Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотид встроен в вектор, предпочтительно в вектор экспрессии, который представляет собой дополнительный вариант осуществления. Этот рекомбинантный вектор может быть сконструирован в соответствии с известными способами. Векторы, представляющие особый интерес, включают в себя плазмиды, фагемиды, производные фагов, вирусы (например, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, лентивирусы и тому подобное) и космиды.

Различные системы вектора/хозяина экспрессии могут быть использованы для содержания и экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид описанного триспецифического антигенсвязывающего белка. Примерами векторов экспрессии для экспрессии в *E. coli* являются pSKK (Le Gall et al., *J Immunol Methods*. (2004) 285(1):111-27) или pcDNA5 (Invitrogen) для экспрессии в клетках млекопитающих.

Таким образом, описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки согласно некоторым вариантам осуществления получают путем введения вектора, кодирующего белок, как описано выше, в клетку-хозяина и культивирования указанной клетки-хозяина в условиях, в которых белковые домены экспрессируются, могут быть выделены и, необязательно, дополнительно очищены.

#### **Фармацевтические композиции**

Согласно некоторым вариантам осуществления также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие описанный в настоящем документе связывающий анти-MSLN триспецифический белок, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид нацеленных на MSLN триспецифических белков, или клетку-хозяина, трансформированную этим вектором, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя, без ограничения, любой носитель, который не влияет на эффективность биологической активности ингредиентов и который не токсичен для пациента, которому его вводят. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя солевые растворы с фосфатным буфером, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих средств, стерильные растворы и т.д. Такие носители могут быть составлены обычными способами и могут быть введены субъекту в подходящей дозе. Предпочтительно композиции являются стерильными. Эти композиции могут также содержать вспомогательные средства, такие как консерванты, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено включением различных антибактериальных и противогрибковых средств. Дополнительный вариант осуществления обеспечивает один или более из описанных выше нацеленных на MSLN триспецифических белков, упакованных в лиофилизированной форме или упакованные в водной среде.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтических композиций описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки инкапсулированы в наночастицы. Согласно некоторым вариантам осуществления наночастицы представляют собой фуллерены, жидкие кристаллы, липосомы, квантовые точки, суперпарамагнитные наночастицы, дендримеры или наностержни. Согласно дополнительным вариантам осуществления фармацевтических композиций MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок присоединен к липосомам. В некоторых случаях MSLN триспецифические антигенсвязывающие белки конъюгируют с поверхностью липосом. В некоторых случаях MSLN триспецифические

антигенсвязывающие белки инкапсулируют в оболочку липосомы. В некоторых случаях липосома представляет собой катионную липосому.

Описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки рассматриваются для применения в качестве лекарственного средства. Введение осуществляется различными способами, например, внутривенным, внутривентральным, подкожным, внутримышечным, местным или внутрикожным введением. Согласно некоторым вариантам осуществления способ введения зависит от вида терапии и вида соединения, содержащегося в фармацевтической композиции. Схема приема лекарственного средства будет определяться лечащим врачом и другими клиническими факторами. Дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая в себя размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол, конкретное соединение, которое следует вводить, время и способ введения, вид терапии, общее состояние здоровья и другие одновременно вводимые лекарственные средства. «Эффективная доза» относится к количествам активного ингредиента, которые являются достаточными для воздействия на течение и тяжесть заболевания, приводящих к уменьшению или ремиссии такой патологии, и могут быть определены с использованием известных способов.

Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленные на MSLN триспецифические белки по настоящему раскрытию вводят в дозировке до 10 мг/кг с частотой один раз в неделю. В некоторых случаях дозировка составляет от приблизительно 1 нг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза составляет от приблизительно 1 нг/кг до приблизительно 10 нг/кг, от приблизительно 5 нг/кг до приблизительно 15 нг/кг, от приблизительно 12 нг/кг до приблизительно 20 нг/кг, от приблизительно 18 нг/кг до приблизительно 30 нг/кг, от приблизительно 25 нг/кг до приблизительно 50 нг/кг, от приблизительно 35 нг/кг до приблизительно 60 нг/кг, от приблизительно 45 нг/кг до приблизительно 70 нг/кг, от приблизительно 65 нг/кг до приблизительно 85 нг/кг, от приблизительно 80 нг/кг до приблизительно 1 мкг/кг, от приблизительно 0,5 мкг/кг до приблизительно 5 мкг/кг, от приблизительно 2 мкг/кг до приблизительно 10 мкг/кг, от приблизительно 7 мкг/кг до приблизительно 15 мкг/кг, от приблизительно 12 мкг/кг до приблизительно 25 мкг/кг, от приблизительно 20 мкг/кг до приблизительно 50 мкг/кг, от приблизительно 35 мкг/кг до приблизительно 70 мкг/кг, от приблизительно 45 мкг/кг до приблизительно 80 мкг/кг, от приблизительно 65 мкг/кг до приблизительно 90 мкг/кг, от приблизительно 85 мкг/кг до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,095 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В некоторых случаях дозировка составляет от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 0,2 мг/кг; от приблизительно 0,25 мг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,45 мг/кг до приблизительно 1

мг/кг, от приблизительно 0,75 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 2,5 мг/кг до приблизительно 4 мг/кг, от приблизительно 3,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 6 мг/кг, от приблизительно 5,5 мг/кг до приблизительно 7 мг/кг, от приблизительно 6,5 мг/кг до приблизительно 8 мг/кг, от приблизительно 7,5 мг/кг до приблизительно 9 мг/кг или от приблизительно 8,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Частота введения согласно некоторым вариантам осуществления составляет приблизительно менее чем ежедневно, через день, менее одного раза в день, два раза в неделю, еженедельно, один раз в 7 дней, один раз в две недели, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели или раз в месяц. В некоторых случаях частота введения составляет раз в неделю. В некоторых случаях частота введения составляет раз в неделю, а дозировка составляет до 10 мг/кг. В некоторых случаях продолжительность введения составляет от приблизительно 1 дня до приблизительно 4 недель или более.

### **Способы лечения**

Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления представлены способы и применения для стимуляции иммунной системы нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающие введение описанного в настоящем документе нацеленного на MSLN триспецифического белка. В некоторых случаях введение описанного в настоящем документе нацеленного на MSLN триспецифического белка индуцирует и/или поддерживает цитотоксичность по отношению к клетке, экспрессирующей антиген-мишень. В некоторых случаях клетка, экспрессирующая антиген-мишень, представляет собой раковую или опухолевую клетку, вирусно инфицированную клетку, бактериально инфицированную клетку, аутореактивную Т- или В-клетку, поврежденные эритроциты, артериальные бляшки или фиброзную ткань.

В настоящем документе также представлены способы и применения для лечения заболевания, нарушения или состояния, связанного с антигеном-мишенью, предусматривающие введение нуждающемуся в этом индивидууму нацеленного на MSLN триспецифического белка. Заболевания, нарушения или состояния, связанные с антигеном-мишенью, включают в себя, без ограничения, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, аутоиммунное заболевание, отторжение трансплантата, атеросклероз или фиброз. Согласно дополнительным вариантам осуществления заболевание, нарушение или состояние, связанное с антигеном-мишенью, представляет собой пролиферативное заболевание, опухолевое заболевание, воспалительное заболевание, иммунологическое нарушение, аутоиммунное заболевание, инфекционное заболевание, вирусное заболевание, аллергическую реакцию, паразитарную реакцию, болезнь "трансплантат против хозяина"

или болезнь "хозяин против трансплантата". Согласно одному варианту осуществления связанное с антигеном-мишенью заболевание, нарушение или состояние представляет собой рак. Рак, который можно лечить, предотвращать или держать под контролем с помощью связывающих MSLN белков по настоящему изобретению, и способы их применения включают в себя, без ограничения, раковые опухоли эпителиального происхождения. Примеры таких форм рака включают в себя следующие: лейкозы, такие как, без ограничения, острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острые миелоцитарные лейкозы, такие как миелобластные, промиелоцитарные, миеломоноцитарные, моноцитарные лейкозы и эритролейкоз, и миелодиспластический синдром; такие хронические лейкозы, как, без ограничения, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, лейкоз ворсистых клеток; истинная полицитемия; такие лимфомы, как, помимо прочего, болезнь Ходжкина, неходжкинская болезнь; такие множественные миеломы, как, без ограничения, тлеющая множественная миелома, несекреторная миелома, остеосклеротическая миелома, лейкоз плазматических клеток, солитарная плазмоцитома и экстрамедуллярная плазмоцитома; макроглобулинемия Вальденстрема; моноклональная гаммопатия неопределенного значения; доброкачественная моноклональная гаммопатия; болезнь тяжелых цепей; такие саркомы костей и соединительной ткани, как, без ограничения, костная саркома, остеосаркома, хондросаркома, саркома Юинга, злокачественная гигантоклеточная опухоль, фибросаркома кости, хордома, периостальная саркома, саркома мягких тканей, ангиосаркома (гемангиосаркома), фибросаркома, саркома Капоши, лейомиосаркома, липосаркома, лимфангиосаркома, нейрилеммома, рабдомиосаркома, синовиальная саркома; такие опухоли головного мозга, как, без ограничения, глиома, астроцитомы, глиома ствола головного мозга, эпендимомы, олигодендроглиомы, неглиальная опухоль, акустическая невринома, краниофарингиома, медуллобластома, менингиома, пинеоцитомы, пинеобластома, первичная лимфома головного мозга; рак молочной железы, включая в себя, без ограничения, протоковую карциному, аденокарциному, лобулярную (мелкоклеточную) карциному, внутрипротоковую карциному, медуллярный рак молочной железы, слизистый рак молочной железы, трубчатый рак молочной железы, папиллярный рак молочной железы, болезнь Педжета и воспалительный рак молочной железы; рак надпочечника, такой как, без ограничения, феохромоцитомы и адренокортикальная карцинома; такой рак щитовидной железы, как, без ограничения, папиллярный или фолликулярный рак щитовидной железы, медуллярный рак щитовидной железы и анапластический рак щитовидной железы; такой рак поджелудочной железы, как, без ограничения, инсулинома, гастринома, глюкагонома, випома, секретирующая

соматостатин опухоль и опухоль карциноидных или островковых клеток; такой рак гипофиза, как, без ограничений, болезнь Кушинга, пролактин-секретирующая опухоль, акромегалия и несахарный диабет; такие формы рака глаз, как, без ограничения, меланома глаза, такая как меланома радужки, меланома хориоидеи и меланома цилиарного тела, и ретинобластома; формы рака влагалища, такие как плоскоклеточный рак, аденокарцинома и меланома; такой рак вульвы, как плоскоклеточный рак, меланома, аденокарцинома, базальноклеточный рак, саркома и болезнь Педжета; рак шейки матки, такой как, без ограничения, плоскоклеточный рак и аденокарцинома; формы рака матки, такие как, без ограничения, рак эндометрия и саркома матки; такой рак яичников, как, без ограничения, эпителиальный рак яичников, пограничная опухоль, герминогенная опухоль и стромальная опухоль; такие формы рака пищевода, как, без ограничения, плоскоклеточный рак, аденокарцинома, аденоидно-кистозная карцинома, мукоэпидермоидная карцинома, аденосквамозная карцинома, саркома, меланома, плазмоцитомы, веррукозная карцинома и карцинома мелких клеток; такой рак желудка, как, без ограничения, аденокарцинома, некротическое (полипозное) изъязвление, поверхностно распространенные, диффузно распространяющиеся злокачественные лимфомы, липосаркома, фибросаркома и карциносаркома; формы рака толстой кишки; формы рака прямой кишки; такие формы рака печени, как, без ограничения, гепатоцеллюлярная карцинома и гепатобластома; такие формы рака желчного пузыря, как аденокарцинома; такие холангиокарциномы, как, без ограничения, папиллярная, узловая и диффузная; такие формы рака легких, как немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный рак (эпидермоидная карцинома), аденокарцинома, крупноклеточная карцинома и мелкоклеточный рак легкого; такой рак яичка, как, без ограничения, зародышевая опухоль, семинома, анапластическая, классическая (типичная), сперматоцитарная, несеминозная, эмбриональная карцинома, тератома, хориокарцинома (опухоль желточного мешка), такой рак предстательной железы, как, без ограничения, интраэпителиальная неоплазия предстательной железы аденокарцинома, лейомиосаркома и рабдомиосаркома; формы рака полового члена; такой рак полости рта, как, без ограничения, плоскоклеточный рак; базальный рак; такие формы рака слюнных желез, как, без ограничения, аденокарцинома, мукоэпидермоидная карцинома и аденоидно-кистозная карцинома; такой рак глотки, как, без ограничения, плоскоклеточный рак и веррукоз; такие формы рака кожи, как, без ограничения, базальноклеточный рак, плоскоклеточный рак и меланома, меланома с поверхностным распространением, узелковая меланома, злокачественная меланома лентиго, акральная лентигозная меланома; такие формы рака почек, как, без ограничения, почечно-клеточная карцинома, аденокарцинома, гипернефрома, фибросаркома, переходно-

клеточный рак (почечной лоханки и/или мочеточника); опухоль Вильмса; такие формы рака мочевого пузыря, как, без ограничения, переходно-клеточная карцинома, плоскоклеточный рак, аденокарцинома, карциносаркома. Кроме того, формы рака включают в себя злокачественную миксому, липосаркому, остеогенную саркому, эндотелиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, мезотелиому, синовиому, гемангиобластому, эпителиальную карциному, цистаденокарциному, бронхогенную карциному, карциному потовых желез, карциному сальной желез, папиллярную карциному и папиллярные аденокарциномы (обзор таких нарушений, смотрите Fishman et al., 1985, *Medicine*, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America).

Нацеленные на MSLN триспецифические белки по настоящему раскрытию также применимы для лечения или профилактики различных форм рака или других патологических пролиферативных заболеваний, включая в себя (без ограничения) следующие: карцинома, включая в себя мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почек, печени, легких, яичников, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы и кожи; включая в себя плоскоклеточную карциному; гематопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, включая в себя лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Беркитта; гематопоэтические опухоли миелоидного происхождения, включая в себя острые и хронические миелогенные лейкозы и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимального происхождения, включая в себя фибросаркому и рабдомиосаркому; другие опухоли, включая в себя меланому, семиному, тератокарциному, нейробластому и глиому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая в себя астроцитому, нейробластому, глиому и шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая в себя фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая в себя меланому, пигментную ксеродерму, кератоактантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному. Также предполагается, что формы рака, вызванные абберациями при апоптозе, также будут лечиться способами и композициями по настоящему раскрытию. Такие формы рака могут включать в себя, без ограничения, фолликулярные лимфомы, карциномы с мутациями p53, гормонозависимые опухоли молочной железы, предстательной железы и яичника и предраковые поражения, такие как семейный аденоматозный полипоз и миелодиспластические синдромы. Согласно конкретным вариантам осуществления злокачественные или диспролиферативные

изменения (такие как метаплазии и дисплазии) или гиперпролиферативные нарушения лечат или предотвращают в коже, легких, толстой кишке, молочной железе, простате, мочевом пузыре, почках, поджелудочной железе, яичнике или матке. Согласно другим конкретным вариантам осуществления саркому, меланому или лейкоз лечат или предупреждают.

Как используется в настоящем документе, согласно некоторым вариантам осуществления «лечение» или «подвергаемый лечению» или «подвергнутый лечению» относится к терапевтическому лечению, в котором целью является замедление (уменьшение) нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания или получение положительных или желаемых клинических результатов. Для описанных в настоящем изобретении целей положительные или желательные клинические результаты включают в себя, без ограничения, ослабление симптомов; уменьшение степени состояния, нарушения или заболевания; стабилизация (т.е. не ухудшение) состояния, нарушения или заболевания; задержку в начале или замедление прогрессирования состояния, нарушения или заболевания; улучшение состояния, нарушения или болезненного состояния; и ремиссию (частичную или полную), определяемую или не обнаруживаемую, или улучшение состояния, нарушения или заболевания. Лечение предусматривает выявление клинически значимого ответа без чрезмерных уровней побочных эффектов. Лечение также предусматривает продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Согласно дополнительным вариантам осуществления «лечение» или «подвергаемый лечению» или «подвергнутый лечению» относится к профилактическим мерам, в которых цель состоит в том, чтобы отсрочить наступление или уменьшить тяжесть нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания, такого как, например, у человека, который предрасположен к заболеванию (например, человек, который несет генетический маркер для заболевания, такого как рак молочной железы).

Согласно некоторым вариантам осуществления описанных в настоящем документе способов описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки вводят в комбинации со средством для лечения конкретного заболевания, нарушения или состояния. Средства включают в себя, без ограничения, терапию, включающую в себя антитела, небольшие молекулы (например, химиотерапевтические средства), гормоны (стероидные, пептидные и т.п.), радиотерапию ( $\gamma$ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов, микроволны, УФ-излучение и т.п.), генную терапию (например, антисмысловую, ретровирусную терапию и т.п.) и другие иммунотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем

документе нацеленный на MSLN триспецифический белок вводят в комбинации с противодиарейными средствами, противорвотными средствами, анальгетиками, опиоидами и/или нестероидными противовоспалительными средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе нацеленный на MSLN триспецифический белок вводят в комбинации с противораковыми средствами. Неограничивающие примеры противораковых средств, которые можно использовать согласно различным вариантам осуществления настоящего раскрытия, включая в себя фармацевтические композиции и лекарственные формы и наборы по настоящему раскрытию, включают в себя следующие: ацивицин; акларубицин; акодазола гидрохлорид; акронин; адозелезин; алдеслейкин; алтретамин; амбомицин; аметантрона ацетат; аминоклютетимид; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназа; асперлин; азацитидин; азетепа; азотомицин; батимаSTAT; бензодепа; бикалутамид; бисантрена гидрохлорид; биснафида димезилат; бизелезин; блеомицина сульфат; бреквинар натрия; бропиримин; бусульфан; кактиномицин; калустерон; карацемид; карбетимер; карбоплатин; кармустин; карубицина гидрохлорид; карзелезин; седефингол; хлорамбуцил; циролемицин; цисплатин; кладрибин; криснатола мезилат; циклофосфамид; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; даунорубицина гидрохлорид; децитабин; дексормаплатин; дезагуанин; дезагуанина мезилат; диазиквон; доцетаксел; доксорубицин; доксорубицина гидрохлорид; дролоксифен; дролоксифена цитрат; дромостанолон пропионат; дуазомицин; эдатрексат; эфлорнитина гидрохлорид; элсамитруцин; энлоплатин; энпромаТ; эпипропидин; эпирубицина гидрохлорид; эрбулозол; эзорубицина гидрохлорид; эстрамустин; эстрамустинфосфат натрия; этанидазол; этопозид; этопозида фосфат; этоприн; фадрозол гидрохлорид; фазарабин; фенретинид; флоксуридин; флударабина фосфат; фторурацил; фторцитабин; фосквидон; фостриецин натрия; гемцитабин; гемцитабина гидрохлорид; гидроксимочевина; идарубицина гидрохлорид; ифосфамид; илмофозин; интерлейкин II (включая в себя рекомбинантный интерлейкин II или гIL2), интерферон альфа-2a; интерферон альфа-2b; интерферон альфа-n1; интерферон альфа-n3; интерферон бета-1a; интерферон гамма- 1b; ипроплатин; иринотекана гидрохлорид; ланреотида ацетат; летрозол; леупролида ацетат; лиарозола гидрохлорид; лометрексол натрия; ломустин; лозоксантрона гидрохлорид; масопрокол; майтанзин; мехлорэтамид гидрохлорид; мегестрола ацетат; меленгестрола ацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрия; метоприн; метуредеп; митиндомид; митокарцин; митокромин; митогиллин; митомалцин; митомицин; митоспер; митотан; митоксантрона гидрохлорид; микофеноловая кислота; нокодазол; ногаламицин; ормаплатин; оксисуран; паклитаксел; пегаспаргаза; пелиомицин; пентамустин; пепломицина сульфат;

перфосфамид; пипоброман; пипосульфат; пироксантрона гидрохлорид; пликамицин; пломестан; порфимер натрия; порфирамицин; преднимустин; прокарбазина гидрохлорид; пурамицин; пурамицина гидрохлорид; пирозофурин; рибоприн; роглетимид; сафингол; сафингола гидрохлорид; семустин; симтразен; спарфозат натрия; спарсомицин; спирогермания гидрохлорид; спирумустин; спиролатин; стрептонигрин; стрептозоцин; сулофенур; тализомицин; текогалан натрия; тегафур; телоксантрона гидрохлорид; темпорфин; тенипозид; тероксирон; тестолактон; тиамиприн; тиогуанин; тиотепа; тиазофурин; тирапазамин; торемифена цитрат; трестолон ацетат; трицирибина фосфат; триметрексат; триметрексата глюкуронат; трипторелин; тубузола гидрохлорид; урамустин; уредепа; вапреотид; вертепорфин; винбластина сульфат; винкристина сульфат; виндезин; виндезина сульфат; винепидина сульфат; винглицината сульфат; винлеуросина сульфат; винорелбина тартрат; винрозицина сульфат; винзолицина сульфат; ворозол; зениплатин; зиностатин; зорубицина гидрохлорид. Другие примеры противораковых лекарственных средств включают в себя, без ограничения, следующие: 20-эпи-1,25 дигидроксивитамин D<sub>3</sub>; 5-этинилурацил; абиратерон; акларубицин; ацилфулвен; адецилпенол; адозелезин; альдеслейкин, антагонисты ALL-TK; алтретамин; амбамустин; амидокс; амифостин; аминоклевулиновая кислота; амрубицин; амсакрин; анагрелид; анастрозол; андрографолид; ингибиторы ангиогенеза; антагонист D; антагонист G; антареликс; анти-дорзализационный морфогенетический белок-1; антиандроген, карцинома предстательной железы; антиэстроген; антинеопластон; антисмысловые олигонуклеотиды; афидиколина глицинат; модуляторы гена апоптоза; регуляторы апоптоза; апуриновая кислота; ара-CDP-DL-PTBA; аргининдезаминаза; асулакрин; атаместан; атримустин; аксинастатин 1; аксинастатин 2; аксинастатин 3; азасетрон; азатоксин; азатирозин; производные баккатина III; баланол; батимастат; антагонисты BCR/ABL; бензохлорины; бензоилстауроспорин; бета-лактамы производные; бета-алетин; бетакламицин B; бетулиновая кислота; ингибитор bFGF; бикалутамид; бисантрен; бисазиридирилспермин; биснафид; бистратен A; бизелезин; брефлат; бропиримин; будотитан; бутионина сульфоксимин; кальципотриол; кальфостин C; производные камптотецина; канарипокс IL-2; капецитабин; карбоксамид-амино-триазол; карбоксиамидотриазол; CaRest M3; CARN 700; производная ингибитора хряща; карзелезин; ингибиторы казеинкиназы (ICOS); кастаноспермин; цекропин B; цетрореликс; хлорины; хлорхиноксалина сульфонамид; цикапрост; цис-порфирин; кладрибин; аналоги кломифена; клотримазол; коллисмидин; коллисмидин B; комбретастатин A4; аналог комбретастатина; конагенин; крамбесцидин 816; криснатол; криптофицин 8; производные криптофицина A; курацин A; циклопентантрахиноны; циклоплатам; ципемицин; окфосфат цитарабина; цитолитический фактор; цитостатин; дакликсимаб; децитабин;

дегидродидемнин В; деслорелин; дексаметазон; дексифосфамид; дексразоксан; дексверапамил; диазиквон; дидемнин В; дидокс; диэтилнорспермин; дигидро-5-азацидин; дигидротаксол, 9-; диоксамицин; дифенилспиромустин; доцетаксел; докозанол; доласетрон; доксифлуридин; дролоксифен; дронабинол; дуокармицин SA; эбселен; экомустин; эделфозин; эдреколомаб; эфлорнитин; элемен; эмитефур; эпирубицин; эпристерид; аналог эстрамустина; агонисты эстрогена; антагонисты эстрогена; этанидазол; этопозида фосфат; эксеместан; фадрозол; фазарабин; фенретинид; филграстим; финастерид; флавопиридол; флезеластин; флуастерон; флударабин; фтордауноруницина гидрохлорид; форфенимекс; форместан; фостриецин; фотемустин; гадолиния тексафирина; нитрат галлия; галоцитабин; ганиреликс; ингибиторы желатиназы; гемцитабин; ингибиторы глутатиона; гепсульфам; херегулин; гексаметилен бисацетамид; гиперидин; ибандроновая кислота; идарубицин; идоксифен; идрамантон; илмофозин; иломастат; имидазоакридоны; имиквимод; иммуностимуляторные пептиды; инсулиноподобный ингибитор рецептора фактора-1 роста; агонисты интерферона; интерфероны; интерлейкины; иобенгуан; иододоксорибицин; ипомеанол, 4-; ироплакт; ирзогландин; изобенгазол; изогомогаликондрин В; итасетрон; джасплакинолид, кахалалид F; ламелларин-N триацетат; ланреотид; леинамицин; ленограстим; сульфат лентинана; лептолстатин; летрозол; ингибирующий лейкоз фактор; лейкоцитарный альфа-интерферон; леупролид+эстроген+прогестерон; лейпрорелин; левамизол; лиарозол; аналог линейного полиамина; липофильный пептид дисахарида; липофильные платиновые соединения; лиссоклинамид 7; лобаплатин; ломбрицин; лометрексол; лонидамин; лозоксантрон; ингибитор редуктазы HMG-CoA(такой как, без ограничения, ловастатин; правастатин, флувастатин, статин, симвастатин и аторвастатин); локсорибин; луртотекан; лютеция тексафирина; лизофиллин; литические пептиды; мейтанзин; манностагин А; маримастат; мазопрокол; маспин; ингибиторы матрилизина; ингибиторы матричной металлопротеиназы; меногарил; мербарон; метерелин; метиониназа; метоклопрамид; ингибитор MIF; мифепристон; милтефозин; миримостим; ошибочно спаренная двухцепочечная РНК; митогуазон; митолактол; аналоги митомицина; митонафид; митотоксиновый фактор роста фибробластов-сапорин; митоксантрон; мофаротен; молграмостим; моноклональное антитело, человеческий хорионический гонадотропин; монофосфориллипид A+sk клеточной стенки микобактерии; мопидамол; ингибитор гена множественной лекарственной устойчивости; терапия на основе множественного опухолевого супрессора 1; ипритовое противораковое средство; микапероксид В; экстракт клеточной стенки микобактерии; мирапаторн; N-ацетилдиналин; N-замещенные бензамиды; нафарелин; нагрестип; налоксон+пентазоцин; напавин; нафтерпин;

нартограстим; недаплатин; неморубицин; неридроновая кислота; нейтральная эндопептидаза; нилутамид; низамицин; модуляторы азотного оксида; нитроксидный антиоксидант; нитруллин; Об-бензилгуанин; октреотид; окиценон; олигонуклеотиды; онапристон; ондансетрон; ондансетрон; орацин; пероральный цитокиновый индуктор; ормаплатин; осатерон; оксалиплатин; оксауномицин; паклитаксел; аналоги паклитаксела; производные паклитаксела; палауамин; пальмитоилризоксин; памидроновая кислота; панакситриол; паномифен; парабактин; пазеллиптин; пегаспаргаза; пелдезин; пентозанполисульфат натрия; пентостатин; пентрозол; перфлуброн; перфосфамид; периллиловый спирт; феназиномицин; фенилацетат; ингибиторы фосфатазы; пицибанил; пилокарпина гидрохлорид; пирарубицин; пиритрексим; плацетин А; плацетин В; ингибитор активатора плазминогена; комплексы платины; соединения платины; триамин-платиновый комплекс; порфимер натрия; порфирамицин; преднизолон; пропил бис-акридон; простагландин J2; протеасомные ингибиторы; иммуномодулятор на основе белка А; ингибитор протеинкиназы С; ингибиторы протеинкиназы С, микроводоросли; ингибиторы протеинтирозинфосфатазы; ингибиторы пуриновой нуклеозидфосфорилазы; пурпурины; пиразолоакридин; пиридокселированный конъюгат гемоглобина и полиоксиэтилена; антагонисты  $\gamma\text{af}$ ; ралтитрексед; рамосетрон; ингибиторы фарнезилпротеинтрансферазы  $\text{gas}$ ; ингибиторы  $\text{gas}$ ; ингибитор  $\text{gas-GAP}$ ; деметилованный ретеллиптин; рения Re 186 этидронат; ризоксин; рибозимы; RII ретинамид; роглетимид; рохитукин; ромуртид; рохинимекс; рубигинон B1; рубоксил; сафингол; сейнтопин; SarCNU; саркофитол А; сарграмостим; миметики Sdi 1; семустин; производное ингибитора старения 1; смысловые олигонуклеотиды; ингибиторы передачи сигнала; модуляторы передачи сигнала; одноцепочечный антигенсвязывающий белок; сизофиран; собузоксан; натрия борокапнат; натрия фенилацетат; солверол; связывающий соматомедин белок; сонермин; спарфозовая кислота; спикамицин D; спиромустин; спленопентин; спонгистатин 1; скваламин; ингибитор стволовых клеток; ингибиторы деления стволовых клеток; стипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфинозин; суперактивный вазоактивный кишечный пептидный антагонист; сурадиста; сурамин; свейнзонин; синтетические глюкозаминогликаны; таллимустин; тамоксифена метиодид; тауромустин; тазаротен; текогалан натрия; тегафур; теллурапирил; ингибиторы теломеразы; темопорфин; темозоломид; тенипозид; тетрахлордекаоксид; тетразомин; талибластин; тиокоралин; тромбопоэтин; миметик тромбопоэтина; тималфазин; агонист рецептора тимопоэтина; тимотринан; тиреотропный гормон; олова этилэтиопурпурин; тирапазамин; титаноцена бихлорид; топсентин; торемифен; тотипотентный фактор стволовых клеток; ингибиторы трансляции; третиноин; триацетилуридин; трицирибин; триметрексад; трипторелин;

трописетрон; туростерид; ингибиторы тирозинкиназы; тирфостины; ингибиторы UBC; убенимекс; происходящий из мочеполового синуса ингибирующий фактор роста; антагонисты рецепторов урокиназы; вапреотид; вариолин В; векторная система, эритроцитарная генная терапия; веларесол; верамин; вердинс; вертепорфин; винорелбин; винксалтин; витаксин®; ворозол; занотерон; зениплатин; зиласкорб и стималамер зиностатина. Дополнительными противораковые лекарственные средства представляют собой 5-фторурацил и лейковорин. Эти два средства особенно применимы при использовании в способах, использующих талидомид и ингибитор топоизомеразы. Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленный на MSLN триспецифический белок применяется в сочетании с гемцитабином.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе нацеленные на MSLN триспецифические белки вводят до, во время или после операции.

#### **Способы обнаружения экспрессии мезотелина и диагностики мезотелин-ассоциированного рака**

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего раскрытия предусмотрены наборы для обнаружения экспрессии мезотелина *in vitro* или *in vivo*. Наборы включают в себя указанные нацеленные на MSLN триспецифические белки (например, триспецифический белок, содержащий меченое однодоменное антитело к MSLN или его антигенсвязывающие фрагменты) и одно или более соединений для обнаружения метки. Согласно некоторым вариантам осуществления метка выбрана из группы, состоящей из флуоресцентной метки, ферментной метки, радиоактивной метки, активной метки ядерного магнитного резонанса, люминесцентной метки и хромофорной метки.

В некоторых случаях экспрессия мезотелина обнаруживается в биологическом образце. Образец может представлять собой любой образец, включая в себя, без ограничения, ткани из биопсий, вскрытий и образцов патологии. Биологические образцы также включают в себя срезы тканей, например, замороженные срезы, взятые для гистологических целей. Биологические образцы дополнительно включают в себя жидкости организма, такие как кровь, сыворотка, плазма, мокрота, спинномозговая жидкость или моча. Биологический образец, как правило, получают от млекопитающего, такого как человек или нечеловекообразный примат.

Согласно одному варианту осуществления представлен способ определения, того характеризуется ли субъект наличием рака, путем контактирования образца от субъекта с однодоменным антителом к MSLN, как описано в настоящем изобретении; и обнаружение связывания однодоменного антитела с образцом. Увеличение связывания антитела с

образцом по сравнению со связыванием антитела с контрольным образцом идентифицирует субъекта как больного раком.

Согласно другому варианту осуществления представлен способ подтверждения диагноза рака у субъекта путем контактирования образца от субъекта, у которого диагностирован рак, с однодоменным антителом к MSLN, как описано в настоящем изобретении; и обнаружение связывания антитела с образцом. Увеличение связывания антитела с образцом по сравнению со связыванием антитела с контрольным образцом подтверждает диагноз рака у субъекта.

В некоторых примерах раскрытых способов однодоменное антитело к MSLN триспецифического белка метят прямо.

В некоторых примерах способы дополнительно предусматривают контактирование второго антитела, которое специфически связывается с однодоменным антителом к MSLN с образцом; и обнаружение связывания второго антитела. Увеличение связывания второго антитела с образцом по сравнению со связыванием второго антитела с контрольным образцом выявляет рак у субъекта или подтверждает диагноз рака у субъекта.

В некоторых случаях рак представляет собой мезотелиому, рак простаты, рак легкого, рак желудка, плоскоклеточную карциному, рак поджелудочной железы, холангиокарциному, тройной негативный рак молочной железы или рак яичников или любой другой тип рака, который экспрессирует мезотелин.

В некоторых примерах контрольный образец представляет собой образец от субъекта без рака. В конкретных примерах образец представляет собой образец крови или ткани.

В некоторых случаях антитело, которое связывается (например, специфически связывается) с мезотелином, непосредственно метится обнаруживаемой меткой. Согласно другому варианту осуществления антитело, которое связывается (например, специфически связывается) с мезотелином (первое антитело), является немеченым, и метят второе антитело или другую молекулу, которая может связываться с антителом, которое специфически связывается с мезотелином. Второе антитело выбирают таким, чтобы оно могло специфически связываться с конкретными формами и классами первого антитела. Например, если первое антитело представляет собой IgG лампы, тогда вторичное антитело может представлять собой антитело к IgG лампы. Другие молекулы, которые могут связываться с антителами, включают в себя, без ограничения, белок А и белок G, оба из которых имеются в продаже. Подходящие метки для антитела или вторичного антитела описаны выше и включают в себя различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, магнитные средства и

радиоактивные материалы. Неограничивающие примеры подходящих ферментов включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу. Неограничивающие примеры подходящих комплексов простетических групп включают в себя стрептавидин/биотин и авидин/биотин. Неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных материалов включают в себя умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин. Неограничивающим иллюстративным люминесцентным материалом является люминол; неограничивающим иллюстративным магнитным средством является гадолиний, а неограничивающие иллюстративные радиоактивные метки включают в себя  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^3\text{H}$ .

Согласно альтернативному варианту осуществления мезотелин может быть проанализирован в биологическом образце с помощью конкурентного иммуноанализа с использованием стандартов мезотелина, меченных обнаруживаемым веществом и немеченым антителом, которое специфически связывается с мезотелином. В этом анализе биологический образец, меченые стандарты мезотелина и антитело, которые специфически связываются с мезотелином, объединяют и определяют количество меченого стандарта мезотелина, связанного с немеченым антителом. Количество мезотелина в биологическом образце обратно пропорционально количеству меченого стандарта мезотелина, связанного с антителом, которое специфически связывается с мезотелином.

Раскрытые в настоящем документе иммуноанализ и способ могут использоваться для ряда целей. Согласно одному варианту осуществления антитело, которое специфически связывается с мезотелином, можно использовать для обнаружения производства мезотелина в клетках в клеточной культуре. Согласно другому варианту осуществления антитело может быть использовано для определения количества мезотелина в биологическом образце, таком как образец ткани или образец крови или сыворотки. В некоторых примерах мезотелин представляет собой мезотелин клеточной поверхности. В других примерах мезотелин представляет собой растворимый мезотелин (например, мезотелин в супернатанте клеточной культуры или растворимый мезотелин в образце жидкости организма, таком как образец крови или сыворотки).

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен набор для обнаружения мезотелина в биологическом образце, таком как образец крови или образец ткани. Например, чтобы подтвердить диагноз рака у субъекта, может быть выполнена биопсия для получения образца ткани для гистологического исследования. Альтернативно, может быть получен образец крови для обнаружения присутствия растворимого белка или фрагмента мезотелина. Наборы для обнаружения полипептида, как правило, содержат однодоменное

антитело, согласно настоящему раскрытию, которое специфически связывается с мезотелином. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент антитела, такой как фрагмент scFv, домен VH или Fab, включен в набор. В следующем варианте осуществления антитело мечено (например, флуоресцентной, радиоактивной или ферментативной меткой).

Согласно одному варианту осуществления набор включает в себя инструктивные материалы, раскрывающие способы применения связывающего мезотелин антитела. Инструктивные материалы могут быть написаны в электронном виде (например, компьютерная дискета или компакт-диск) или могут быть визуальными (например, видеофайлы). Наборы могут также включать в себя дополнительные компоненты для облегчения конкретного применения, для которого предназначен набор. Таким образом, например, набор может дополнительно содержать средства обнаружения метки (например, ферментные субстраты для ферментативных меток, наборы фильтров для обнаружения флуоресцентных меток, соответствующие вторичные метки, такие как вторичное антитело или т.п.). Наборы могут дополнительно включать в себя буферы и другие реагенты, как правило, используемые для практики конкретного способа. Такие наборы и соответствующее содержимое хорошо известны специалистам в настоящей области техники.

Согласно одному варианту осуществления диагностический набор содержит иммуноанализ. Хотя детали иммуноанализов могут варьировать в зависимости от конкретного используемого формата, способ обнаружения мезотелина в биологическом образце, как правило, включает в себя стадии контакта биологического образца с антителом, которое специфически реагирует в иммунологически реактивных условиях с полипептидом мезотелина. Антитело может специфически связываться в иммунологически реактивных условиях с образованием иммунного комплекса, и присутствие иммунного комплекса (связанного антитела) выявляется прямо или косвенно.

Способы определения наличия или отсутствия маркера клеточной поверхности хорошо известны в настоящей области техники. Например, антитела могут быть конъюгированы с другими соединениями, включая в себя, без ограничения, ферменты, магнитные шарики, коллоидные магнитные шарики, гаптены, флуорохромы, соединения металлов, радиоактивные соединения или лекарственные средства. Антитела также могут быть использованы в иммуноанализах, таких как, без ограничения, радиоиммунологические анализы (RIA), ELISA или иммуногистохимические анализы. Антитела также можно использовать для сортировки флуоресцентно-активируемых клеток (FACS). FACS использует множество цветовых каналов, каналов обнаружения светорассеиванием под малым и тупым углом и каналов импеданса, среди других более

сложных уровней обнаружения, для разделения или сортировки клеток (смотрите патент США № 5061620). Любое из однодоменных антител, которые связываются с мезотелином, как описано в настоящем изобретении, можно использовать в этих анализах. Таким образом, антитела можно использовать в обычном иммуноанализе, включая в себя, без ограничения, ELISA, RIA, FACS, тканевую иммуногистохимию, вестерн-блоттинг или иммунопреципитацию.

## ПРИМЕРЫ

### **Пример 1: Способы оценки связывающей и цитотоксической активности нескольких иллюстративных нацеленных на MSLN триспецифических антигенсвязывающих белков**

#### *Производство белка*

Последовательности триспецифических молекул клонировали в вектор экспрессии pCDNA 3.4 млекопитающих (Invitrogen), которым предшествовала лидерная последовательность, а затем следовала бх гистидиновая метка. Клетки Expi293F (Life Technologies A14527) поддерживали в суспензии в колбах оптимального роста (Thomson) в диапазоне от 0,2 до  $8 \times 10^6$  клеток/мл в среде Expi 293. Очищенную плазмидную ДНК трансфицировали в клетки Expi293 в соответствии с протоколами Expi293 Expression System Kit (Life Technologies, A14635) и хранили в течение 4-6 дней после трансфекции. Количество исследуемых иллюстративных триспецифических белков в кондиционированной среде из трансфицированных клеток Expi293 количественно определяли с использованием прибора Octet с наконечниками с белком А и с использованием контрольного триспецифического белка для стандартной кривой.

#### *Анализ цитотоксичности*

Анализ опосредованной Т-клетками человека цитотоксичности (TDCC) использовали для измерения способности захватчиков Т-клеток, включая в себя триспецифические молекулы, направлять Т-клетки на уничтожение опухолевых клеток (Nazarian et al. 2015. J Biomol Screen. 20:519-27). В этом анализе Т-клетки и клеточные линии целевых опухолевых клеток смешивают вместе в соотношении 10:1 в 384-луночном планшете и добавляют различные количества исследуемых триспецифических белков. Линии опухолевых клеток конструируют для экспрессии белка люциферазы. Через 48 часов для количественного определения оставшихся жизнеспособных опухолевых клеток использовали люминесцентный анализ Steady-Glo® (Promega).

В настоящем исследовании титры кондиционированной среды добавляли в анализы TDCC (Т-клеточно-опосредованные анализы цитотоксичности), чтобы оценить, способно ли однодоменное антитело к MSLN образовывать синапс между Т-клетками и экспрессирующей мезотелин клеточной линией рака яичника, OVCAR8. Жизнеспособность клеток OVCAR8 измеряли через 48 часов. Было видно, что триспецифические белки опосредуют уничтожение Т-клетками. На **фиг. 2** показан пример анализа жизнеспособности клеток с использованием исследуемых триспецифических белков 2A2 и 2A4.  $EC_{50}$  для активности TDCC исследуемых триспецифических белков перечислены ниже в таблице 1.

**Таблица 1: TDCC-активность нацеленных на MSLN триспецифических белков (TriTAC)**

TriTAC к MSLN	Средняя $EC_{50}$ [M]
2A2	1,6E-12
2A4	1,9E-09
11F3	2,2E-12
5D4	1,0E-09
9H2	1,1E-12
5C2	1,5E-12
5G2	3,6E-09
10B3	1,4E-12
2F4	7,3E-13
2C2	9,5E-09
5F2	5,3E-12
7C4	1,0E-08
7F1	2,4E-12
5D2	1,4E-11
6H2	2,0E-09
2D1	5,2E-11
12C2	8,0E-13
3F2	2,4E-08
1H2	2,5E-08
6F3	8,2E-10
2A1	1,2E-09
3G1	4,0E-09
12D1	1,1E-09
5H1	5,9E-12
4A2	1,7E-09
3B4	1,8E-12
7H2	5,5E-12
9F3	>1E-7
9B1	>1E-7

Кроме того, было отмечено, что активность TDCC исследуемых нацеленных на MSLN триспецифических белков специфична в отношении клеток, экспрессирующих мезотелин, поскольку исследуемые триспецифические белки не опосредуют уничтожение Т-клеток LNCaP, которые не экспрессируют мезотелин. Триспецифические белки 2A2, 11F3, 9H2, 5C2, 10B3, 2F4, 5F2, 7F1, 2F4, 5H1, 3B4 и 7H2, в частности, не проявляли активности TDCC с клетками Lncap.

### **Пример 2: Ксенотрансплантатная модель опухоли**

Нацеленные на MSLN триспецифические белки предыдущего примера оценивают на ксенотрансплантатной модели.

Самок иммунодефицитных мышей NOD/scid облучают сублетально (2 Гр) и подкожно инокулируют  $1 \times 10^6$  клеток NCI-H28 в их правый дорсальный бок. Когда опухоли достигают 100-200 мм<sup>3</sup>, животных распределяют на 3 группы лечения. Группам 2 и 3 (по 8 животных в каждой) внутрибрюшинно вводят  $1,5 \times 10^7$  активированных Т-клеток человека. Три дня спустя животным из группы 3 затем вводят в общей сложности 9 внутривенных доз 50 мкг триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN из примера 1 (qdx9d). Группы 1 и 2 получают только наполнитель. Массу тела и объем опухоли определяют в течение 30 дней.

Как и ожидалось, животные, получавшие нацеленные на MSLN триспецифические белки предыдущих примеров, характеризуются статистически значимой задержкой роста опухоли по сравнению с соответствующей контрольной группой, получавшей наполнитель.

### **Пример 3: Протокол клинического испытания для подтверждения концепции введения триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN из примера 1 пациентам с раком яичников.**

Это фаза I/II клинического испытания для изучения триспецифического антигенсвязывающего белка MSLN из примера 1 в качестве лечения рака яичника.

Результаты исследования:

*Первичные:* Максимально переносимая доза нацеленных на MSLN триспецифических белков из предыдущих примеров.

*Вторичные:* Определить, связан ли ответ *in vitro* нацеленных на MSLN триспецифических белков из предыдущих примеров с клиническим ответом

#### **Фаза I**

Максимальная переносимая доза (MTD) будет определена в разделе фазы I клинического испытания.

1.1 Максимальная переносимая доза (MTD) будет определена в разделе фазы I клинического испытания.

1.2. Пациенты, которые удовлетворяют критериям приемлемости, будут включены в клиническое испытание нацеленных на MSLN триспецифических белков предыдущих примеров.

1.3 Цель состоит в том, чтобы определить самую высокую дозу нацеленных на MSLN триспецифических белков из предыдущих примеров, которую можно безопасно вводить без серьезных или неуправляемых побочных эффектов у участников. Данная доза будет зависеть от количества участников, которые были включены в исследование до этого, и от того, насколько хорошо переносилась доза. Не все участники получают одинаковую дозу.

## **Фаза II**

2.1 В последующем разделе фазы II будет проведено лечение при MTD с целью определения того, приводит ли терапия с терапией нацеленными на MSLN триспецифическими белками из предыдущих примеров, по меньшей мере к 20% ответа.

Первичный результат для Фазы II --- Определить, приводит ли терапия нацеленными на MSLN триспецифическими белками из предыдущих примеров, по меньшей мере к тому, что 20% пациентов достигают клинического ответа (бластный ответ, незначительный ответ, частичный ответ или полный ответ).

### **Пригодность пациентов к участию в исследовании:**

Гистологически подтвержденный рак яичников в соответствии с действующей классификацией Всемирной организации здравоохранения, 2014 г.

Поверхностные эпителиально-стромальные опухоли

Опухоли стромы полового тяжа яичников

Герминогенные опухоли

Злокачественные, не указанные конкретно

Возраст  $\geq 18$  лет

Ожидаемая продолжительность жизни  $\geq 6$  недель

Несмотря на то, что предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были показаны и описаны в настоящем документе, специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в настоящей области техники очевидно, что будут происходить многочисленные вариации, изменения и замены без отступления от настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и что

таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема этой формулы изобретения и их эквивалентов.

**Пример 4: МН6Т TriTAC направляет Т-клетки на уничтожение экспрессирующих MSLN раковых клеток яичника.**

Анализ Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности человека (TDCC) использовали для измерения способности захватчиков Т-клеток, включающих в себя триспецифические молекулы, направлять Т-клетки на уничтожение опухолевых клеток (Nazarian et al. 2015. J Biomol Screen. 20:519-27). Клетки Саov3, использованные в этом анализе, конструировали для экспрессии люциферазы. Т-клетки от 5 различных здоровых доноров (донор 02, донор 86, донор 41, донор 81 и донор 34) и раковые клетки-мишени Саov3 смешивали вместе, и добавляли различные количества иллюстративной триспецифической молекулы по настоящему раскрытию, МН6Т TriTAC (SEQ ID NO: 98), и смесь инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C. Клетки Саov3 и Т-клетки также инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C с контрольной триспецифической молекулой GFP TriTAC (SEQ ID NO: 99), которая нацелена на GFP. Через 48 часов оставшиеся жизнеспособные опухолевые клетки количественно определяли с помощью люминесцентного анализа.

Было отмечено, что молекула МН6Т TriTAC могла направлять Т-клетки от всех 5 здоровых доноров на уничтожение раковых клеток-мишеней Саov3 (как показано на **фиг. 3**), тогда как контрольная молекула GFP TriTAC не была способна направить Т-клетки от любого из 5 здоровых доноров на уничтожение клеток Саov3 (также показано на **фиг. 3**).

Дальнейший анализ с использованием того же протокола, который описан выше, проводили с использованием клеток OVCAR3. Было отмечено, что молекула МН6Т TriTAC была способна направлять Т-клетки от всех 5 здоровых доноров на уничтожение раковых клеток-мишеней OVCAR3 (как показано на **фиг. 4**), тогда как контрольная молекула GFP TriTAC не была способна направлять Т-клетки от любого из 5 здоровых доноров на уничтожение клеток OVCAR3 (также показано на **фиг. 4**).

Значения EC50 для уничтожения клеток-мишеней, экспрессирующих MSLN, перечислены ниже в **таблице II**.

**Таблица II: Значения EC50 для направленного МН6Т TriTAC уничтожения экспрессирующих MSLN клеточных линий рака яичника Т-клетками от 5 различных здоровых доноров. Типичные графики необработанных данных представлены на фиг. 3 и 4.**

	Значения EC50 (M)
--	-------------------

	Донор 02	Донор 86	Донор 41	Донор 81	Донор 35
<b>Caov3</b>	6,0E-13	6,8E-13	3,9E-13	5,9E-13	4,6E-13
<b>Caov4</b>	7,3E-12	1,1E-11	3,7E-12	4,7E-12	2,2E-12
<b>OVCAR3</b>	1,6E-12	2,5E-12	1,4E-12	1,6E-12	1,3E-12
<b>OVCAR8</b>	2,2E-12	3,2E-12	1,4E-12	1,9E-12	1,7E-12

**Пример 5: МН6Т TriTAC направляет Т-клетки на уничтожение клеток, экспрессирующих MSLN, но не клеток, которые не экспрессируют MSLN**

В этом анализе Т-клетки от здорового донора инкубировали с раковыми клетками-мишенями, которые экспрессируют MSLN (клетки Caov3, клетки Caov4, клетки OVCAR3 и клетки OVCAR8) или раковыми клетками-мишенями, которые не экспрессируют MSLN (клетки NCI-H510A, клетки MDAPCa2b). Каждая из клеток-мишеней, использованных в этом исследовании, была разработана для экспрессии люциферазы. Различные количества молекулы МН6Т TriTAC (SEQ ID NO: 98), добавляли к смеси Т-клеток и раковых клеток-мишеней, перечисленных выше. Смесь инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C. Через 48 часов оставшиеся жизнеспособные клетки-мишени количественно оценивали с использованием люминесцентного анализа.

Было отмечено, что молекула МН6Т TriTAC была способна направлять Т-клетки на уничтожение экспрессирующих MSLN раковых клеток-мишеней (т.е. клеток Caov3, Caov4, OVCAR3 и OVCAR8, как показано на **фиг. 5**). Однако, молекула МН6Т TriTAC не была способна направлять Т-клетки на уничтожение неэкспрессирующих MSLN раковых клеток-мишеней (клетки MDAPCa2b и NCI-H510A), также показанных на **фиг. 5**.

Значения EC<sub>50</sub> для уничтожения экспрессирующих MSLN раковых клеток приведены ниже в **таблице III**.

**Таблица III: Значения EC<sub>50</sub> для направленного МН6Т TriTAC уничтожения Т-клетками экспрессирующих MSLN линий раковых клеток.**

Происхождение опухоли	Клеточная линия	EC <sub>50</sub> (пМ)	Сайты MSLN на клетку
<b>Яичник</b>	Caov3	0,6	51262
	Caov4	7,3	101266
	OVCAR3	1,6	40589
	OVCAR8	2,2	40216
	SKOV3	3,6	10617

<b>Поджелудочная железа</b>	Hs766T	7,8	5892
	CaPan2	3,2	27413
	HPaFII	15	17844
<b>NSCLC</b>	NCI-H596	1,5	103769
	NCI-H292	3,8	5977
	NCI-H1563	2,6	17221
<b>Мезотелиома</b>	NCI-H2052	8,0	Не определены
	NCI-H2452	2,3	Не определены
<b>Сконструированные (неопухолевые)</b>	HEK293, экспрессирующие MSLN человека	0,9	128091
	HEK293, экспрессирующие MSLN яванского макака	0,7	140683

**Пример 6: МН6Т TriTAC направляли Т-клетки от яванского макака на уничтожение клеточных линий рака яичника человека.**

В этом анализе мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC; Т-клетки представляют собой компонент PBMC) от донора яванского макака смешивали с раковыми клетками-мишенями, которые экспрессируют MSLN (клетки CaOV3 и клетки OVCAR3) и к смеси добавляли различные количества молекулы МН6Т TriTAC (SEQ ID NO: 98) и инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C. Параллельно смесь PBMC яванского макака и экспрессирующих MSLN клеток, как указано выше, инкубировали с различными количествами контрольной молекулы TriTAC GFP TriTAC (SEQ ID NO: 99), которая нацелена на GFP, в течение 48 часов при температуре 37°C. Раковые клетки-мишени, использованные в этом анализе, были сконструированы для экспрессии люциферазы. Через 48 часов оставшиеся жизнеспособные клетки-мишени количественно определяли с использованием люминесцентного анализа.

Было отмечено, что молекула МН6Т TriTAC была способна эффективно направлять PBMC яванского макака на уничтожение экспрессирующих MSLN клеток (т.е. Caov3 и OVCAR), как показано на **фиг. 6**, тогда как контрольная молекула GFP TriTAC не была способна направлять PBMC яванского макака на уничтожение клеток (также показано на **фиг. 6**). Значения EC<sub>50</sub> для молекулы МН6Т TriTAC составляли 2,9 пМ для клеток OVCAR3 и 3,0 пМ для клеток Caov3, которые существенно не отличались от значений EC<sub>50</sub>, наблюдаемых с Т-клетками человека, как показано в таблице II.

**Пример 7: Молекула МН6Т TriTAC направляла уничтожение экспрессирующих MSLN клеток мезотелиомы NCI-H2052 Т-клетками в присутствии или в отсутствие человеческого сывороточного альбумина**

Целью настоящего исследования было оценить, влияло ли связывание с человеческим сывороточным альбумином (HSA) посредством молекулы МН6Т TriTAC на способность молекулы МН6Т TriTAC направлять Т-клетки на уничтожение экспрессирующих MSLN клеток. Клетки мезотелиомы NCI-H2052, использованные в этом исследовании, были сконструированы для экспрессии люциферазы. Т-клетки от здорового донора и экспрессирующие MSLN клетки (NCI-H2052) смешивали и в смесь добавляли различные количества молекулы МН6Т TriTAC (SEQ ID NO: 98). Смесь инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C в присутствии или в отсутствие HSA. Смесь клеток NCI-H2052 и Т-клеток также инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C с контрольной триспецифической молекулой GFP TriTAC (SEQ ID NO: 99), которая нацелена на GFP, в присутствии или в отсутствие HSA. Через 48 часов оставшиеся жизнеспособные клетки-мишени количественно определяли с использованием люминесцентного анализа.

Было отмечено, что молекула МН6Т TriTAC была способна эффективно направлять Т-клетки на уничтожение клеток NCI-H2052 (как показано на **фиг. 7**) в присутствии или в отсутствие HSA, тогда как контрольная молекула GFP TriTAC не смогла это сделать (также показано на **фиг. 7**). Также было отмечено, что в присутствии HSA значение EC<sub>50</sub> для уничтожения клеток увеличивалось приблизительно в 3,2 раза (как показано в **таблице IV**).

Дополнительные анализы TDCC проводили с молекулой МН6Т TriTAC в присутствии или в отсутствие HSA в концентрации 15 мг/мл, с дополнительными линиями клеток, экспрессирующих MSLN, и значения EC<sub>50</sub> представлены в **таблице IV**.

**Таблица IV: Значения EC<sub>50</sub> для направленного МН6Т TriTAC уничтожения экспрессирующих MSLN раковых клеток Т-клетками в присутствии или в отсутствие HSA**

Клеточная линия	EC <sub>50</sub> без HSA (пМ)	EC <sub>50</sub> с HSA (пМ)	Сдвиг EC <sub>50</sub> (разы)
OVCAR8	2,7	8,7	3,2
SKOV3	3,9	11	2,8
NCI-H2052	8,0	26	3,2
NCI-H24522	2,3	6,3	2,7
Caov3	0,8	3,6	4,3

OVCAR3	1,6	3,8	2,4
--------	-----	-----	-----

**Пример 8: Т-клетки от 4 разных доноров секретируют TNF- $\alpha$  в присутствии МН6Т TriTAC и экспрессирующих MSLN клеток Саov4**

Раковые клетки-мишени СаOv4, использованные в этом анализе, были сконструированы для экспрессии люциферазы. В этом анализе Т-клетки от 4 различных здоровых доноров (донор 02, донор 86, донор 35 и донор 81) и клетки Саov4 смешивали вместе и добавляли различные количества молекулы МН6Т TriTAC (SEQ ID NO: 98) и смесь инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C. Клетки Саov4 и Т-клетки также инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C с контрольной триспецифической молекулой GFP TriTAC (SEQ ID NO: 99), которая нацелена на GFP. Кондиционированную среду из анализа TDCC собирали за 48 часов до измерения жизнеспособности раковых клеток-мишеней с использованием анализа люминесценции. Концентрацию TNF- $\alpha$  в кондиционированной среде измеряли с использованием набора для анализа AlphaLISA (Perkin Elmer).

Было отмечено, что TNF- $\alpha$  секретируется в среду в присутствии клеток Саov4 и молекулы МН6Т TriTAC, но не в присутствии клеток Саov4 и контрольной молекулы GFP TriTAC, как показано на **фиг. 8**.

Кроме того, эффективное уничтожение наблюдали с Т-клетками от всех 4 здоровых доноров в присутствии молекулы МН6Т TriTAC, но не в присутствии контрольной молекулы TriFP TF GFP. Анализы TDCC также проводили для дополнительных линий клеток, экспрессирующих MSLN (клетки Саov3, клетки OVCAR3 и клетки OVCAR8), и наблюдалась сходная экспрессия TNF- $\alpha$ . Значения EC<sub>50</sub> для индуцированной МН6Т TriTAC экспрессии TNF- $\alpha$  представлена в таблице V. Однако, когда анализ проводили с использованием раковых клеток, которые не экспрессируют MSLN (клетки NCI-H510A или клетки MDAPCa2b), не было обнаружено направленной МН6Т TriTAC секреции TNF- $\alpha$  (данные не показаны). Таким образом, это исследование продемонстрировало, что молекула МН6Т TriTAC способна активировать Т-клетки в присутствии экспрессирующих MSLN раковых клеток-мишеней.

**Таблица V: Значения EC<sub>50</sub> для индуцированной молекулой МН6Т TriTAC экспрессии TNF- $\alpha$  Т-клетками от 4 различных доноров Т-клеток и 4 различных линий клеток, экспрессирующих MSLN**

	Значения EC <sub>50</sub> TNF $\alpha$ (M)			
	МН6Т TriTAC	МН6Т TriTAC	МН6Т TriTAC	МН6Т TriTAC

	Донор 2	Донор 86	Донор 35	Донор 81
Caov3	5,2E-12	5,4E-12	5,9E-12	4,9E-12
Caov4	7,2E-12	6,0E-12	5,5E-12	5,5E-12
OVCAR3	9,2E-12	4,0E-12	1,7E-11	8,9E-12
OVCAR8	1,3E-11	9,1E-12	5,1E-12	5,0E-12

**Пример 9: Активация экспрессии CD69 на Т-клетках от 4 разных доноров в присутствии МН6Т TriTAC и экспрессирующих MSLN клеток OVCAR8.**

Клетки OVCAR8, использованные в этом анализе, были сконструированы для экспрессии люциферазы. В этом анализе Т-клетки от 4 различных здоровых доноров (донор 02, донор 86, донор 35 и донор 81) и клетки OVCAR8 смешивали вместе и добавляли различные количества молекулы МН6Т TriTAC (SEQ ID NO: 98), и смесь инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C. Клетки OVCAR8 и Т-клетки также инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C с контрольной триспецифической молекулой GFP TriTAC (SEQ ID NO: 99), которая нацелена на GFP. Через 48 часов Т-клетки собирали и экспрессию CD69 на Т-клетках измеряли проточной цитометрией.

Экспрессию CD69 обнаруживали на Т-клетках от всех 4 здоровых доноров в присутствии клеток OVCAR8 и молекулы МН6Т TriTAC, но не в присутствии отрицательного контроля GFP TriTAC и клеток OVCAR8, как показано на **фиг. 9**. Анализы TDCC также проводили для дополнительных клеток, экспрессирующих MSLN (клетки Caov3, клетки OVCAR3 и клетки OVCAR8), и наблюдали аналогичную экспрессию CD69. Значения EC<sub>50</sub> для индуцированной МН6Т TriTAC активации CD69 в клетках Caov3 и клетках OVCAR8, представлены в **таблице VI**.

**Таблица VI: Значения EC<sub>50</sub> для активации экспрессии CD69 на Т-клетках от 4 различных доноров в присутствии молекулы МН6Т TriTAC и экспрессирующих MSLN клеток OVCAR8 или клеток Caov3.**

	Caov3	OVCAR8
<b>Таблица EC<sub>50</sub></b>	CD69 (M)	CD69 (M)
Донор 35	~ 1,5E-13	1,4E-13
Донор 2	2,5E-13	4,2E-13
Донор 81	2,5E-13	2,5E-13
Донор 86	3,7E-13	3,7E-13

Когда анализ проводили с использованием раковых клеток, которые не экспрессируют MSLN (клетки NCI-H510A или клетки MDAPCa2b), не наблюдали индуцированной МН6Т активации CD69 (данные не показаны). Таким образом, это исследование продемонстрировало, что молекула МН6Т TriTAC способна активировать Т-клетки в присутствии экспрессирующих MSLN раковых клеток-мишеней.

**Пример 10: Измерение связывания МН6Т TriTAC с линиями клеток, экспрессирующих/не экспрессирующих MSLN**

Для этого исследования определенные раковые клетки-мишени, которые экспрессируют MSLN (клетки Caov3, клетки CaOV4, клетки OVCAR3 и клетки OVCAR8) и некоторые раковые клетки, которые не экспрессируют MSLN (клетки MDAPCa2b и клетки NCI-H510A), инкубировали с молекулой МН6Т TriTAC (SEQ ID NO: 98) или контрольной молекулой GFP TriTAC (SEQ ID NO: 99). После инкубации клетки промывали для удаления несвязанных молекул TriTAC МН6Т или GFP и затем инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с Alexa Fluor 647, которое способно распознавать анти-альбуминовый домен в молекулах TriTAC. Связывание МН6Т TriTAC или GFP TriTAC с клетками, экспрессирующими MSLN или не экспрессирующими MSLN, измеряли проточной цитометрией.

Наблюдалось устойчивое связывание молекулы МН6Т TriTAC с клеточными линиями, которые экспрессируют MSLN (Caov3, Caov4, OVCAR3 и OVCAR8), как видно на **фиг. 10А** (на верхней левой панели показано связывание МН6Т TriTAC с клетками Caov3; на верхней правой панели показано связывание МН6Т TriTAC с клетками Caov4, на нижней левой панели показано связывание МН6Т TriTAC с клетками OVCAR3; на нижней правой панели показано связывание МН6Т TriTAC с клетками OVCAR8); и связывание не наблюдалось в клеточных линиях, которые не экспрессируют MSLN (на левой панели показано отсутствие связывания МН6Т TriTAC с клетками MDAPCa2b, а на правой панели показано отсутствие связывания МН6Т TriTAC с клетками NCI-H510A), как показано на **фиг. 10В**. Кроме того, никакого связывания не наблюдалось, когда клетки любого из типов инкубировали с молекулой GFP TriTAC, как показано на обеих **фиг. 10А** и **10В**.

**Пример 11: Измерение связывания МН6Т TriTAC с Т-клетками доноров.**

Для этого исследования Т-клетки от 4 здоровых доноров инкубировали с молекулой МН6Т TriTAC (SEQ ID NO: 98) или буфером в качестве отрицательного контроля. После инкубации клетки промывали для удаления несвязанных молекул МН6Т TriTAC и затем инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с Alexa Fluor 647, которое было способно распознавать домен анти-альбумина в молекуле МН6Т TriTAC. Связывание МН6Т TriTAC с клетками измеряли проточной цитометрией.

Надежное связывание МН6Т TriTAC наблюдалось с Т-клетками от всех четырех доноров, обработанных молекулой МН6Т TriTAC, как показано на **фиг.11** (на верхней левой панели показано связывание МН6Т TriTAC с Т-клетками донора 2; на верхней правой панели показано связывание МН6Т TriTAC с Т-клетками донора 35; на нижней левой панели показано связывание МН6Т TriTAC с Т-клетками донора 41; на нижней правой панели показано связывание МН6Т TriTAC с Т-клетками донора 81).

**Пример 12: Ингибирование роста опухоли у мышей, которым вводили молекулу МН6Т TriTAC**

Для этого исследования  $10^7$  клеток NCI-H292 и  $10^7$  PBMC человека совместно имплантировали подкожно двум группам мышей NCG (8 мышей в группе). Через 5 дней мышам в одной группе инъецировали молекулу МН6Т TriTAC (SEQ ID NO: 98) ежедневно в течение 10 дней (дни 5-14) в дозе 0,25 мг/кг; а мышам в другой группе вводили контрольный наполнитель. Объемы опухолей измеряли через каждые несколько дней, и исследование прекращали на 36 день. Значительное ингибирование роста опухоли наблюдалось у мышей, которым инъецировали молекулы МН6Т TriTAC, по сравнению с теми, кому вводили контроль-наполнитель, как показано на **фиг. 12**.

**Пример 13. Фармакокинетика МН6Т TriTAC у яванских макаков.**

Для этого исследования двум яванским макакам инъецировали дозу 10 мг/кг молекулы МН6Т TriTAC (SEQ ID NO: 98), внутривенно, и образцы сыворотки собирали в различные моменты времени после инъекции. Количество МН6Т TriTAC в сыворотке крови измеряли с использованием антиидиотипических антител, распознающих молекулу МН6Т TriTAC, в электрохимическом анализе. На **фиг. 13** показан график содержания в сыворотке МН6Т TriTAC в различные моменты времени. Затем эти данные использовали для расчета фармакокинетических свойств молекулы МН6Т TriTAC, как показано в **таблице VII**.

**Таблица VII: Фармакокинетические параметры для МН6Т TriTAC**

Величина дозы	Конечное $t_{1/2}$	$C_{max}$ (нМ)	AUC, 0-бескон. (ч*нМ)	Выведение (мл/ч/кг)	$V_{ss}$ (мл/кг)
10 мг/кг	112	6130	355000	0,58	70,0

**Пример 14: Оптимизация аффинности связывания CD3ε для максимальной активности и воздействия на две иллюстративные триспецифические молекулы по настоящему раскрытию**

Для настоящего исследования измеряли аффинности связывания CD3ε, MSLN и альбумина двух иллюстративных триспецифических молекул по настоящему раскрытию, TriTAC 74 (SEQ ID NO: 100) и TriTAC 75 (SEQ ID NO: 101). Было отмечено, что TriTAC74 был приблизительно в 5 раз более эффективным в связывании CD3ε человека, чем TriTAC75, даже несмотря на то, что аффинности связывания двух молекул были сходными для опухолевой мишени (MSLN) и альбумина, как показано на **фиг. 14**. Кроме того, проводили анализы TDCC с молекулами TriTAC 74 и TriTAC 75, используя клетки SKOV3 и OVCAR. На **фиг. 14** показаны значения EC<sub>50</sub>, полученные в анализах TDCC.

Было обнаружено, что различие в аффинности к CD3ε приводит к увеличению AUC приблизительно на 30-50% в TriTAC 74 по сравнению с TriTAC 75, как измерено в фармакокинетическом анализе после инъекции яванским макакам молекул TriTAC (при внутривенном введении доза болюса 0,02 мг/кг), приведено в **таблице VIII**. Содержание в сыворотке молекул TriTAC измеряли в различные моменты времени после инъекции с использованием анализа Meso Scale Discovery (MSD) с антиидиотипическими антителами. Анализ MSD проводили с использованием n=2 повторов. Концентрации в сыворотке, наблюдаемые в анализе MSD, показаны на **фиг. 15**, а фармакокинетические параметры перечислены в **таблице VIII**.

**Таблица VIII. Фармакокинетические параметры для TriTAC 74 и TriTAC 75**

TriTAC	Конечное t <sub>1/2</sub>	AUC, 0-посл. (ч*нМ)	AUC, 0-бескон. (ч*нМ)	Выведение (мл/ч/кг)	V <sub>ss</sub> (мл/кг)
74	84,9	1030	1050	0,367	36,8
75	89,4	715	727	0,522	54,2

**Таблица последовательностей**

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
SEQ ID NO: 1	9B1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSVRGMAWYRQAGNNRA LVATMNPDPGFNPYADAVKGRFTISWDIAENTVYLQMNLSLNSDPTT VYYCNSGYPYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 2	9F3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIPSIEQMGWYRQAPGKQR ELVAALTSGGRANYADSVKGRFTISGDNVRNMVYVYLQMNLSLKPEDT AIYYCSAGRFGDYAQRSGMDYWGKGLTVTVSS

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
SEQ ID NO: 3	7H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAFSGTTYTFDLMSWYRQAPGKQR TVVASISSDGRTSYADSVRGRFTISGENGKNTVYQLQMNLSLKLEDT AVYYCLGQRSGVRAFVWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 4	3B4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSTSNINNMRYRQAPGKER ELVAVITRGGYAIYLDVAVKGRFTISRDNANNAIYLEMNSLKPEDT AVYVCNADRVEGTSGGPQLRDYFGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 5	4A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFGINAMGWYRQAPGKQR ELVAVISRGGSTNYADSVKGRFTISRDNANTVSLQMNLSLKPEDT AVYFCNARTYTRHDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 6	12D1	QVRLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASISAFRLMSVRYRQDPSKQR EWWATIDQLGRNTYADSVKGRFAISKDSTRNTVYQLQMNMLRPEDT AVYYCNAGGGPLGSRWLRGRHWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 7	3G1	QVRLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGRPFSSINTMGWYRQAPGKQR ELVASISSSGDFTYTDVSVKGRFTISRDNANTVYQLQMNLSLKPEDT AVYYCNARRTYLPFRFGSWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 8	2A1	QVQPVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSQSDFTEDAMAWYRQASGKER ESVAFVSKDGKRIYLDVSVRGRFTISRDIKKTVYQLQMDNLKPED TGVYYCNSAPGAARNYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 9	6F3	QVQPVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSQSDFTEDAMAWYRQASGKER ESVAFVSKDGKRIYLDVSVRGRFTISRDIYKKTVYQLQMDNLKPED TGVYYCNSAPGAARNVWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 10	1H2	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWYRQAPGKGL EWWSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLVYQLQMNLSLRPED TAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 11	3F2	QVQIVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGLTYSIVAVGWYRQAPGKER EMVADISPVGNTNYADSVKGRFTISKENAKNTVYQLQMNLSLKPEDT AVYYCHIVRGWLDERPGPIVYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 12	12C2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGLTFGVYGMWFRQAPGKQR EWWASHTSTGYVYRDSVSVKGRFTISRDNASTVYQLQMNLSLKPEDT AIYYCKANRGSYEYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 13	2D1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASTTSSINSMWYRQAGKQRE PVAVITDRGTSYADSVKGRFTISRDNANTVYQLQMNLSLKPEDTA IYTCHVIADWRGYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 14	6H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTLRYAMGWFRQAPGKER QFVAAISRSGGTTRYSDSVKGRFTISRDNANTFYQLQMNLSLRPDD TAVYYCNVRRRGWGRTEYWGQGTQVTVSS

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
SEQ ID NO: 15	5D2	QVQLGESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FSPNAMIWHRQAPGKQR EPVASINSSGSTNYGDSVKGRFTVSRDIVKNTMYLQMNLSLKPEDT AVYYCSYDFRRGTQYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 16	7C4	QVQLVESGGGLVPSGGSLRLSCAASGATSAITNLGWYRRAPGQVR EMVARI SVREDKEDYEDSVKGRFTISRDNNTQNLVYLQMNNLQPHD TAIYYCGAQRWGRGPPTTWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 17	5F2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFRI RVMRWYRQAPGTER DLVAVI SGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCNADDSGIARDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 18	2C2	QVQLVESGGGLVQAGESRRLSCAVSGDTSKFKAVGWYRQAPGAQR ELLAWINNSGVGNTAESVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNRLTPEDT DVYYCRFYRRFGINKNYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 19	5G2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFGNKPMGWYRQAPGKQR ELVAVI SSDGGSTRYAALVKGRFTISRDNKNTVYLLQMESLVAED TAVYYCNALRTYYLNDPVVFSWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 20	9H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKER ELVAFI SSGGSTNVRDSVKGRFSVSRDSAKNIVYLLQMNLSLTPEDT AVYYCNTYIPLRGTLHDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 21	5D4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTDRITTMGWYRQAPGKQR ELVATI SNRGTSNYANSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNLSLKPEDT AVYYCNARKWGRNYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 22	2A4	QVQLVESGGGLVQARGSLRLSCTASGRTIGINDMAWYRQAPGNQR ELVATITKGGTTDYADSDVGRFTISRDNKNTVYLLQMNLSLKPEDT AVYYCNTKRREWAKDFEYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 23	7F1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASAI GSINSMSWYRQAPGKQRE PVAVITDRGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNLSLKPEDTA IYTCHVIADWRGYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 24	5C2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWFRQAPGEER ELVATINRGGSTNVRDSVKGRFSVSRDSAKNIVYLLQMNRLKPEDT AVYYCNTYIIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 25	2F4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTTSTTF SINSMSWYRQAPGNQRE PVAVITNRGTTSYADSVKGRFTISRDNARNTVYLLQMDSLKPEDTA IYTCHVIADWRGYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 26	2A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAASGSTFSIRAMRWYRQAPGTER DLVAVI YGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGTQVTVSS

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
SEQ ID NO: 27	11F3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTSTIDTMYWHRQAPGNER ELVAVVTSRGTSNVADSVKGRFTISRDNKNTAYLQMNSLKPEDT AVYYCSVRTTSSYPVDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 28	10B3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKER ELVAFISSGGSTNVRDSVKGRFSVSRDSAKNIVYLQMNSLKPEDT AVYYCNTYIIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 29	5H1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYWYRQAPGKQR ELVARI SGRGVVDYVESVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDT AVYYCAVASYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 30	MH1 (иллюстративная гуманизованная версия 5H1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYWYRQAPGKQR ELVARI SGRGVVDYVESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAVASYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 31	MH2 (иллюстративная гуманизованная версия 5H1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYWVRQAPGKGL EWVSRI SGRGVVDYVESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAVASYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 32	MH3 (иллюстративная гуманизованная версия 10B3)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKER ELVAFISSGGSTNVRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCNTYIIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 33	MH4 (иллюстративная гуманизованная версия 10B3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKER ELVAFISSGGSTNVRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCNTYIIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 34	MH5 (иллюстративная гуманизованная версия 10B3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWVRQAPGKGL EWVSFISSGGSTNVRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCNTYIIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 35	MH6-GG (иллюстративная гуманизованная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFSIRAMRWYRQAPGTER DLVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGTQVTVSSGG
SEQ ID NO: 36	MH7-GG (иллюстративная гуманизованная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFSIRAMRWYRQAPGKER ELVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGTQVTVSSGG

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
SEQ ID NO: 37	MH8-GG (иллюстративная гуманизованная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFSLIRAMRWVRQAPGKGL EWVSVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGLVTVSSGG
SEQ ID NO: 38	MH9 (иллюстративная гуманизованная версия 11F3)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCV ASGRTSTIDTMYWHRQAPGNER ELVAYVTSRGTSNVADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDT AVYYCSVRTTSSYPVDFWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 39	MH10 (иллюстративная гуманизованная версия 11F3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSTIDTMYWHRQAPGKER ELVAYVTSRGTSNVADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDT AVYYCSVRTTSSYPVDFWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 40	MH11 (иллюстративная гуманизованная версия 11F3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSTIDTMYWVRQAPGKGL EWVSYVTSRGTSNVADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDT AVYYCSVRTTSSYPVDFWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 41	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	ESGGGLV
SEQ ID NO: 42	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	LSC
SEQ ID NO: 43	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	GRF
SEQ ID NO: 44	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	VTVSS

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
SEQ ID NO: 45	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	QLVESGGG
SEQ ID NO: 46	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	GGSLRLSCAASG
SEQ ID NO: 47	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	ASG
SEQ ID NO: 48	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	RQAPG
SEQ ID NO: 49	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC
SEQ ID NO: 50	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 51	Иллюстративная CDR1 связывающего MSLN домена	GRTFSVRGMA
SEQ ID NO: 52	Иллюстративная CDR2 связывающего MSLN домен	INSSGSTNYG

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
SEQ ID NO: 53	Иллюстративная CDR3 связывающего MSLN домен	NAGGGPLGSR
SEQ ID NO: 54	Иллюстративная CDR1 связывающего MSLN домен	GGDWSANFMY
SEQ ID NO: 55	Иллюстративная CDR2 связывающего MSLN домен	ISSGGSTNVR
SEQ ID NO: 56	Иллюстративная CDR3 связывающего MSLN домен	NADTIGTARD
SEQ ID NO: 57	Последовательность в белка мезотелина	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQEA APLDGVLANPPNISSLSRQLLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALA QKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQ ACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEA DVRALGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARA ALQGGGPPYGGPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPOGIVAA WRQRSSRDPSWRQPRTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESL IFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELY PQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLEVNKGH EMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLC SLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLVYPKARLAFQNM NGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVL PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLG LQGGIPNGYLVLDSLMEALSQTPCLLGGPVLTVLALLLASTLA
SEQ ID NO: 58	9B1 TriTAC	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSVIRGMAWYRQAGNNRA LVATMNPDGFNPYADAVKGRFTISWDIAENTVYLMNSLNSDSTT VYYCNSGPGYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLIA DSVKGRFTISRDNKTTLYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRS QGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDSDKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSQTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC GSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLVSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHH HHH

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
SEQ ID NO: 59	9F3 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIPISEIQMGWYRQAPGKQR ELVAALTSGGRANYADSVKGRFTISGDNVRNMVYQLMNSLKPEDT AIYYCSAGRFGDYAQRSGMDYWGKGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTK FLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWV FGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 60	7H2 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAFSGTTYTFDLMSWYRQAPGKQR TVVASISSDGRTSYADSVRGRFTISGENGNKTVYQLMNSLKLEDT AVYYCLGQRSGVRAFVGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSG SDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVLHHHHHH
SEQ ID NO: 61	3B4 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSTSNINMRWYRQAPGKER ELVAVITRGGYAIYLDVAVKGRFTISRDNANNAIYLEMNSLKPEDT AVYVCNADRVEGTSGGPQLRDYFGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTK FLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWV FGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 62	4A2 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFGINAMGWYRQAPGKQR ELVAVISRGGSTNYADSVKGRFTISRDNAAENTVSLQMNLTLPEDT

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
		AVYFCNARTYTRHDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSG SDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDS KNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTVQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVLHHHHHH
SEQ ID NO: 63	12D1 TriTAC	QVRLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASISAFRLMSVRWYRQDPSKQR EWVATIDQLGRNTYADSVKGRFAISKDSTRNTVYLQMNMLRPEDT AVYYCNAGGGPLGSRWLRGRHWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTVQEPSL TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWV GGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 64	3G1 TriTAC	QVRLVESGGGLVQAGESLRRLSCAASGRPF SINTMGWYRQAPGKQR ELVASISSSGDFTYTD SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDT AVYYCNARTYLP RRFSGSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCT IGGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTVQEPSLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 65	2A1 TriTAC	QVQPVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS GSDFTEDAMAWYRQASGKER ESVAFVSKDGKRI LYLD SVRGRFTISRDI DKKTVYLQMDNLKPED TGVYYCNSAPGAARNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
		GLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 66	6F3 TriTAC	QVQPVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSDFTEDAMAWYRQASGKERESVAFVSKDGKRIYLDSVGRFTISRDIYKKTVYLQMDNLKPEDTGVYYCNSAPGAARNVWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 67	1H2 TriTAC	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 68	3F2 TriTAC	QVQIVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGLTYSIVAVGWYRQAPGKEREMVADISPVGNTNYADSVKGRFTISKENAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCHIVRGWLDERPGPIVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
		VSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 69	12C2 TriTAC	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS CAASGLTFGVYGMWFRQAPGKQR EWWASHTSTGYVYRDSVKGRFTISRDNASTVYLQMNSLKPEDT AIYYCKANRGSYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 70	2D1 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASTTSSINSMSWYRQAQKQRE PVAVITDRGTSYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTA IYTCHVIADWRGYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL SRSSQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 71	6H2 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTLSRYAMGWFRQAPGKER QFVAAISRSGGTTRYSDSVKGRFTISRDNAANTFYLQMNLRPDD TAVYYCNVRRRGWRTLEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSRSSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
		LKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHG NFGNS YISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTV SPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLA PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG GKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 72	5D2 TriTAC	QVQLGESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSPNAMIWHRQAPGKQR EPVASINSSGSTNYGDSVKGRFTVSRDIVKNTMYLQMN SLKPEDT AVYYCSYSDFRRTQYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIG GSLSRSSQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYIS YWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK LTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 73	7C4 TriTAC	QVQLVESGGGLVPSGGSLRLSCAASGATSAITNLGWYRRAPGQVR EMVARI SVREDKEDYEDSVKGRFTISRDN TQNLVYLQMN NLQPHD TAIYYCGAQRWGRPGPTTWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCT IGGSLSRSSQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSY ISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 74	5F2 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFRI RVMRWYRQAPGTER DLVAVIGSSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN NLKPEDTA VYYCNADDSGIARDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS SDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGG SLSRSSQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSV

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
		KDRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTVQEP SLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTP ARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKL TVLHHHHHH
SEQ ID NO: 75	2C2 TritAC	QVQLVESGGGLVQAGESRRLSCAVSGDTSKFKAVGWYRQAPGAQR ELLAWINNSGVGNTAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNRLTPEDT DVYYCRFYRRFGINKNYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTVQEP SLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLAPG TPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGT KLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 76	5G2 TritAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFGNKPMGWYRQAPGKQR ELVAVISSDGGSTRYAALVKGRFTISRDN AKNTVYLQMESLVAED TAVYYCNALRTYYLNDPVVFSWGQGTQVT VSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTVQEP SL TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWV GGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 77	9H2 TritAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKER ELVAFISSGGSTNVRDSVKGRFSVSRDSAKNIVYLQMN SLTPEDT AVYYCNTYIPLRGLHDYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCT IGGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTVQEP SLTVS

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
		PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 78	5D4 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTDRITTMGWYRQAPGKQR ELVATISNRGTSNYANSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDT AVYYCNARKWGRNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS AASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLHHHHHH
SEQ ID NO: 79	2A4 TriTAC	QVQLVESGGGLVQARGSLRLSCTASGRTIGINDMAWYRQAPGNQR ELVATITKGGTDDYADSVDRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDT AVYYCNTKRREWAKDFEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCT IGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 80	7F1 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASAIGSINSMSWYRQAPGKQRE PVAVITDRGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTA IYTCHVIADWRGYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSL SRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS AASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPAR

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
		FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 81	5C2 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGSTSSINTMYWFRQAPGEER ELVATINRGGSTNVRDSVKGRFSVSRDSAKNIVYLMNRLKPEDT AVYYCNTYIIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLTYLQMNLSLRPEDTAVYYCT IGGSLSRSSQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 82	2F4 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCCTTSTTFSSINSMSWYRQAPGNQRE PVAVITNRGTTSYADSVKGRFTISRDNARNTVYLMQDSLKPEDTA IYTCHVIADWRGYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLTYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSL SRSSQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSA ASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV LHHHHHH
SEQ ID NO: 83	2A2 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAASGSTFSIRAMRWYRQAPGTER DLVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLLKPEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSG SDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLTYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGG SLSRSSQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
		ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 84	11F3 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTSTIDTMYWHRQAPGNERELVAYVTSRGTSNVADSVKGRFTISRDNKNTAYLQMNLSLKPEDTAVYYCSVRTTSTYPVDFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSGQTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTTLTLCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 85	10B3 TriTAC	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKERELVAFISSGGSTNVRDSVKGRFSVSRDSAKNIVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNTYIIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSGQTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTTLTLCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 86	5H1 TriTAC	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYWYRQAPGKQRELVARISGRGVVDYVESVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAVASYWQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSGQTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTTLTLCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHH

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
SEQ ID NO: 87	Иллюстративная линкерная последовательность	(GS) n
SEQ ID NO: 88	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGS) n
SEQ ID NO: 89	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGGS) n
SEQ ID NO: 90	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGSG) n
SEQ ID NO: 91	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGSGG) n
SEQ ID NO: 92	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGGGS) n
SEQ ID NO: 93	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGGGG) n
SEQ ID NO: 94	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGG) n
SEQ ID NO: 95	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGGGS) 4
SEQ ID NO: 96	Иллюстративная линкерная	(GGGGS) 3

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
	последовательность	
SEQ ID NO: 97	Домен распознавания сортазы	LPETG
SEQ ID NO: 98	MH6T TritAC	QVQLVESGGGVQAGGSLTLSCAASGSTF SIRAMRWYRQAPGTER DLVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSG RDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGG SLSVSSQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISY WAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTQEP SLTVSPGG TVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKL TVLHHHHHH
SEQ ID NO: 99	GFP TritAC	QVQLVESGGALVQPGGSLRLS CAASGFVNRYSMRWYRQAPGKER EWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMN SLKPED TAVYYCNVNVGFEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGR DTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGS LSVSSQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS AASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADQVK DRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISY AYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTQEP SLTVSPGGT VTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPA RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLT VLHHHHHH
SEQ ID NO: 100	TritAC 74	QVQLVESGGGVQAGGSLRLS CAASGSTF SIRAMRWYRQAPGTERDLVAV IYGSSTYYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCNADTIG TARDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGLVTVSSGGGGSGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGNTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRH GNFGDSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTQEP SLT VSPGGTVTLTCGSSTGAVTHGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKVLAPGTP

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок	Последовательность
		ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHH HHHH
SEQ ID NO: 101	TriTAC 75	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFSI RAMRWYRQAPGTER DLVAVI YGSSTYYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSG RDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGG SLSVSSQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDS KNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISY WAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGKFLVPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKL TVLHHHHHHH
SEQ ID NO: 102	Анти-MSLN-МН6Т	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFSI RAMRWYRQAPGTER DLVAVI YGSSTYYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 103	МН6 (иллюстративная гуманизованная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFSI RAMRWYRQAPGTER DLVAVI YGSSTYYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 104	МН7 (иллюстративная гуманизованная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFSI RAMRWYRQAPGKER ELVAVI YGSSTYYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 105	МН8 (иллюстративная гуманизованная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFSI RAMRWVRQAPGKGL EWVSVI YGSSTYYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCNADTIGTARDYWGQGLVTVSS

Таблица последовательностей для CDR иллюстративных связывающих мезотелин триспецифических белков по настоящему раскрытию

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок/TriTAC	Последовательность CDR1
106	9B1	GRTFSVRGMA
107	9F3	GSIPSIEQMG
108	7H2	GTTYTFDLMS

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN триспецифический белок/TriTAC	Последовательность CDR1
109	3B4	GSTSNINNMR
110	4A2	GSTFGINAMG
111	12D1	ISAFRLMSVR
112	3G1	GRPFSINTMG
113	2A1	GSDFTEDAMA
114	6F3	GSDFTEDAMA
115	1H2	GFTFSSFGMS
116	3F2	GLTYSIVAVG
117	12C2	GLTFGVYGME
118	2D1	TTSSINSMS
119	6H2	GRTLSRYAMG
120	5D2	GSIFSPNAMI
121	7C4	GATSAITNLG
122	5F2	GSTFRIRVMR
123	2C2	GDTSKFKAVG
124	5G2	GSTFGNKPMG
125	9H2	GSTSSINTMY
126	5D4	GRTDRITTMG
127	2A4	GRTIGINDMA
128	7F1	AIGSINSMS
129	5C2	GSTSSINTMY
130	2F4	TTFSINSMS
131	2A2	GSTFSIRAMR
132	11F3	GRTSTIDTMY
133	10B3	GSTSSINTMY
134	MH1	GGDWSANFMY
135	MH2	GGDWSANFMY
136	MH3	GSTSSINTMY
137	MH4	GSTSSINTMY
138	MH5	GSTSSINTMY
139	MH6	GSTFSIRAMR
140	MH7	GSTFSIRAMR
141	MH8	GSTFSIRAMR
142	MH9	GRTSTIDTMY
143	MH10	GRTSTIDTMY
144	MH11	GRTSTIDTMY

Таблица последовательностей для CDR2 иллюстративных связывающих мезотелин триспецифических белков по настоящему раскрытию

ID No. последовательности	Иллюстративный триспецифический белок/TriTAC	Последовательность CDR2
145	9B1	TMNPDGFPNYADAVKGRFT

ID No. последовательности	Иллюстративный триспецифический белок/TriTAC	Последовательность CDR2
146	9F3	ALTSGGRANYADSVKGRFT
147	7H2	SISSDGRTSYADSVRGRFT
148	3B4	VITRGGYAIYLDVAVKGRFT
149	4A2	VISRGGSTNYADSVKGRFT
150	12D1	TIDQLGRTNYADSVKGRFA
151	3G1	SISSSGDFTYTDVSVKGRFT
152	2A1	FVSKDGKRILYLDVSVRGRFT
153	6F3	FVSKDGKRILYLDVSVRGRFT
154	1H2	SISGSGSDTLYADSVKGRFT
155	3F2	DISPVGNTNYADSVKGRFT
156	12C2	SHTSTGYVYYRDSVKGRFT
157	2D1	VITDRGSTSYADSVKGRFT
158	6H2	AISRGGTTRYSDSVKGRFT
159	5D2	SINSSGSTNYGDSVKGRFT
160	7C4	RISVREDKEDYEDSVKGRFT
161	5F2	VISGSSTYYADSVKGRFT
162	2C2	WINNSGVGNTAESVKGRFT
163	5G2	VISSDGGSTRYAALVKGRFT
164	9H2	FISSGGSTNVRDSVKGRFS
165	5D4	TISNRGTSNYANSVKGRFT
166	2A4	TITKGGTTDYADSVDRFT
167	7F1	VITDRGSTSYADSVKGRFT
168	5C2	TINRGGSTNVRDSVKGRFS
169	2F4	VITNRGTTSYADSVKGRFT
170	2A2	VIYGSSTYYADAVKGRFT
171	11F3	YVTSRGTSNVADSVKGRFT
172	10B3	FISSGGSTNVRDSVKGRFS
173	MH1	RISGRGVVDYVESVKGRFT
174	MH2	RISGRGVVDYVESVKGRFT
175	MH3	FISSGGSTNVRDSVKGRFT
176	MH4	FISSGGSTNVRDSVKGRFT
177	MH5	FISSGGSTNVRDSVKGRFT
178	MH6	VIYGSSTYYADAVKGRFT
179	MH7	VIYGSSTYYADAVKGRFT
180	MH8	VIYGSSTYYADAVKGRFT
181	MH9	YVTSRGTSNVADSVKGRFT
182	MH10	YVTSRGTSNVADSVKGRFT
183	MH11	YVTSRGTSNVADSVKGRFT

Таблица последовательностей для CDR3 иллюстративных связывающих мезотелин триспецифических белков по настоящему раскрытию

ID No. последовательности	Иллюстративный триспецифический белок/TriTAC	Последовательность CDR3
184	9B1	GPY
185	9F3	GRFKGDYAQRSGMDY
186	7H2	QRSGVRAF
187	3B4	DRVEGTSGGPQLRDY
188	4A2	RTYTRHDY
189	12D1	GGGPLGSRWLRGRH
190	3G1	RRTYLPRRFGS
191	2A1	APGAARNY
192	6F3	APGAARNV
193	1H2	GGSLSRSS
194	3F2	VRGWLDERPGPGPIVY
195	12C2	NRGSYEY
196	2D1	IADWRGY
197	6H2	RRRGWGRTLEY
198	5D2	SDFRRGTQY
199	7C4	QRWGRGPGTT
200	5F2	DDSGIARDY
201	2C2	YRRFGINKNY
202	5G2	LRTYYLNDPVVFS
203	9H2	YIPLRGTLLHDY
204	5D4	RKWGRNY
205	2A4	KRREWAKDFEY
206	7F1	IADWRGY
207	5C2	YIPYGGTLHDF
208	2F4	IADWRGY
209	2A2	DTIGTARDY
210	11F3	RTTSYPVDF
211	10B3	YIPYGGTLHDF
212	MH1	ASY
213	MH2	ASY
214	MH3	YIPYGGTLHDF
215	MH4	YIPYGGTLHDF
216	MH5	YIPYGGTLHDF
217	MH6	DTIGTARDY
218	MH7	DTIGTARDY
219	MH8	DTIGTARDY
220	MH9	RTTSYPVDF
221	MH10	RTTSYPVDF
222	MH11	RTTSYPVDF

Каркасная область 1 (f1) иллюстративных триспецифических связывающих MSLN белков по настоящему раскрытию

ID No. последовательности	Иллюстративный триспецифический белок/TriTAC	Каркас 1
223	9B1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
224	9F3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
225	7H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAFS
226	3B4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
227	4A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
228	12D1	QVRLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
229	3G1	QVRLVESGGGLVQAGESLRLSCAAS
230	2A1	QVQPVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS
231	6F3	QVQPVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS
232	1H2	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
233	3F2	QVQIVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
234	12C2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAAS
235	2D1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
236	6H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
237	5D2	QVQLGESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
238	7C4	QVQLVESGGGLVPSGGSLRLSCAAS
239	5F2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
240	2C2	QVQLVESGGGLVQAGESRRLSCAVS
241	5G2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
242	9H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
243	5D4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
244	2A4	QVQLVESGGGLVQARGSLRLSCTAS
245	7F1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
246	5C2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
247	2F4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTTS
248	2A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAAS
249	11F3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
250	10B3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
251	MH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
252	MH2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
253	MH3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
254	MH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
255	MH5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
256	MH6	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAAS
257	MH7	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS
258	MH8	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS
259	MH9	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
260	MH10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
261	MH11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

Каркасная область 2 (f2) иллюстративных триспецифических связывающих MSLN белков по настоящему раскрытию

ID No. последовательности	Иллюстративный триспецифический белок/TriTAC	Каркас 2
262	9B1	WYRQAGNNRALVA
263	9F3	WYRQAPGKQRELVA
264	7H2	WYRQAPGKQRTVVA
265	3B4	WYRQAPGKERELVA
266	4A2	WYRQAPGKQRELVA
267	12D1	WYRQDPSKQREWVA
268	3G1	WYRQAPGKQRELVA
269	2A1	WYRQASGKERESVA
270	6F3	WYRQASGKERESVA
271	1H2	WVRQAPGKGLEWVS
272	3F2	WYRQAPGKEREMVA
273	12C2	WFRQAPGKQREWVA
274	2D1	WYRQAQGKQREPVA
275	6H2	WFRQAPGKERQFVA
276	5D2	WHRQAPGKQREPVA
277	7C4	WYRRAPGQVREMVA
278	5F2	WYRQAPGTERDLVA
279	2C2	WYRQAPGAQRELLA
280	5G2	WYRQAPGKQRELVA
281	9H2	WYRQAPGKERELVA
282	5D4	WYRQAPGKQRELVA
283	2A4	WYRQAPGNQRELVA
284	7F1	WYRQAPGKQREPVA
285	5C2	WFRQAPGEERELVA
286	2F4	WYRQAPGNQREPVA
287	2A2	WYRQAPGTERDLVA
288	11F3	WHRQAPGNERELVA
289	10B3	WYRQAPGKERELVA
290	MH1	WYRQAPGKQRELVA
291	MH2	WVRQAPGKGLEWVS
292	MH3	WYRQAPGKERELVA
293	MH4	WYRQAPGKERELVA
294	MH5	WVRQAPGKGLEWVS
295	MH6	WYRQAPGTERDLVA
296	MH7	WYRQAPGKERELVA
297	MH8	WVRQAPGKGLEWVS
298	MH9	WHRQAPGNERELVA
299	MH10	WHRQAPGKERELVA
300	MH11	WVRQAPGKGLEWVS

Каркасная область 3 (f3) иллюстративных триспецифических связывающих MSLN белков по настоящему раскрытию



ID No. последовательности	Иллюстративный триспецифический белок/TriTAC	Каркас 4
340	9B1	WGQGTQVTVSS
341	9F3	WGKGLVTVSS
342	7H2	WGQGTQVTVSS
343	3B4	FGQGTQVTVSS
344	4A2	WGQGTQVTVSS
345	12D1	WGQGTQVTVSS
346	3G1	WGQGTQVTVSS
347	2A1	WGQGTQVTVSS
348	6F3	WGQGTQVTVSS
349	1H2	QGTLVTVSS
350	3F2	WGQGTQVTVSS
351	12C2	WGQGTQVTVSS
352	2D1	WGQGTQVTVSS
353	6H2	WGQGTQVTVSS
354	5D2	WGQGTQVTVSS
355	7C4	WGQGTQVTVSS
356	5F2	WGQGTQVTVSS
357	2C2	WGQGTQVTVSS
358	5G2	WGQGTQVTVSS
359	9H2	WGQGTQVTVSS
360	5D4	WGQGTQVTVSS
361	2A4	WGQGTQVTVSS
362	7F1	WGQGTQVTVSS
363	5C2	WGQGTQVTVSS
364	2F4	WGQGTQVTVSS
365	2A2	WGQGTQVTVSS
366	11F3	WGQGTQVTVSS
367	10B3	WGQGTQVTVSS
368	MH1	WGQGLVTVSS
369	MH2	WGQGLVTVSS
370	MH3	WGQGLVTVSS
371	MH4	WGQGLVTVSS
372	MH5	WGQGLVTVSS
373	MH6	WGQGLVTVSSGG
374	MH7	WGQGLVTVSSGG
375	MH8	WGQGLVTVSSGG
376	MH9	WGQGLVTVS
377	MH10	WGQGLVTVSS
378	MH11	WGQGLVTVSS

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Триспецифический белок, связывающий мезотелин (MSLN), причем указанный белок содержит

(a) первый домен (A), который специфически связывается с CD3 человека;

(b) второй домен (B), который представляет собой домен продления периода полужизни; а также

(c) третий домен (C), который специфически связывается с MSLN,

причем домены связаны в следующем порядке: H<sub>2</sub>N-(A)-(C)-(B)-COOH, H<sub>2</sub>N-(B)-(A)-(C)-COOH, H<sub>2</sub>N-(C)-(B)-(A)-COOH или с помощью линкеров L1 и L2.

2. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором первый домен содержит переменный легкий домен и переменный тяжелый домен, каждый из которых способен специфически связываться с CD3 человека.

3. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором первый домен является гуманизированным или человеческим.

4. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором второй домен связывается с альбумином.

5. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором второй домен содержит scFv, переменный тяжелый домен (VH), переменный легкий домен (VL), пептид, лиганд или небольшую молекулу.

6. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором третий домен содержит домен VHH, домен scFv, домен VH, домен VL, домен не-Ig, лиганд, ноттин или низкомолекулярный объект, который специфически связывается с MSLN.

7. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 6, в котором третий домен содержит домен VHH.

8. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 7, в котором указанный домен VHH содержит одну или более консервативных областей, содержащих

последовательность, идентичную SEQ ID NO: 41, 42, 43 или 44 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 41, 42, 43 или 44.

9. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 8, в котором указанный домен VHH содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 41 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 41.

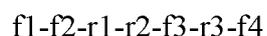
10. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 8, в котором указанный домен VHH содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 42 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 42.

11. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 8, в котором указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 43 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 43.

12. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 8, в котором указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 44 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 44.

13. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором указанный домен VHH содержит (i) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 41; (ii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 42; (iii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 43; и (iv) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 44.

14. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 7, в котором указанный домен VHH содержит следующую формулу:



где r1 идентичен SEQ ID NO: 51 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее; r2 идентичен SEQ ID NO: 52 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее; и r3 идентичен SEQ ID

NO: 53 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее; и где f1, f2, f3 и f4 представляют собой каркасные остатки.

15. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 7, в котором указанный домен VHH содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-29.

16. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором третий домен содержит выбранную последовательность из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-29.

17. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором третий домен представляет собой гуманизированный домен VHH.

18. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 17, в котором указанный гуманизированный домен VHH содержит одну или более консервативных областей, содержащих последовательность, идентичную SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 или 50 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее.

19. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 18, в котором указанный домен VHH содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 45 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее.

20. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 18, в котором указанный домен VHH содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 46 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее.

21. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 18, в котором указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 47 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее.

22. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 18, в котором указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий последовательность,

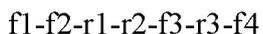
идентичную SEQ ID NO: 48 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее.

23. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 18, в котором указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 49 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее.

24. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 18, в котором указанный домен VHH содержит консервативный домен, содержащий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 50 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее.

25. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 18, в котором указанный домен VHH содержит (i) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 45; (ii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 46; (iii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 47, (iv) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 48, (v) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 49, и (vi) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 50.

26. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 17, в котором указанный гуманизированный домен VHH характеризуется следующей формулой:



где r1 идентичен SEQ ID NO: 54 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее; r2 идентичен SEQ ID NO: 55 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее; и r3 идентичен SEQ ID NO: 56 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее; и где f1, f2, f3 и f4 представляют собой каркасные остатки.

27. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по любому из пп. 17-26, в котором указанный третий домен содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30-40 и 102-105.

28. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по любому из пп. 1-7, в котором третий домен связывается с белком мезотелина человека, содержащим последовательность, представленную как SEQ ID NO: 57.

29. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по любому из пп. 1-8, в котором третий домен связывается с эпитопом мезотелина, причем указанный эпитоп расположен в области I, содержащей аминокислотные остатки 296-390 SEQ ID NO: 57, области II, содержащей аминокислотные остатки 391-486 SEQ ID NO: 57, или области III, содержащей аминокислотные остатки 487-598 SEQ ID NO: 57.

30. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором каждый из линкеров L1 и L2 независимо выбран из  $(GS)_n$  (SEQ ID NO: 87),  $(GGS)_n$  (SEQ ID NO: 88),  $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO: 89),  $(GGSG)_n$  (SEQ ID NO: 90),  $(GGSGG)_n$  (SEQ ID NO: 91) или  $(GGGGS)_n$  (SEQ ID NO: 92), где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

31. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором линкеры L1 и L2 представляют собой каждый независимо друг от друга  $(GGGGS)_4$  (SEQ ID NO: 95) или  $(GGGGS)_3$  (SEQ ID NO: 96).

32. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, в котором домены связаны в порядке  $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ .

33. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, причем белок составляет менее чем приблизительно 80 кДа.

34. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, причем белок составляет от приблизительно 50 до приблизительно 75 кДа.

35. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, причем белок составляет менее чем приблизительно 60 кДа.

36. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, причем белок характеризуется периодом полувыведения, составляющим по меньшей мере приблизительно 50 часов.

37. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, причем белок характеризуется периодом полувыведения, составляющим по меньшей мере приблизительно 100 часов.

38. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, причем белок характеризуется повышенным проникновением в ткани по сравнению с IgG для того же MSLN.

39. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 1, причем белок содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101.

40. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) связывающий MSLN триспецифический белок по любому из пп. 1-39 и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

41. Способ получения связывающего мезотелин триспецифического белка по любому из пп. 1-39, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающий мезотелин триспецифический белок по любому из пп. 1-39 в условиях, позволяющих экспрессировать связывающий мезотелин триспецифический белок и выделять и очищать полученный белок из культуры.

42. Способ лечения или ослабления пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение связывающего мезотелин триспецифического белка по любому из пп. 1-39 нуждающемуся в этом субъекту.

43. Способ по п. 42, в котором субъект представляет собой человека.

44. Способ по п. 43, причем способ дополнительно предусматривает введение средства в комбинации со связывающим мезотелин триспецифическим белком по любому из пп. 1-39.

45. Способ по любому из пп. 42-44, в котором связывающий мезотелин триспецифический белок селективно связывается с экспрессирующими мезотелин опухолевыми клетками.

46. Способ по п. 45, в котором связывающий мезотелин триспецифический белок обеспечивает уничтожение Т-клетками экспрессирующих мезотелин опухолевых клеток.

47. Способ по любому из пп. 42-46, в котором опухолевое заболевание включает в себя заболевание солидной опухолью.

48. Способ по п. 47, в котором заболевание солидной опухолью включает в себя мезотелиому, рак легкого, рак желудка, рак яичника или тройной негативный рак молочной железы.

49. Способ по п. 48, в котором заболевание солидной опухолью является метастатическим.

50. Способ лечения или ослабления пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение связывающего мезотелин триспецифического белка, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101.

51. Способ по п. 50, в котором связывающий мезотелин триспецифический белок селективно связывается с экспрессирующими мезотелин опухолевыми клетками.

52. Способ по п. 51, в котором связывающий мезотелин триспецифический белок направляет уничтожение Т-клетками экспрессирующих мезотелин опухолевых клеток.

53. Способ по любому из пп. 50-52, в котором опухолевое заболевание включает в себя заболевание солидной опухолью.

54. Способ по п. 53, в котором заболевание солидной опухолью включает в себя мезотелиому, рак легкого, рак желудка, рак яичника или тройной негативный рак молочной железы.

55. Способ по п. 54, в котором заболевание солидной опухолью является метастатическим.

56. Способ лечения или ослабления пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение связывающего мезотелин триспецифического белка, содержащего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98.

57. Способ по любому из пп. 50-56, предусматривающий введение связывающего мезотелин триспецифического белка в дозе до 10 мг/кг.

58. Способ по любому из пп. 50-57, в котором белок вводят один раз в неделю.

59. Способ по любому из пп. 50-57, в котором белок вводят дважды в неделю.

60. Способ по любому из пп. 50-57, в котором белок вводят каждую вторую неделю.

61. Способ по любому из пп. 50-57, в котором белок вводят каждые три недели.

62. Триспецифический белок, связывающий мезотелин (MSLN), содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98.

63. Триспецифический белок, связывающий мезотелин (MSLN), причем указанный белок содержит

(а) первый домен (А), который специфически связывается с CD3 человека;

(b) второй домен (В), который представляет собой домен продления периода полужизни; а также

(с) третий домен (С), который специфически связывается с MSLN,

причем домены связаны в следующем порядке: H<sub>2</sub>N-(А)-(С)-(В)-COOH, H<sub>2</sub>N-(В)-(А)-(С)-COOH, H<sub>2</sub>N-(С)-(В)-(А)-COOH или линкерами L1 и L2, причем указанный третий домен содержит одну или более последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 51-56 и 106-222.

64. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п. 63, в котором указанный третий домен содержит CDR1, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 51, 54 и 106-144.

65. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по п.63 или 64, в котором указанный третий домен содержит CDR2, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 52, 55 и 145-183.

66. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по любому из пп. 63-65, в котором указанный третий домен содержит CDR2, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 53, 56 и 184-222.

67. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по любому из пп. 63-66, в котором указанный третий домен содержит каркасную область 1 (f1), содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 262-300.

68. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по любому из пп. 63-67, в котором указанный третий домен содержит последовательность каркасной области (f2), представленную в любой из SEQ ID NO: 301-339.

69. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по любому из пп. 63-68, в котором указанный третий домен содержит каркасную область (f3) последовательности, представленную в любой из SEQ ID NO: 340-378.

70. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по любому из пп. 63-69, причем белок содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58-86, 98, 100 и 101.

71. Триспецифический белок, связывающий MSLN, по любому из пп. 63-70, причем белок содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98.

72. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) связывающий MSLN триспецифический белок по любому из пп. 63-71 и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

73. Способ получения связывающего MSLN триспецифического белка по любому из пп. 63-71, причем указанный процесс предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающий мезотелин белок по любому из пп. 63-71, в условиях, позволяющих экспрессировать связывающий мезотелин триспецифический белок и выделять и очищать полученный белок из культуры.

74. Способ лечения или ослабления пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение связывающего мезотелин триспецифического белка по любому из пп. 63-71 нуждающемуся в этом субъекту.

75. Способ по п. 74, в котором субъект представляет собой человека.

76. Способ по п. 75, причем способ дополнительно предусматривает введение средства в комбинации со связывающим мезотелин триспецифическим белком по любому из пп. 63-71.

77. Способ по любому из пп. 74-76, в котором связывающий мезотелин триспецифический белок селективно связывается с экспрессирующими мезотелин опухолевыми клетками.

78. Способ по п. 77, в котором связывающий мезотелин триспецифический белок опосредует уничтожение Т-клетками экспрессирующих мезотелин опухолевых клеток.

79. Способ по любому из пп. 74-78, в котором опухолевое заболевание включает в себя заболевание солидной опухолью.

80. Способ по п. 79, в котором заболевание солидной опухолью включает в себя мезотелиому, рак легкого, рак желудка, рак яичника или тройной негативный рак молочной железы.

81. Способ по п. 80, в котором заболевание солидной опухолью является метастатическим.

82. Способ лечения или ослабления пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение связывающего мезотелин триспецифического белка по любому из пп. 63-71.

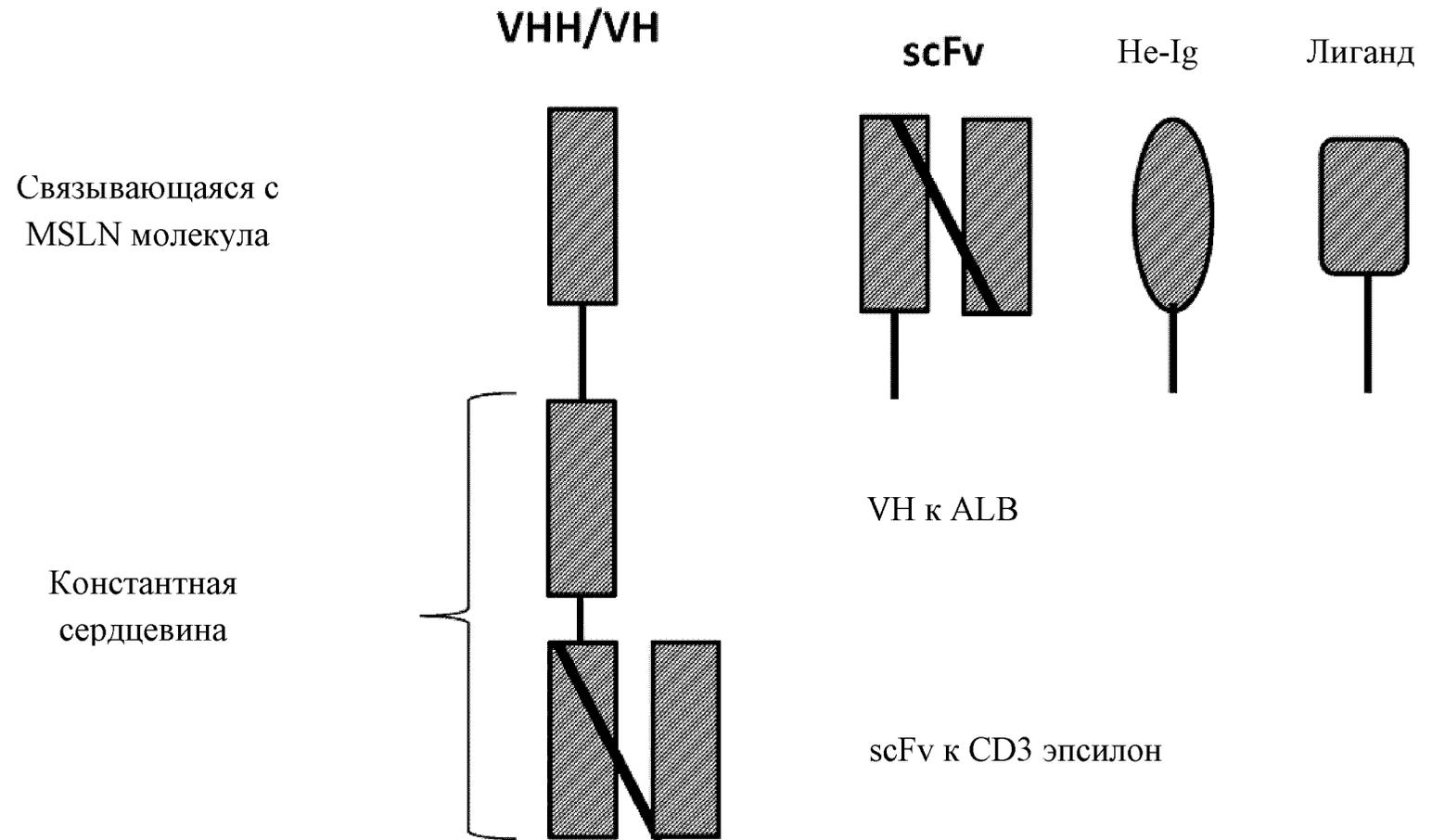
83. Способ по п. 82, в котором связывающий мезотелин белок селективно связывается с экспрессирующими мезотелин опухолевыми клетками.

84. Способ по п. 83, в котором связывающий мезотелин триспецифический белок опосредует уничтожение Т-клетками экспрессирующих мезотелин опухолевых клеток.

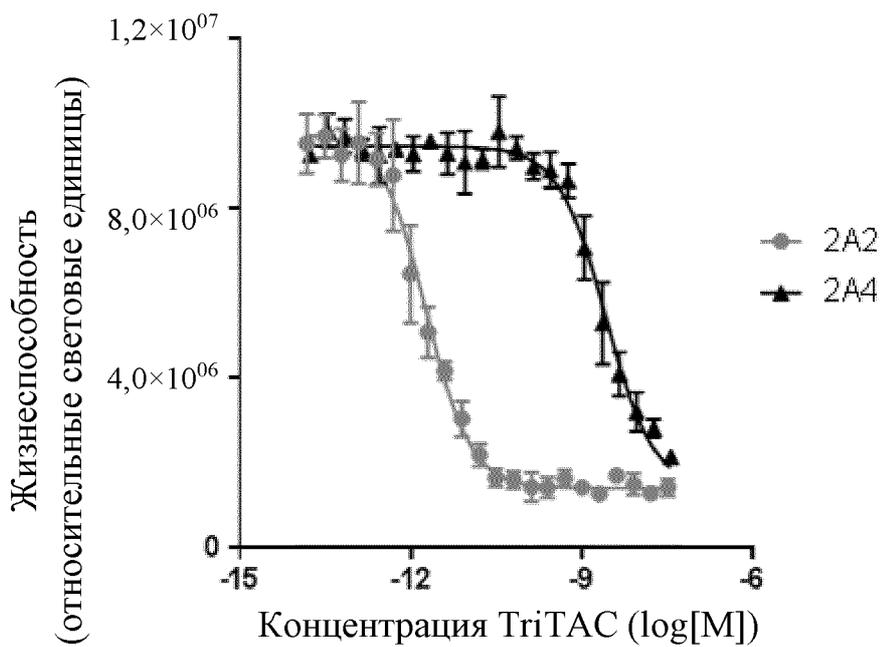
85. Способ по любому из пп. 82-84, в котором опухолевое заболевание включает в себя заболевание солидной опухолью.

86. Способ по п. 85, в котором заболевание солидной опухолью включает в себя мезотелиому, рак легкого, рак желудка, рак яичника или тройной негативный рак молочной железы.

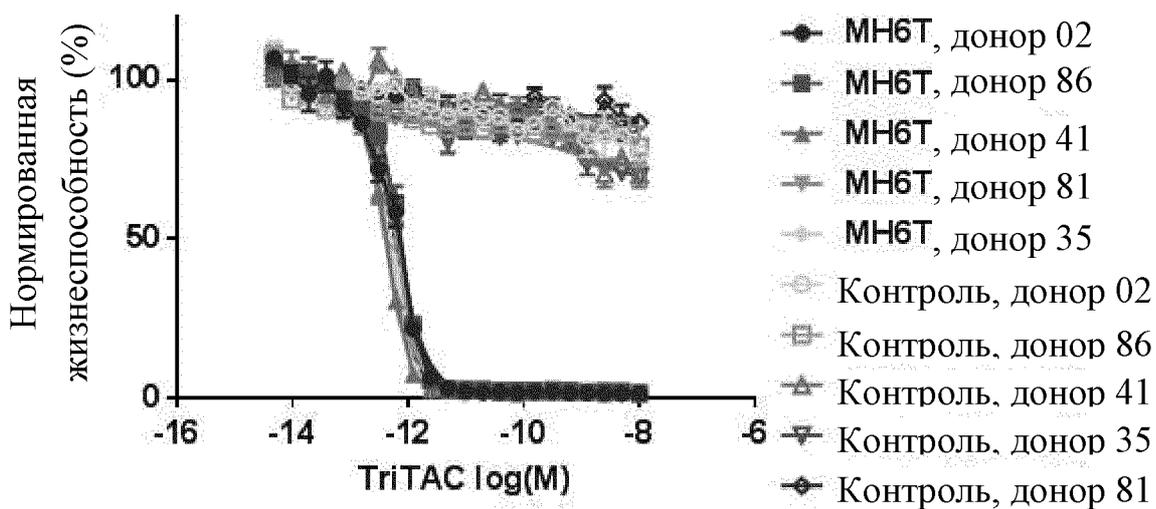
87. Способ по п. 86, в котором заболевание солидной опухолью является метастатическим.



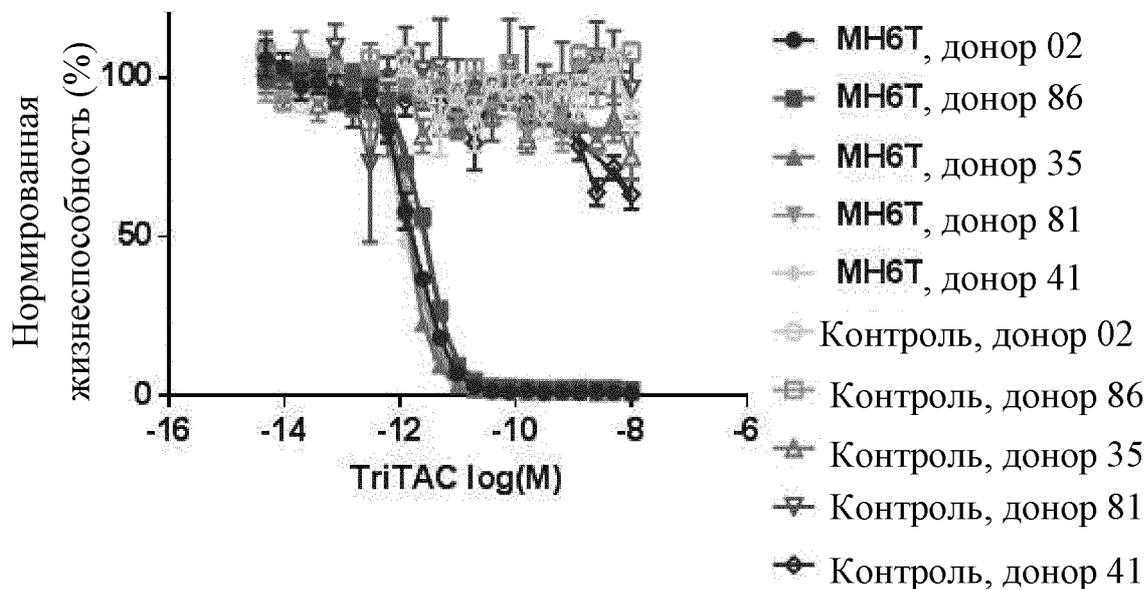
Фиг. 1



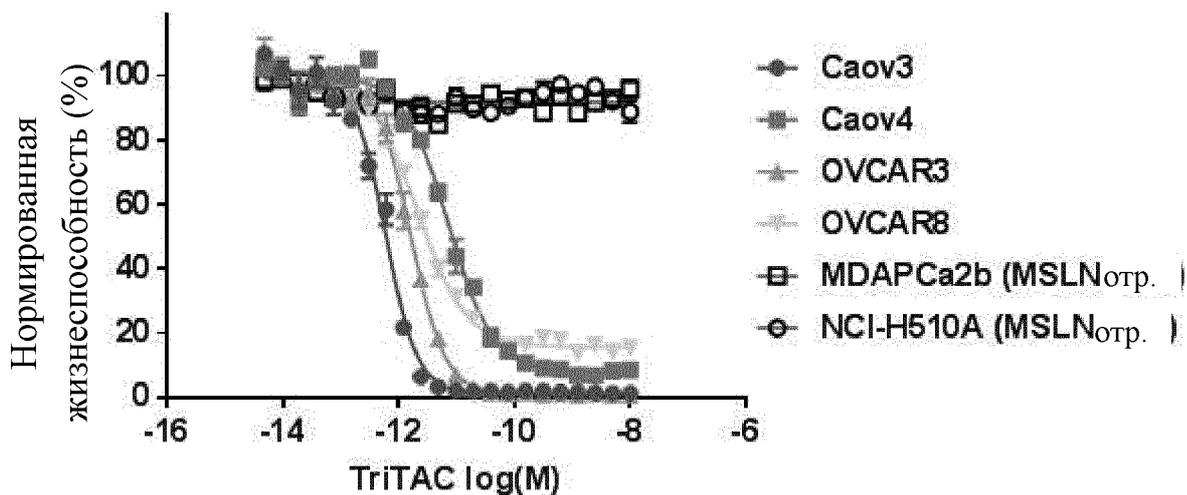
Фиг. 2



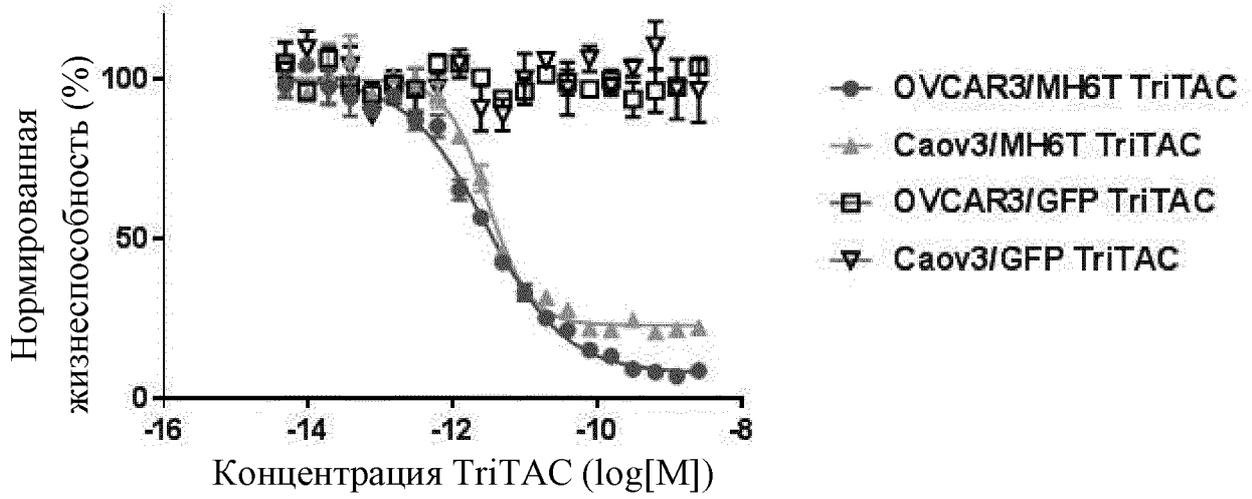
Фиг. 3



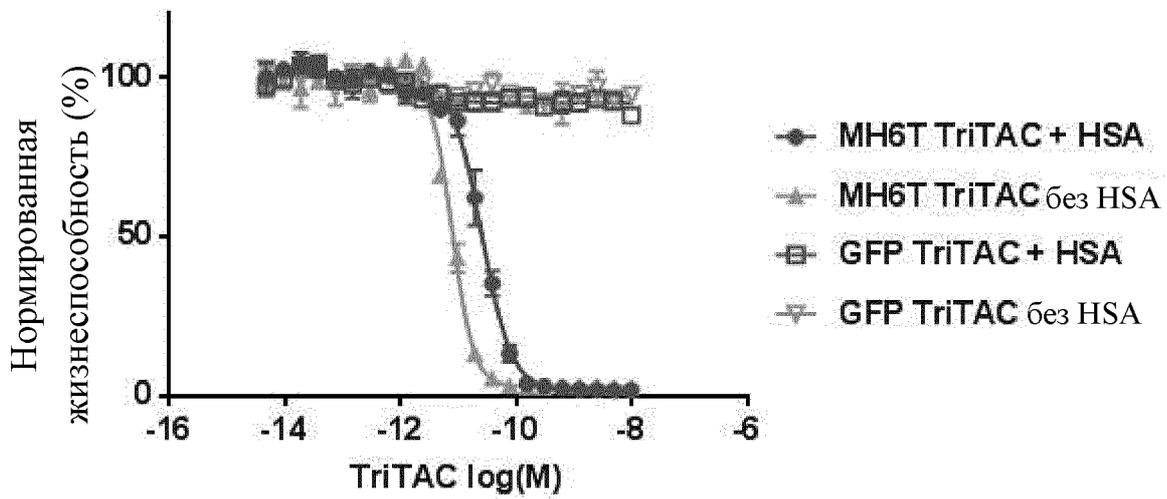
Фиг. 4



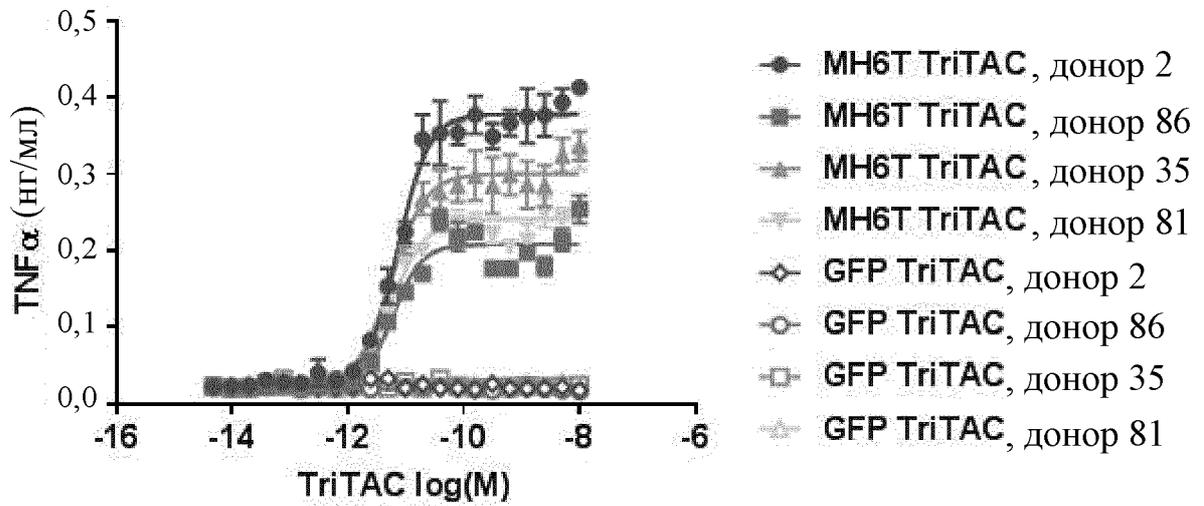
Фиг. 5



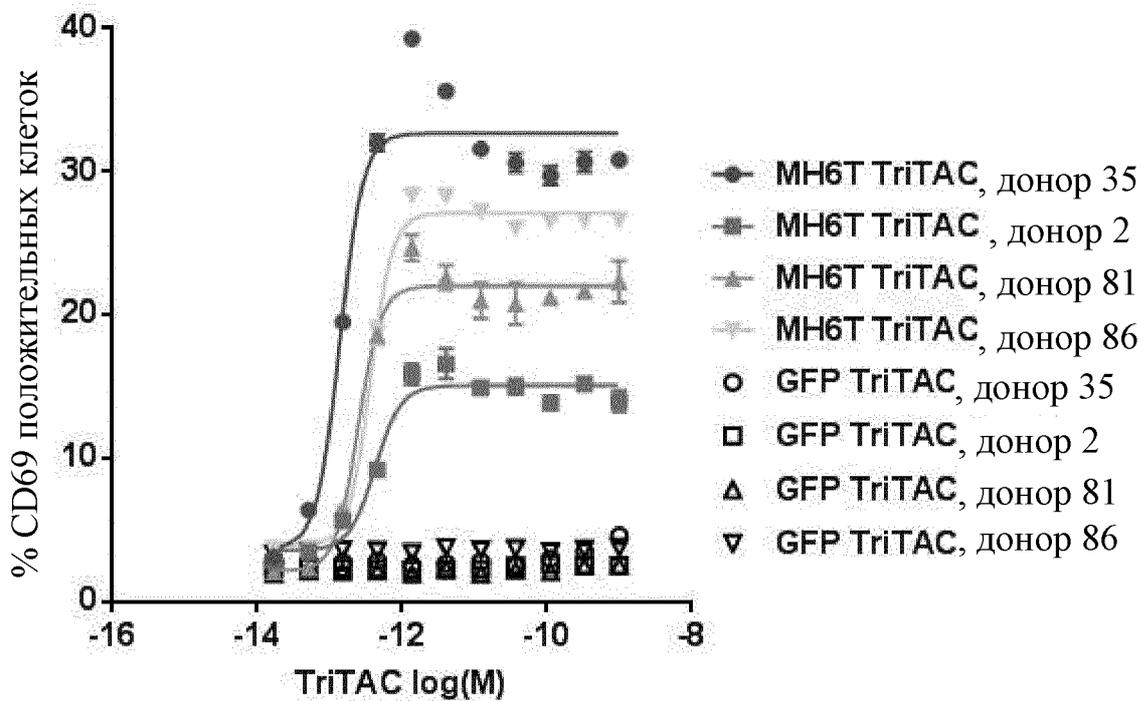
Фиг. 6



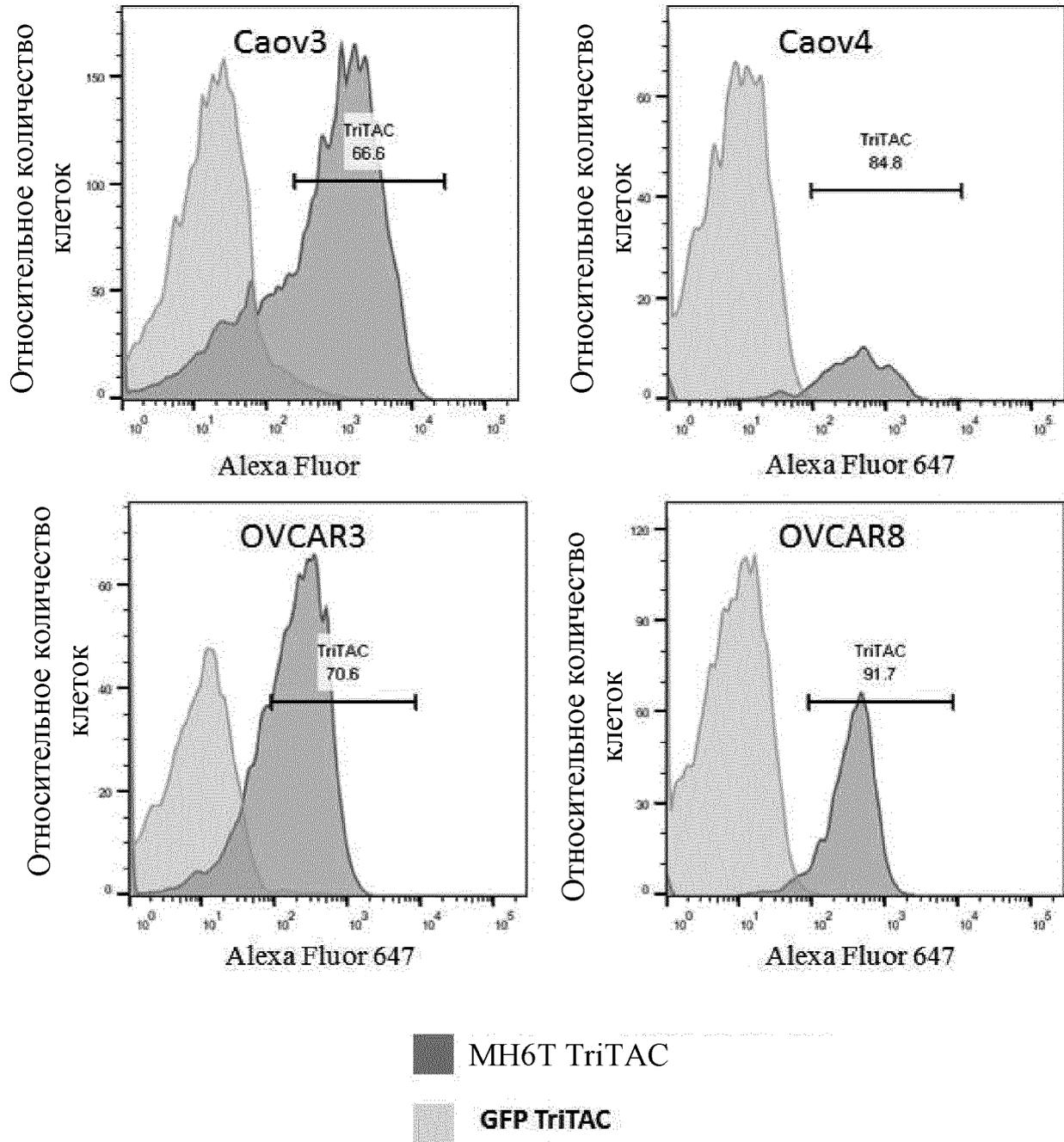
Фиг. 7



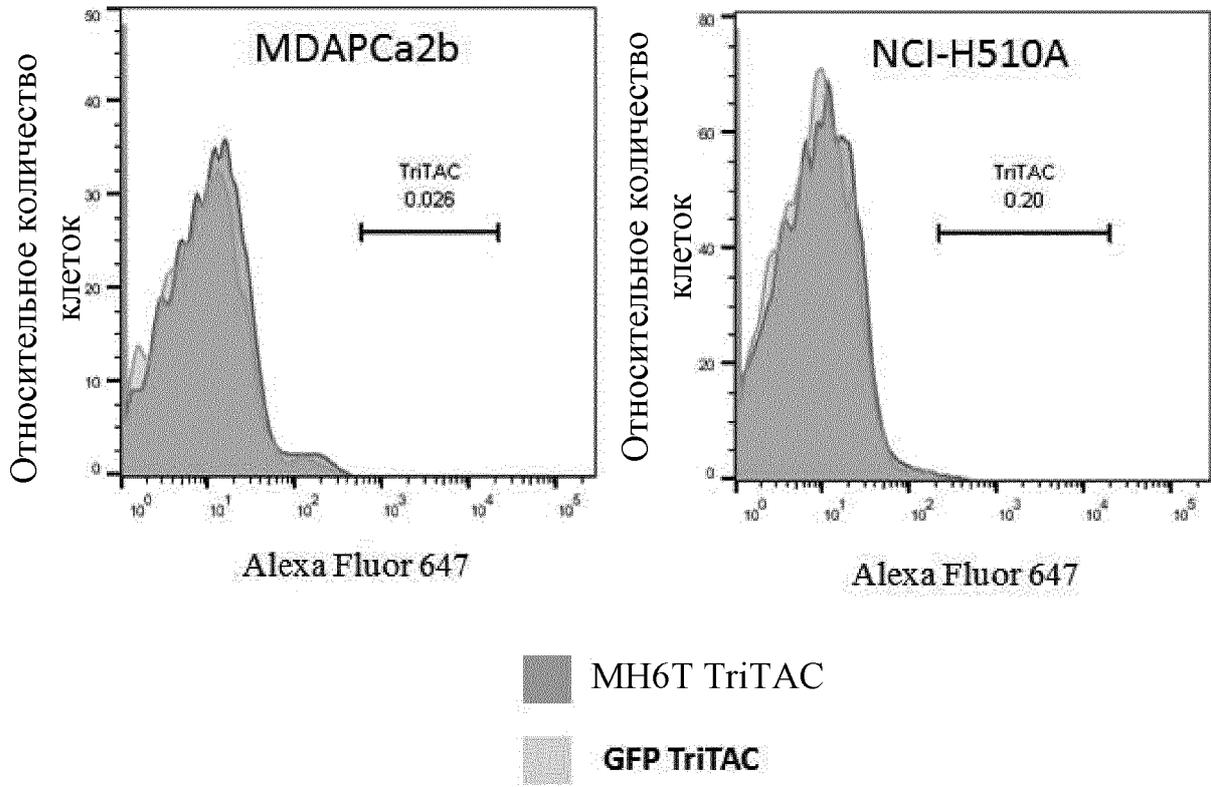
Фиг. 8



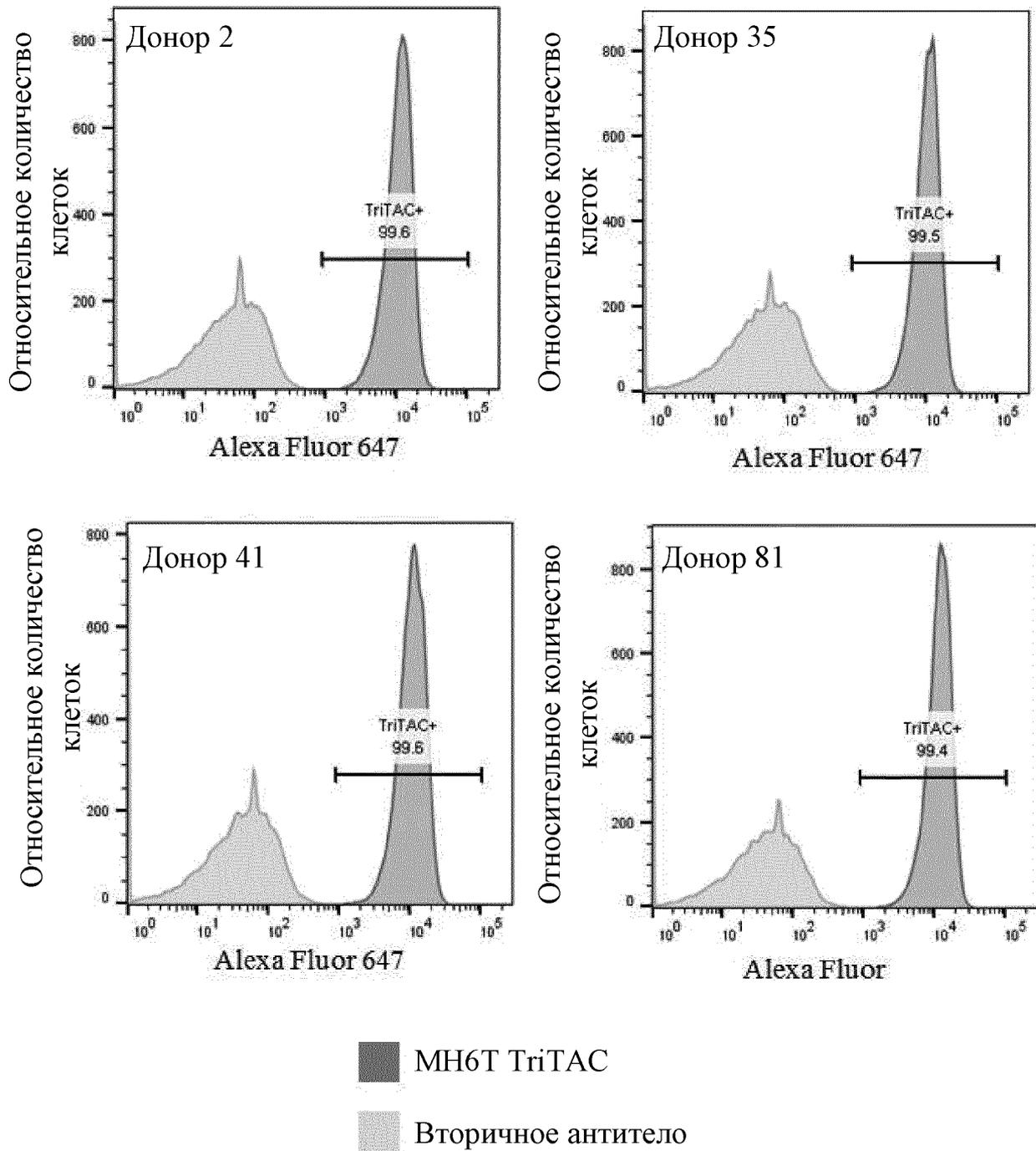
Фиг. 9



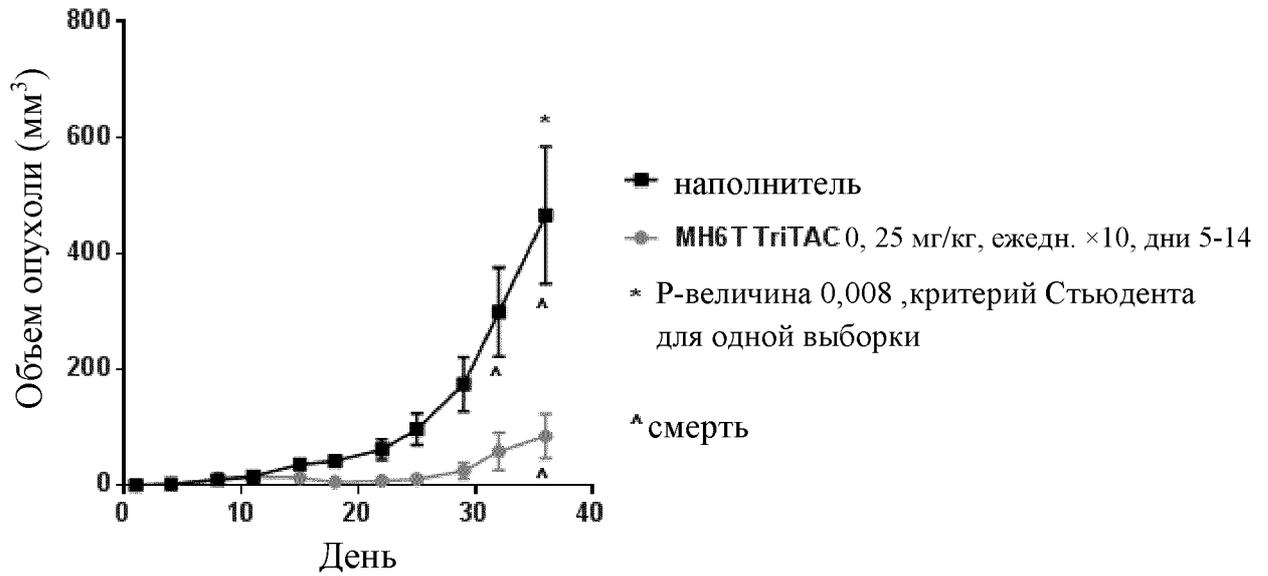
Фиг. 10А



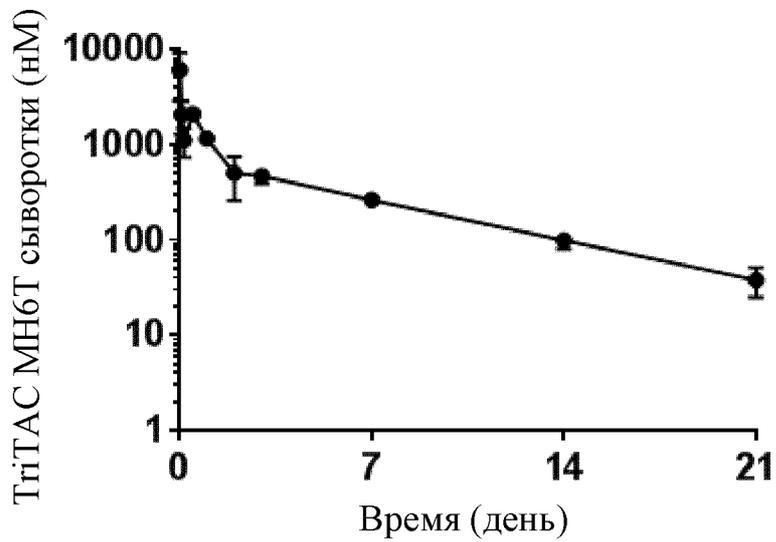
Фиг. 10В



Фиг. 11



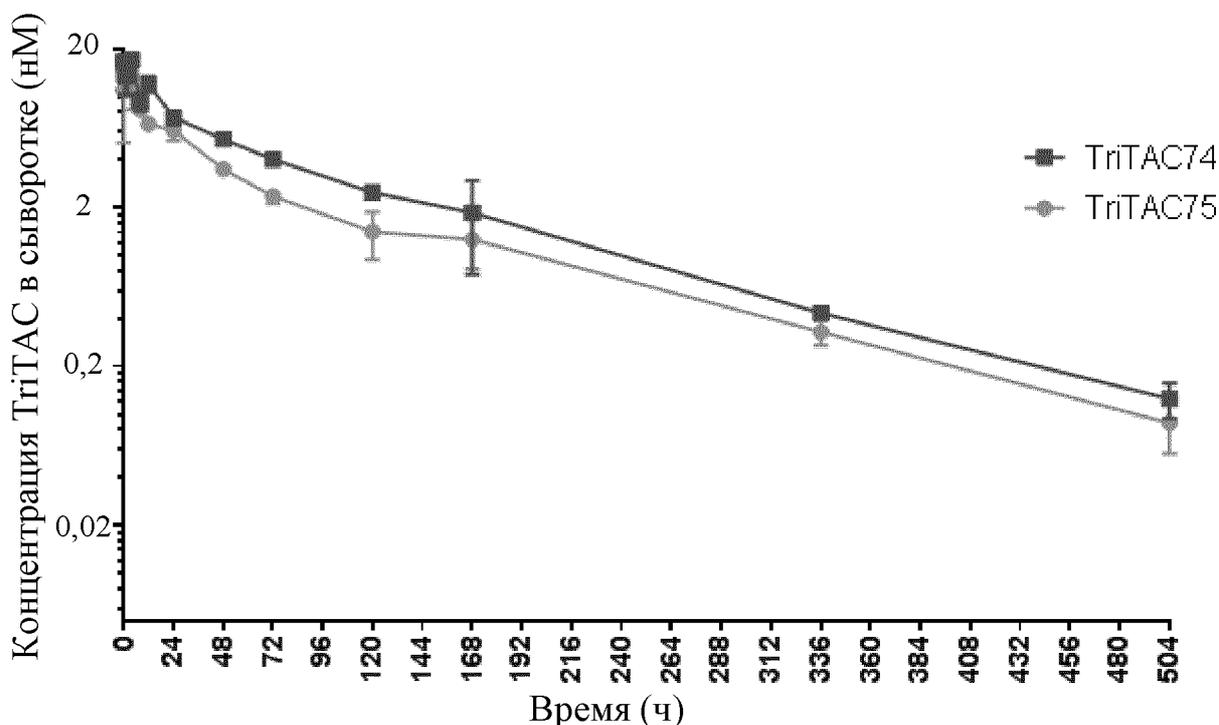
Фиг. 12



Фиг. 13

		TriTAC 75	TriTAC 74
<b>Измерения аффинности (M)</b>	<b>Kd hu опухоли-мишени</b>	5,9E-10	6,0E-10
	<b>Kd су опухоли-мишени</b>	3,2E-09	
	<b>Kd hu CD3E</b>	1,0E-08	5,2E-08
	<b>Kd hu ALB</b>	5,9E-09	6,5E-09
<b>Связывание в сыворотке яванского макака в конц. 50% (M):</b> измерено посредством анализа MSD (ELISA-подобн.)	<b>без сыворотки</b>	1,4E-08	2,1E-08
	<b>сыворотка яванского макака в конц. 50%</b>	5,3E-09	3,0E-08
<b>Стабильность в сыворотке яванского макака / сдвиг HSA (M):</b> измерено с использованием SKOV3 TDCC	<b>без воздействия</b>	2,3E-12	2,0E-11
	<b>без воздействия + huALB</b>	1,3E-11	9,5E-11
	<b>предварит. воздействие 2 дня в сыворотке яванского макака 37</b>	2,1E-12	6,8E-12
<b>Стабильность в сыворотке и активность в сыворотке яванского макака (M):</b> измерено посредством OVCAR TDCC, пробег анализа +/- 20% сыворотки яванского макака	<b>без воздействия</b>	1,4E-12	1,6E-12
	<b>без воздействия, анализ с сывороткой яванского макака</b>	4,1E-12	3,2E-11
	<b>предварит. воздействие 2 дня в сыворотке яванского макака 37, анализ с сывороткой яванского макака</b>	2,7E-12	1,9E-11

Фиг. 14



Фиг. 15