



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.14

(21) Номер заявки
201791057

(22) Дата подачи заявки
2015.11.13

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ТРИМЕРНЫЙ ЛИГАНД СЕМЕЙСТВА TNF

(31) 14193260.8; 15183736.6; 15188142.2

(32) 2014.11.14; 2015.09.03; 2015.10.02

(33) EP

(43) 2017.10.31

(86) PCT/EP2015/076528

(87) WO 2016/075278 2016.05.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Аманн Мария, Брюнкер Петер,
Клаус Кристина, Феррара-Коллер
Клаудиа, Грау-Рихардс Зандра, Кляйн
Кристиан, Левитски Виктор, Мёсснер
Эккехард (CH), Регула Йёрг Томас
(DE), Умана Пабло (CH)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) DAFNE MUELLER ET AL.: "A novel antibody-4-1BBL fusion protein for targeted costimulation in cancer immunotherapy", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 31, no. 8, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 714-722, XP009183889, United States ISSN: 1537-4513, DOI:

10.1097/CJI.0b013e31818353e9, abstract, page 715, left-hand column, paragraph 2, page 716, left-hand column, paragraph 1 - page 717, right-hand column, line 2, figure 1

HORNIG NORA ET AL.: "Combination of a Bispecific Antibody and Costimulatory Antibody-Ligand Fusion Proteins for Targeted Cancer Immunotherapy", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 35, no. 5, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 418-429, XP009163394, ISSN: 1524-9557, DOI: 10.1097/CJI.0B013E3182594387, abstract, page 418, right-hand column, last paragraph - page 419, paragraph 1, page 421, left-hand column, figure 1

N. ZHANG ET AL.: "Targeted and Untargeted CD137L Fusion Proteins for the Immunotherapy of Experimental Solid Tumors", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 13, no. 9, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 2758-2767, XP055186494, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2343, abstract, page 2760; figure 1

WO-A1-2010010051

AU-B2-2011265482

EDWIN BREMER: "Targeting of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily for Cancer Immunotherapy", ISRN ONCOLOGY, vol. 176, no. 2, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 974-25, XP055184622, ISSN: 2090-5661, DOI: 10.1186/1479-5876-9-204, page 14, paragraph 1 - page 17, left-hand column, paragraph 1, figures 8, 9

(57) В изобретении описаны новые содержащие тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающие молекулы, которые содержат: (а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и (б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, отличающиеся тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к новым антигенсвязывающим молекулам, содержащим тримерный лиганд семейства TNF, которые содержат: (а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и (б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, при этом антигенсвязывающие молекулы отличаются тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и отличаются тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент. Изобретение относится также к способам получения указанных молекул и способам их применения.

Предпосылки создания изобретения

Лиганды, взаимодействующие с молекулами из суперсемейства рецептора TNF (фактор некроза опухоли), играют основные роли в организации и функции иммунной системы. Несмотря на то что они регулируют нормальные функции, такие как иммунные ответы, гематопоз и морфогенез, лиганды семейства TNF (которые называют также цитокинами), участвуют в онкогенезе, отторжении трансплантатов, септическом шоке, репликации вирусов, ревматоидном артрите и диабете (Aggarwal, 2003). Семейство лигандов TNF содержит 18 генов, которые кодируют 19 трансмембранных белков типа II (т.е. внутриклеточных N-концевых и внеклеточных C-концевых), отличающихся присутствием консервативного C-концевого домена, обозначенного как "домен гомологии TNF" (THD). Указанный домен ответствен за связывание с рецептором и поэтому имеет решающее значение для биологической активности представителей семейства лигандов TNF. Идентичность последовательностей между представителями семейства составляет ~20-30% (Bodmer, 2002). Представители семейства лигандов TNF проявляют свою биологическую функцию в виде образовавшихся в результате самосборки нековалентных тримеров (Banner и др., Cell, 73, 1993, сс. 431-445). Так, представители семейства лигандов TNF образуют тример, который обладает способностью связываться с соответствующими рецепторами суперсемейства TNFR и активировать их.

4-1BB (CD137), представитель суперсемейства TNF-рецепторов, впервые был идентифицирован в качестве молекулы, экспрессия которой индуцируется Т-клеточной активацией (Kwon и Weissman, 1989). В последующих исследованиях продемонстрирована экспрессия 4-1BB в Т- и В-лимфоцитах (Snell и др., 2011; Zhang и др., 2010), NK-клетках (Lin и др., 2008), NKT-клетках (Kim и др., 2008), моноцитах (Kienzle и von Kempis, 2000; Schwarz и др., 1995), нейтрофилах (Heinisch и др., 2000), тучных клетках (Nishimoto и др., 2005) и дендритных клетках, а также в клетках негематопозитического происхождения, таких как эндотелиальные клетки и клетки гладких мышц (Broil и др., 2001; Olofsson и др., 2008). Экспрессия 4-1BB в различных типах клеток является в значительной степени индуцибельной и запускается различными стимуляторными сигналами, такими как сигналы, которые запускаются Т-клеточным рецептором (TCR) или В-клеточным рецептором, а также передачей сигналов, индуцируемой костимуляторными молекулами или рецепторами провоспалительных цитокинов (Diehl и др., 2002; von Kempis и др., 1997; Zhang и др., 2010).

Экспрессия лиганда для 4-1BB (4-1BBL или CD137L) является более ограниченной и встречается на специализированных антигенпрезентирующих клетках (APC), таких как В-клетки, дендритные клетки (DC) и макрофаги. Индуцибельная экспрессия 4-1BBL характерна для Т-клеток, включая как $\alpha\beta$ -, так и $\gamma\delta$ -субпопуляции Т-клеток, и эндотелиальных клеток (см. обзор Shao и Schwarz, 2011).

Известно, что передача сигналов CD137 стимулирует секрецию IFN γ и пролиферацию NK-клеток (Buechele и др., 2012; Lin и др., 2008; Melero и др., 1998), а также повышает активацию DC, что продемонстрировано по их увеличенной выживаемости и способности секретировать цитокины и осуществлять повышающую регуляцию костимуляторных молекул (Choi и др., 2009; Futagawa и др., 2002; Wilcox и др., 2002). Однако CD137 наиболее хорошо охарактеризован в качестве костимуляторной молекулы, которая модулирует индуцируемую TCR активацию как CD4 $^{+}$ -, так и CD8 $^{+}$ -субпопуляций Т-клеток. В сочетании с осуществляемой TCR стимуляцией агонистические 4-1BB-специфические антитела повышают пролиферацию Т-клеток, стимулируют секрецию лимфокинов и понижают чувствительность Т-лимфоцитов к индуцированной активации смерти клеток (обобщено в обзоре Snell и др., 2011).

В соответствии с указанными костимуляторными действиями антител к 4-1BB на Т-клетки *in vitro*, их введение несущим опухоли мышам приводило к эффективным противоопухолевым действиям на многих экспериментальных моделях опухолей (Melero и др., 1997; Narazaki и др., 2010). Однако 4-1BB, как правило, проявляет действие в качестве противоопухолевого агента только при введении в комбинации с другими иммуномодуляторами (Curran и др., 2011; Guo и др., 2013; Morales-Kastresana и др., 2013; Teng и др., 2009; Wei и др., 2013), химиотерапевтическими реагентами (Ju и др., 2008; Kim и др., 2009), в сочетании со специфической для опухоли вакцинацией (Cuadros и др., 2005; Lee и др., 2011) или лучевой терапией (Shi and Siemann, 2006). В экспериментах по истощению *in vivo* продемонстрировано, что CD8 $^{+}$ -Т-клетки играют наиболее решающую роль в противоопухолевом воздействии 4-1BB-специфических антител. Однако в зависимости от модели опухоли или комбинированной терапии, которая включает антитело к 4-1BB, описано участие других типов клеток, таких как DC, NK-клетки или CD4 $^{+}$ -Т-клетки (Melero и др., 1997; Murillo и др., 2009; Narazaki и др., 2010; Stagg и др., 2011).

Помимо их непосредственных воздействий на различные субпопуляции лимфоцитов, агонисты 4-1BB могут также индуцировать инфильтрацию и удержание активированных Т-клеток в опухоли посредством опосредуемой 4-1BB повышающей регуляции молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM1) и адгезивной молекулы сосудистых клеток 1 (VCAM1) на сосудистом эндотелии опухоли (Palazon и др., 2011).

Стимуляция 4-1BB может также обращать состояние Т-клеточной анергии, индуцированное экспозицией растворимого антигена, что может вносить вклад в нарушение иммунологической толерантности в микроокружении опухоли или при хронических инфекциях (Wilcox и др., 2004).

По видимому, для проявления иммуномодулирующих свойств агонистических антител к 4-1BB *in vivo* требуется присутствие Fc-области дикого типа в молекуле антитела, что свидетельствует о том, что связывание с Fc-рецептора является важным событием, необходимым для фармакологической активности указанных реагентов, что описано для агонистических антител, специфических в отношении других индуцирующих апоптоз или иммуномодулирующих представителей TNFR-суперсемейства (Li и Ravetch, 2011; Teng и др., 2009). Однако системное введение 4-1BB-специфических агонистических антител с функционально активным Fc-доменом индуцирует также экспансию CD8⁺-Т-клеток, с которой ассоциирована токсичность для печени (Dubrot и др., 2010), что снижается или практически элиминируется в отсутствии функциональных Fc-рецепторов у мышей. В клинических испытаниях на людях (ClinicalTrials.gov, NCT00309023), Fc-компетентные агонистические антитела к 4-1BB (BMS-663513) при их введении один раз каждые три недели в течение 12 недель индуцировали стабилизацию болезни у пациентов с меланомой, раком яичника или почечно-клеточной карциномой. Однако это же антитело в другом испытании (NCT00612664) вызывало гепатит 4-й степени, что привело к прекращению испытания (Simeone и Ascierto, 2012).

В целом, доступные результаты доклинических и клинических испытаний четко демонстрируют, что существует значительная клиническая потребность в эффективных агонистах 4-1BB. Однако новое поколение перспективных лекарственных средств должно не только эффективно привлекать 4-1BB к поверхности гематопозитических и эндотелиальных клеток, но также должно обладать способностью достигать этого посредством механизмов отличных от связывания с Fc-рецепторами во избежание неконтролируемых побочных действий. Выполнение последнего условия можно обеспечивать посредством преимущественного связывания со специфическими для опухолей или ассоциированными с тканями фрагментами и олигомеризации.

Были созданы слитые белки, состоящие из одного внеклеточного домена лиганда для 4-1BB и фрагмента одноцепочечного антитела (Mueller и др., 2008; Hornig и др., 2012) или одного лиганда для 4-1BB, слитого с С-концом тяжелой цепи (Zhang и др., 2007). В WO 2010/010051 описано создание слитых белков, которые состоят из трех эктодоменов лиганда TNF, сцепленных друг с другом и слитых с участком антитела.

Однако все еще существует потребность в новых антигенсвязывающих молекулах, которые объединяют фрагмент, который обладает способностью связываться преимущественно со специфическими для опухолей или ассоциированными с опухолевыми тканями мишенями, с фрагментом, который обладает способностью образовывать костимуляторный тримерный лиганд TNF, и которые обладают достаточной стабильностью, позволяющей применять их в фармацевтике. Антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат оба указанных компонента и, как неожиданно было установлено, они содержат тримерный и поэтому биологически активный лиганд TNF, хотя один из образующих тримерный лиганд TNF эктодоменов локализован на полипептиде, отличном от полипептида, на котором расположены два других эктодомена в молекуле лиганда TNF.

Краткое изложение сущности изобретения

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного предста-

вителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, и

(в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что:

(I) первый полипептид содержит CH1- или CL-домен и второй полипептид содержит CL- или CH1-домен соответственно, при этом второй полипептид сцеплен с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменом и при этом первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с CH1- или CL-доменом пептидным линкером, и при этом второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который соединен пептидным линкером с CL- или CH1-доменом указанного полипептида, или

(II) первый полипептид содержит CH3-домен, и второй полипептид содержит CH3-домен соответственно, и при этом первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с C-концом CH3-домена пептидным линкером, и при этом второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который соединен пептидным линкером с C-концом CH3-домена указанного полипептида, или

(III) первый полипептид содержит VH-CL- или VL-CH1-домен и второй полипептид содержит VL-CH1-домен или VH-CL-домен соответственно, при этом второй полипептид сцеплен с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменом, и при этом первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с VH или VL пептидным линкером, и при этом второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, соединенный через пептидный линкер с VL или VH указанного полипептида.

В конкретном объекте изобретения представитель семейства лигандов TNF представляет собой лиганд, который костимулирует активацию человеческих Т-клеток. Таким образом, антигенсвязывающая молекула, которая содержит тримерный лиганд семейства TNF, содержит: (а) по меньшей мере один фрагмент, который обладает способностью специфическим связываться с антигеном клетки-мишени, и (б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, где представитель семейства лигандов TNF костимулирует активацию человеческих Т-клеток. Более конкретно, представителя семейства лигандов TNF выбирают из 4-1BBL и OX40L.

В одном из объектов изобретения представителем семейства лигандов TNF является 4-1BBL.

В следующем объекте изобретения эктодомен представителя семейства лигандов TNF содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 375, прежде всего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 96.

В другом объекте изобретения эктодомен представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 96, прежде всего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 96. Более конкретно эктодомен представителя семейства лигандов TNF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с анти-

геном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183.

Еще одним объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97 и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 184 или SEQ ID NO: 185.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и

(б) первый полипептид, который содержит CH1- или CL-домен, и второй полипептид, который содержит CL- или CH1-домен соответственно, при этом второй полипептид сцеплен с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменом,

и где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом и с CH1- или CL-доменом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который соединен пептидным линкером с CL- или CH1-доменом указанного полипептида.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и

(б) первый полипептид, который содержит CH1-домен, и второй полипептид, который содержит CL-домен, при этом второй полипептид сцеплен с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменом,

и где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с CH1-доменом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который соединен пептидным линкером с CL-доменом указанного полипептида.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и

(б) первый полипептид, который содержит CL-домен, и второй полипептид, который содержит CH1-домен, при этом второй полипептид сцеплен с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменом,

и где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с CL-доменом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который соединен пептидным линкером с CH1-доменом указанного полипептида.

Следующим объектом изобретения является указанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, выбирают из группы, состоящей из антители, фрагмента антители и антигенсвязывающего белка-каркаса (скаффолд-белок).

Одним из объектов изобретения является указанная выше антигенсвязывающая молекула, содер-

жащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой фрагмент антитела.

В частности, участок, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, выбирают из группы, состоящей из фрагмента антитела, молекулы Fab, кроссовер-молекулы Fab, одноцепочечной молекулы Fab, молекулы Fv, молекулы scFv, однодоменного антитела, aVH и антигенсвязывающего белка-каркаса.

Одним из объектов изобретения является указанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой антигенсвязывающий белок-каркас.

В изобретении предложена указанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой молекулу Fab, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени.

В изобретении предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени. Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит один участок, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени. Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит два участка, обладающих способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, где антиген клетки-мишени выбирают из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), карциноэмбриональный антиген (CEA), ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), CD19, CD20 и CD33.

В конкретном объекте изобретения антиген клетки-мишени представляет собой фибробласт-активирующий белок (FAP).

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с FAP, содержит VH-домен, который содержит (I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 100, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 101, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 102, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 103, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 104, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 105.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с FAP, содержит VH-домен, который содержит (I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с FAP, содержит VH-домен, который содержит (I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

Одним из объектов изобретения является указанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с FAP, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с FAP, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107.

Следующим объектом изобретения является предлагаемая в изобретении антигенсвязывающая мо-

лекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, соединенные друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на его С-конце с CH1- или CL-доменом тяжелой цепи с помощью второго пептидного линкера, и в которой один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент слит на его С-конце с CL- или CH1-доменом легкой цепи с помощью третьего пептидного линкера.

Конкретным объектом изобретения является указанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой пептидный линкер представляет собой $(G4S)_2$, т.е. пептидный линкер, имеющий SEQ ID NO: 13. В одном из объектов изобретения первый пептидный линкер представляет собой $(G4S)_2$, второй пептидный линкер представляет собой GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 57) и третий пептидный линкер представляет собой $(G4S)_2$. В другом объекте изобретения первый, второй и третий пептидные линкеры представляют собой $(G4S)_2$.

Изобретение относится также к указанной выше антигенсвязывающей молекуле, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит Fc-домен, состоящей из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации.

В частности, предлагаемая в изобретении антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит (в) Fc-домен, состоящей из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации, содержит также (а) молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, в которой тяжелая цепь Fab слита на С-конце с N-концом CH2-домена в Fc-доме.

В следующем объекте изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG, прежде всего Fc-домен IgG1 или Fc-домен IgG4. Более предпочтительно Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит модификацию, усиливающую ассоциацию первой и второй субъединиц Fc-домена.

Другим объектом изобретения является указанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации, в которой Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ых) замену(н), которая(ые) снижает(ют) связывание с Fc-рецептором, прежде всего с Fcγ-рецептором.

В частности, Fc-домен содержит аминокислотные замены в положениях 234 и 235 (EU-нумерация) и/или 329 (EU-нумерация) тяжелых цепей IgG. Более конкретно, описана антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, которая содержит Fc-домен IgG1 с аминокислотными заменами L234A, L235A и P329G (EU-нумерация).

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит

первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, обе образующие молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени,

первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слитый на его С-конце с помощью второго пептидного линкера со второй тяжелой или легкой цепью, и

второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF, слитый на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера со второй легкой или тяжелой цепью соответственно.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на его С-конце с помощью второго пептидного линкера с CH1-доменом, который является частью тяжелой цепи, а второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CL-доменом, который является частью легкой цепи.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на его С-конце с помощью второго пептидного линкера с CL-доменом, который является частью легкой цепи, а второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CH1-доменом, который является частью тяжелой цепи.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на его С-конце с помощью второго пептидного линкера с VH-доменом, который является частью тяжелой цепи, а второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейст-

ва лигандов TNF или его фрагмент, слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с VL-доменом, который является частью легкой цепи.

Предложена также антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой в CL-домене, примыкающем к представителю семейства лигандов TNF, аминокислота в положении 123 (EU-нумерация) заменена на аргинин (R) и аминокислота в положении 124 (EU-нумерация) заменена на лизине (K) и в которой в CH1, примыкающем к представителю семейства лигандов TNF, аминокислоты в положении 147 (EU-нумерация) и в положении 213 (EU-нумерация) заменены на глутаминовую кислоту (E).

Следующим объектом изобретения является описанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(а) первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, обе образующие молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени;

(б) вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и

вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(а) молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с FAP; и

(б) вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и

вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит участок, обладающий способностью специфически связываться с FAP. Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107,

(II) вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 139 и SEQ ID NO: 148, и

(III) вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 115.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или

первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 173, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 174.

Еще одним объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит CH3-домен и второй полипептид содержит CH3-домен соответственно, и в которой первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с С-концом CH3-домена пептидным линкером, и в которой второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, соединенный через пептидный линкер с С-концом CH3-домена указанного полипептида.

В частности, указанная антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства

TNF, содержит два участка, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит два участка, обладающих способностью специфически связываться с FAP. В частности, предложена описанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, или

(II) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, или

(III) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125.

Другим конкретным объектом изобретения является описанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антиген клетки-мишени представляет собой CD19.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с CD19, содержит VH-домен, который содержит (I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195 или SEQ ID NO: 252, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 253, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197 или SEQ ID NO: 254, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198 или SEQ ID NO: 249, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199 или SEQ ID NO: 250, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200 или SEQ ID NO: 251.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с CD19, содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, или в которой участок, обладающий способностью специфически связываться с FAP, содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 358.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, или

первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 358,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 113, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 114.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, или

первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 358,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 173, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 174.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит два фрагмента, обладающих способностью специфически связываться с CD19. В частности, предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный ли-

ганд семейства TNF, по одному из пп.1-14, 29, 30 и 32-34 формулы изобретения, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, или

(II) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, или

(III) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 309, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279, или

(IV) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 313, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279.

Другим конкретным объектом изобретения является описанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антиген клетки-мишени представляет собой CEA.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с CEA, содержит VH-домен, который содержит (I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 321, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 322, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 323, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 325, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с CEA, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 113, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 114.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 173, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 174.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит два фрагмента, обладающих способностью специфически связываться с CEA. В частности, предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, или

(II) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334.

Следующим объектом изобретения является описанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где представителем семейства лигандов TNF является OX40L. Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой эктодомен представителя семейства лигандов TNF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, прежде всего аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 53.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, по одному из пп.1-5, 10-24, 29, 30, 32-34, 38-40, 44 и 45 формулы изобретения, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 371 или SEQ ID: 372, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антиген клетки-мишени представляет собой фибробласт-активирующий белок (FAP), и фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с FAP, содержит VH-домен, который содержит (I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 100, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 101, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 102, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 103, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 104, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 105.

В частности, предложена описанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или

первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 355, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 356.

Другим объектом изобретения является выделенный полинуклеотид, который кодирует описанную выше антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF. Изобретение относится также к вектору, прежде всего экспрессионному вектору, который содержит выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, и к клетке-хозяину, которая содержит выделенный полинуклеотид или вектор, предлагаемый в изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, прежде всего клетку млекопитающего.

Другим объектом изобретения является способ получения антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых (I) культивируют клетку, предлагаемую в изобретении, в условиях, пригодных для экспрессии антигенсвязывающей молекулы, и (II) выделяют антигенсвязывающую молекулу. Изобретение относится также к антигенсвязывающей молекуле, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, которая получена способом, предлагаемым в изобретении.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, которая содержит антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемую в изобретении, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

Под объем изобретения подпадает также антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, или фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении, для применения в качестве лекарственного средства. Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, или фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении, для применения для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. В конкретном варианте осуществления изобретения предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, или фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении, для применения для лечения рака.

Предложено также применение антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом, прежде всего для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака, а также способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композицию, которая содержит антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемую в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В кон-

кретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В любом из указанных выше вариантов осуществления изобретения индивидуум предпочтительно представляет собой млекопитающее, прежде всего человека.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано

на фиг. 1 - компоненты для сборки разделенных тримерных лигандов для человеческого 4-1BB. На фиг. (1А) показан димерный лиганд, слитый на С-конце с человеческим СН1- или CL-доменом или VL- или VH-доменом, а на фиг. (1Б) показан мономерный лиганд, слитый с человеческим CL- или СН1-доменом или VL- или VH-доменом. На фиг. (1В) показан димерный лиганд, слитый на N-конце с человеческим СН3-доменом, а на фиг. (1Г) показан мономерный лиганд, слитый на N-конце с человеческим СН3-доменом;

на фиг. 2 - конструкции 1.1-1.10 предлагаемых в изобретении антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный 4-1BBL. Предварительная подготовка и получение этих конструкций описаны в примере 1. VH- и VL-домены представляют собой домены антитела к FAP 28H1, жирной черной точкой обозначена модификация типа "knob-into-hole" (kih). Символом * обозначены аминокислотные модификации в СН1- и CL-доменах (так называемые заряженные остатки);

на фиг. 3 - компоненты для сборки разделенных тримерных лигандов для человеческого 4-1BB. На фиг. (3А) показан димерный лиганд, который слит на С-конце с мышинным CL-доменом, а на фиг. (3Б) показан мономерный лиганд, слитый на С-конце с мышинным СН1-доменом. Показаны компоненты для сборки нацеленного на FAP разделенного тримерного лиганда для мышинового 4-1BB. На фиг. (3В) показаны антигенсвязывающие молекулы, содержащие собранный тримерный мышинный 4-1BBL, описанные более подробно в примере 1.3;

на фиг. 4 - конструкции 2.1-2.6 предлагаемых в изобретении антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный 4-1BBL. Предварительная подготовка и получение этих конструкций описаны в примере 2. VH- и VL-домены представляют собой домены антитела к FAP 4B9, жирной черной точкой обозначена модификация типа "knob-into-hole". Символом * обозначены аминокислотные модификации в СН1- и CL-доменах (так называемые заряженные остатки);

на фиг. 5А и 5Б - ненаправленные на определенную мишень ("ненацеленные") варианты конструкций 1.1 и 1.2, содержащие молекулу Fab DP47 (зародышевая линия человеческих антител) вместо молекулы Fab к FAP. Молекулы обозначены как контроль А и контроль Б соответственно. Получение описано в примере 1.4. На 5Б - изображение конструкции: мономерный 4-1BB-Fc(kih), получение которой описано в примере 3;

на фиг. 6 - данные о связывании антигенсвязывающей молекулы, содержащей нацеленный на FAP тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) (FAP разделенный тримерный 4-1BBL, обозначена закрашенными окружностями) или "ненацеленной" полученной на основе DP47 антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с (kih) (DP47 разделенный тримерный 4-1BBL, незакрашенные окружности) с покоящимися (наивными) или активированными человеческими РМВС. В частности, данные о связывании с покоящимися (наивными) или активированными человеческими CD8⁺-Т-клетками представлены на фиг. (6А), с покоящимися (наивными) или активированными человеческими CD4⁺-Т-клетками - на фиг. (6Б) и с покоящимися (наивными) или активированными человеческими NK-клетками - на фиг. (6В). Представлены данные о связывании в виде медианного значения интенсивности флуоресценции (MFI) меченного с помощью полученного из красных макрофитных водорослей фикоэритрина (R-PE) F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического, который применяли в качестве вторичного антитела. MFI измеряли с помощью проточной цитометрии и осуществляли коррекцию на фоновый уровень путем вычитания MFI для "пустого" контроля;

на фиг. 7 - связывание различных нацеленных на FAP или "ненацеленных" конструкций, содержащих тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih), с экспрессирующими человеческий 4-1BB Т-клетками из предварительно активированных РНА-Л и пролейкином и повторно активированных антителом к человеческому CD3/к человеческому CD28 человеческих РВМС. Связывание обнаруживали с помощью конъюгированного с флуорохромом, таким как R-фикоэритрин, F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического. Представлены медианные значения интенсивности флуоресценции (MFI) в зависимости от концентрации тестируемых конструкций 1.1-1.10, описанных в примере 1. Для лучшей формы представления кривые связывания разделяли на 4 различные группы графиков, в каждой из которых в качестве кривых сравнения приводили кривые связывания конструкции 1.1 (одновалентная нацеленная на FAP содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih)) и контрольной конструкции Б (одновалентная "ненацеленная" содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) с СН-CL-кроссовером и заряженными остатками). Связывание оценивали с использованием CD3⁺CD8⁺-Т-клеток (фиг. 7А) и CD3⁺CD4⁺-Т-клеток (фиг. 7Б). Уровень экспрессии 4-1BB на CD8-Т-клетках в норме выше, чем на CD4-Т-клетках. Все версии связывались с человеческим 4-1BB с практически одинаковой аффинностью;

на фиг. 8 - данные о связывании различных нацеленных на FAP или "ненацеленных" конструкций, содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih), с CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками из свежeweделенных PBMC (фиг. 8А) или с экспрессирующими человеческий 4-1BB предварительно активированными РНА-L и пролейкином и повторно активированными антителом к человеческому CD3/к человеческому CD28 человеческими PBMC (фиг. 8Б). Связывание обнаруживали с помощью конъюгированного с флуорохромом, таким как R-фикоэритрин, F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcy-специфического. Представлены медианные значения интенсивности флуоресценции (MFI) в зависимости от концентрации тестируемых конструкций 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 и 2.6, описанных в примере 2, контрольных молекул, а именно контроль Б, контроль В, контроль Д и контроль Е. Для лучшей формы представления кривые связывания разделяли на 2 различные группы графиков, в каждой из которых в качестве кривых сравнения приводили кривые связывания конструкции 2.1 (одновалентная нацеленная на FAP содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih)) и контрольной конструкции Б (одновалентная "ненацеленная" содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) с CH-CL-кроссовером и заряженными остатками). Связывание оценивали с использованием CD45 CD3 CD8⁺-Т-клеток (нижняя группа графиков) и CD45⁺CD3⁺CD4⁺-Т-клеток (верхняя группа графиков). Уровень экспрессии 4-1BB на CD8⁺-Т-клетках в норме выше, чем на CD4⁺-Т-клетках. Все конструкции связывались практически с одинаковой аффинностью с человеческим 4-1BB, однако двухвалентная конструкция 2.3 и соответствующий ей "ненацеленный" контроль В характеризовались более низким значением MFI. Это может быть связано со стерической помехой связыванию 4-1BB и/или более низким уровнем детекции вторичного идентифицирующего антитела, что обусловлено конъюгированным с Fc разделенным лигандом для 4-1BB;

на фиг. 9 - данные о связывании нацеленной на FAP антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) (FAP разделенный тримерный 4-1BBL, обозначена закрашенными окружностями) или "ненацеленной" полученной на основе DP47 антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih), с активированными мышинными спленоцитами. В частности, данные о связывании с активированными мышинными CD4⁺-Т-клетками представлены на фиг. (9А), а с активированными мышинными CD8⁺-Т-клетками - на фиг. (9Б). В качестве положительного контроля применяли специфическое в отношении мышинного CD137 человеческое антитело в виде IgG1 P329G LALA (клон Lob12.3) (треугольники). Связывание характеризовали на основе графика зависимости значений MFI для меченного с помощью R-PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcy-специфического, применяемого в качестве вторичного идентифицирующего антитела, от концентрации (в нМ) тестируемых конструкций, содержащих разделенный тримерный 4-1BBL. MFI измеряли с помощью проточной цитометрии и осуществляли коррекцию на фоновый уровень путем вычитания MFI для "пустого" контроля;

на фиг. 10 - данные о связывании антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) (закрашенными окружностями обозначена конструкция 1.1: нацеленная на FAP антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih), незакрашенными окружностями обозначена контрольная молекула А: "ненацеленная" полученная на основе DP47 антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih)) с экспрессирующими фибробласт-активирующий белок (FAP) клетками человеческой меланомы (А) линии MV-3 и (Б) линии WM-266-4. Связывание характеризовали на основе графика зависимости значений MFI для меченного с помощью R-PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcy-специфического, применяемого в качестве вторичного идентифицирующего антитела, от концентрации (в нМ) тестируемых конструкций, содержащих разделенный тримерный 4-1BBL. MFI измеряли с помощью проточной цитометрии и осуществляли коррекцию на фоновый уровень путем вычитания MFI для "пустого" контроля;

на фиг. 11 - данные о связывании различных нацеленных на FAP или "ненацеленных" конструкций, содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih), с экспрессирующими человеческий FAP клетками человеческой меланомы MV-3 (фиг. 11А) и/или с трансфектированными клетками эмбриональных мышинных фибробластов линии NIH/3T3-huFAP, клон 39 (фиг. 11Б). Связывание обнаруживали с помощью конъюгированных с флуорохромом, таким как R-фикоэритрин или флуоресцеин, F(ab')₂-фрагментов козьего IgG против человеческого IgG, Fcy-специфических. Показана зависимость медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации тестируемых конструкций. Для лучшей формы представления кривые связывания разделяли на 4 (фиг. 11А) или две (фиг. 11Б) различные группы графиков, при этом кривую для конструкции 1.1 (одновалентная нацеленная на FAP содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih)) применяли в качестве кривой сравнения. Все конструкции связывались с человеческим FAP со сходной аффинностью за исключением двухвалентных нацеленных на FAP конструкций (конструкции 1.5, 1.7 и 1.8). Для них обнаружена тенденция к получению более низких величин EC₅₀ и более низких медианных значений интенсивности флуоресценции. Это можно объяснить их двухвалентным таргетингом (более высокая avidность, меньшее количество молекул может связываться одновременно из-за оккупации двух эпитопов,

что приводит к более низким значениям MFI). Различия между конструкцией 1.8 (полный двухвалентный таргетинг) и конструкциями 1.5 и 1.7 (только частичный двухвалентный таргетинг) могут быть объяснены также структурными различиями;

на фиг. 12 - данные о связывании различных нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 и 2.6 с экспрессирующими человеческий FAP клетками человеческой меланомы MV-3 (фиг. 12А) и WM-266-4 (фиг. 12Б). Связывание обнаруживали с помощью конъюгированного с флуорохромом, таким как R-фикоэритрин, F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического. Показана зависимость медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации тестируемых конструкций. Для лучшей формы представления кривые связывания разделяли на две различные группы графиков, при этом кривую для конструкции 2.1 (одновалентная нацеленная на FAP содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih)) применяли в качестве кривой сравнения. Все конструкции связывались с человеческим FAP со сходной аффинностью за исключением двухвалентной нацеленной на FAP конструкции 2.3. Для нее характерны более низкие величины EC₅₀ и более низкие медианные значения интенсивности флуоресценции. Это можно объяснить ее двухвалентным таргетингом, приводящим к более высокой avidности, но меньшему уровню оккупации или количеству молекул FAP на клеточной поверхности, что обуславливало более низкие значения MFI;

на фиг. 13 - данные о связывании различных нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный мышинный лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций с CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками из свежeweделенных спленоцитов (фиг. 13А) или с экспрессирующими мышинный 4-1BB активированными агонистическими моноклональными антителами к мышинному CD3/к мышинному CD28 мышинными спленоцитами (фиг. 13Б). Связывание обнаруживали с помощью конъюгированного с флуорохромом, таким как ФИТЦ, F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против мышинного IgG, Fcγ-специфического. Показана зависимость медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации тестируемых конструкций. Оценивали связывание на CD3⁺ CD8⁺-Т-клетках (левая группа графиков) и CD3⁺ CD4⁺-Т-клетках (правая группа графиков). Уровень экспрессии 4-1BB на CD8-Т-клетках в норме выше, чем на CD4-Т-клетках. Все конструкции связывались с мышинным 4-1BB практически с одинаковой аффинностью;

на фиг. 14 - данные о связывании различных нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный мышинный лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций с экспрессирующими человеческий FAP опухолевыми клетками. Связывание обнаруживали с помощью конъюгированного с флуорохромом, таким как ФИТЦ, F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против мышинного IgG, Fcγ-специфического. Показана зависимость медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации тестируемых конструкций. Оценивали связывание на клетках MV-3 (фиг. 14А) и клетках WM-266-4 (фиг. 14Б). Нацеленные на FAP содержащие разделенный тримерный мышинный лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкции М.1 и М.2 связывались с FAP практически с одинаковой аффинностью;

на фиг. 15 - схема, иллюстрирующая общий принцип анализа NFκB-активности, который описан в примере 6.1, с использованием линии репортерных клеток. Показана схема анализа активации с использованием экспрессирующей человеческий 4-1BB линии репортерных клеток HeLa. Перекрестносшитый 4-1BB, экспрессируемый на репортерных клетках, индуцирует активацию NFκB и опосредуемую NFκB экспрессию люциферазы. После лизиса клеток люцифераза может катализировать окисление люциферина с образованием оксильюциферина. Для этой химической реакции характерна положительная корреляция с уровнем опосредуемой NFκB экспрессии люциферазы, и его можно измерять по уровню испускаемого света (в единицах испускаемого света). Соотношение экспрессирующих FAP опухолевых клеток и репортерной клеточной линии HeLa-huCD137-NFκB-лус составляло 5:1;

на фиг. 16 - данные, демонстрирующие, что активация пути передачи сигнала NFκB нацеленной на FAP антигенсвязывающей молекулой, содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) (конструкция 1.1) прямо зависела от ее связывания с экспрессирующими FAP клетками-мишенями. Экспрессирующие человеческий CD137 репортерные клетки HeLa-NFκB совместно культивировали с указанными клетками, характеризующимися различными уровнями экспрессии FAP на клеточной поверхности. Люциферазную активность оценивали согласно методу, описанному в примере 6.1, после культивирования клеток в присутствии содержащих 4-1BBL молекул в указанных концентрациях или без них в течение 6 ч. Закрашенными окружностями обозначена конструкция 1.1. Незакрашенными окружностями обозначена "ненацеленная" антигенсвязывающая молекула на основе DP47, содержащая лиганд для 4-1BB в слиянии Fc(kih) (контроль А). Клеточную линию NIH/3T3-человеческий FAP, клон 39 применяли в качестве клеток-мишеней на графике (А), на графике (Б) показана активация при использовании в качестве клеток-мишеней клеток линии MV3, а на графике (В) - при использовании в качестве клеток-мишеней клеток линии WM-266-4. Для характеристики активности строили график зависимости единиц испускаемого света (URL), измеренных в течение 0,5 с, от концентрации в нМ тестируемых содержащих разделенный тримерный 4-1BBL конструкций. Испускание URL происходит в результате опосредуемого люциферазой окисления люциферина с образованием оксильюциферина;

на фиг. 17 - данные об активации индуцируемой NFκB экспрессии люциферазы и активности, для измерения которых использовали анализ, описанных в примере 6.1. Количество испускаемого света в секунду (CPS) измеряли в течение 0,5 с/лунку и строили график зависимости от применяемой концентрации нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций. Экспрессирующие человеческий 4-1BB репортерные клетки HeLa инкубировали в течение 6 ч в отсутствии (фиг. 17А) или в присутствии экспрессирующих перекрестносшитый человеческий FAP клеток человеческой меланомы линии MV-3 (фиг. 17Б) или WM-266-4 (фиг. 17В). Измеряли CPS и строили график зависимости от концентраций различных нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций. Соотношение клеток составляло: одна экспрессирующая человеческий 4-1BB репортерная клетка HeLa на пять опухолевых клеток. Для лучшей формы представления кривые активации разделяли на четыре различные группы графиков, при этом кривые для конструкции 1.1 (одновалентная нацеленная на FAP содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih)) и контрольной молекулы Б (одновалентная "ненацеленная" содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) с CH-CL-кроссовером и заряженными остатками) применяли в качестве кривых сравнения. На фиг. 17А представлены данные об активации в отсутствии экспрессирующих перекрестносшитый FAP опухолевых клеток, на фиг. 17Б представлены данные об активации в присутствии экспрессирующих перекрестносшитый FAP опухолевых клеток MV-3, а на фиг. 17В представлены данные об активации в присутствии экспрессирующих перекрестносшитый FAP опухолевых клеток WM-266-4;

на фиг. 18 - данные об активации индуцируемой NFκB экспрессии люциферазы и активности, полученные для конструкций, описанных в примере 2. Единицы испускаемого света (URL) оценивали в течение 0,5 с/лунку и строили график зависимости от применяемой концентрации нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций. Экспрессирующие человеческий 4-1BB репортерные клетки HeLa инкубировали в течение 6 ч в отсутствии или в присутствии экспрессирующих перекрестносшитый человеческий FAP клеток человеческой меланомы линии MV-3 или WM-266-4. URL оценивали и строили график зависимости от концентраций различных нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 и 2.6 и контрольных конструкций Б, В, Д и Е. Соотношение клеток составляло: одна экспрессирующая человеческий 4-1BB репортерная клетка HeLa на пять опухолевых клеток. Для лучшей формы представления кривые активации разделяли на две различные группы графиков, в каждой из которых (для сравнения) использовали кривую для конструкции 2.1 (одновалентная нацеленная на FAP содержащая тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih));

на фиг. 19 - схема анализа активации репортерной линии клеток T293-НЕК, экспрессирующих 4-1BB обезьян циномолгус. Перекрестносшитый 4-1BB обезьян циномолгус, экспрессируемый на репортерных клетках, индуцирует активацию NFκB и опосредуемую NFκB экспрессию люциферазы. После лизиса клеток люцифераза может катализировать окисление люциферина с образованием оксилуциферина. Для этой химической реакции характерна положительная корреляция с уровнем опосредуемой NFκB экспрессии люциферазы, и его можно измерять по уровню испускаемого света (в единицах испускаемого света);

на фиг. 20 - данные об индуцированной активацией NFκB экспрессии люциферазы и активности. Уровень испускаемого света (в единицах URL) измеряли в течение 0,5 с/лунку и строили график зависимости от применяемой концентрации нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций. Репортерные клетки T293-НЕК, экспрессирующие 4-1BB обезьян циномолгус, инкубировали в течение 6 ч в отсутствии или в присутствии экспрессирующих перекрестносшитый человеческий FAP клеток человеческой меланомы линии MV-3 или WM-266-4. URL оценивали и строили график зависимости от концентраций различных нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций. Соотношение клеток составляло: одна экспрессирующая 4-1BB репортерная клетка T293-НЕК на пять клеток MV-3 или две клетки WM-266-4. Для лучшей формы представления кривые активации разделяли на две различные группы графиков, в каждой из которых в качестве кривой сравнения использовали кривую для конструкции 2.1;

на фиг. 21 - схема, иллюстрирующая принцип анализа Т-клеточной активации, описанного в примере 6.3. Представлена схема осуществления анализа активации с использованием HLA-A2-NLV-специфических CD8-Т-клеток и подвергнутых импульсной обработке NLV клеточной линии HLA-A2+ FAP+ человеческой меланомы MV-3 в присутствии различных определенных титрованием концентраций нацеленных на FAP или "ненацеленных" конструкций, содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih). Клетки инкубировали в течение 28 ч, последние 4 ч в присутствии содержащего мoneзин реагента Golgi-Stop. Соотношение NLV-специфических CD8-Т-клеток и опухолевых клеток MV-3 составляло 1:8;

на фиг. 22А-Д и 23А-Д - результаты анализа активации, в которых использовали HLA-A2-NLV-

специфические CD8-T-клетки и подвергнутую импульсной обработке NLV клеточную линию HLA-A2+ FAP+ человеческой меланомы MV-3 в присутствии различных определенных титрованием концентраций нацеленных на FAP или "ненацеленных" конструкций, содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih), полученных в примере 1. Для лучшей формы представления кривые экспрессии разделяли на несколько различных групп графиков, в которых в качестве кривых сравнения применяли кривые, полученные для конструкции 1.1 (одновалентная нацеленная на FAP содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih)) и контрольной молекулы Б (одновалентная "ненацеленная" содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih)). Результаты получали в четырех независимых аналогичных экспериментах и установлено, что пролонгированная секреция IFN γ и экспрессия CD137 NLV-специфическими CD8⁺-T-клетками прямо зависели от одновременной активации T-клеток посредством распознавания комплексов NLV-HLA-A2 (сигнал 1) и стимуляции 4-1BB с помощью нацеленного на FAP человеческого разделенного 4-1BBL (сигнал 2). Данные о роли повышающей регуляции 4-1BB представлены на графиках на фиг. 22, в то время как данные о воздействии на экспрессию IFN γ CD8⁺-T-клетками представлены на графиках на фиг. 23. В каждом случае приведены данные о частоте встречаемости (в процентах) позитивных клеток в общей популяции CD8⁺-T-клеток. Все нацеленные на FAP варианты индуцировали сходное повышение активации активированных NLV-пептидом CD8-T-клеток, что представлено на фиг. 22 в виде повышающей регуляции 4-1BB (петля положительной обратной связи), и на фиг. 23 в виде экспрессии IFN γ после 24-часовой стимуляции. Различия между кривыми находились в пределах ошибки стандартного отклонения и не являлись значимыми;

на фиг. 24 и 25 - результаты анализа активации, в котором использовали HLA-A2-NLV-специфические CD8-T-клетки и подвергнутую импульсной обработке NLV клеточную линию HLA-A2+ FAP+ человеческой меланомы MV-3 в присутствии различных полученных титрованием концентраций нацеленных на FAP или "ненацеленных" конструкций, полученных в примере 2, которые содержали разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih). Для лучшей формы представления кривые экспрессии разделяли на две различные группы графиков, в которых в качестве кривых сравнения применяли кривые, полученные для конструкции 2.1 (одновалентная нацеленная на FAP содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih)) и контрольной молекулы Б (одновалентная "ненацеленная" содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih)) и для контроля Б. Установлено, что все нацеленные на FAP содержащие разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкции характеризовались сходным повышением активации специфических для NLV-пептида CD8-T-клеток, что представлено на фиг. 24 в виде повышающей регуляции 4-1BB (петля положительной обратной связи), и на фиг. 25 в виде экспрессии IFN γ после 24-часовой стимуляции. Различия между кривыми находились в пределах ошибки стандартного отклонения и не являлись значимыми;

на фиг. 26 - схема, иллюстрирующая эксперимент, описанный в примере 6.4;

на фиг. 27 - данные о индукции пролиферации CD8⁺-T-клеток. Представлены данные о частоте встречаемости (уровне) пролиферирующих CD8⁺-T-клеток в зависимости от концентрации тестируемых конструкций;

на фиг. 28А - результаты ФК-эксперимента с использованием одной дозы конструкции 1.2 и контроля Б, проведенного на здоровых NOG-мышях. Продемонстрировано снижение концентрации конструкций в течение времени. На 28Б - результаты ФК-эксперимента с использованием одной дозы конструкций 2.1, 2.3, контроля Б и контроля В, проведенного на несущих опухоли NOG-мышях, гуманизированных с помощью стволовых клеток. На фиг. 28В - результаты ФК-эксперимента с использованием одной дозы конструкции 2.1 и 2.3, проведенного на здоровых NOG-мышях;

на фиг. 29 - компоненты для сборки разделенных тримерных лигандов для человеческого 4-1BB. На фиг. 29А - димерный лиганд, слитый на С-конце с человеческим CL-доменом с мутациями E123R и Q124K (заряженные остатки), на фиг. 29Б - мономерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CH1-доменом с мутациями K147E и K213E (заряженные остатки). Представлены компоненты для сборки двухвалентной нацеленной на CD19 антигенсвязывающей молекулы, содержащей разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) (конструкция 3.3). На фиг. 29В показан димерный лиганд, слитый с С-концом цепи Fc человеческого IgG1 с "впадиной". На фиг. 29Г показан мономерный лиганд, слитый с С-концом цепи Fc человеческого IgG1 с "выступом";

на фиг. 30 - конструкции 3.1-3.6 нацеленных на CD19 содержащих тримерный 4-1BBL антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении. Предварительная подготовка и получение этих конструкций описано в примере 3. VH- и VL-домены представляют собой домены антитела к CD19 8B8-018, жирной черной точкой обозначена модификация типа "knob-into-hole". Символом * обозначены аминокислотные модификации в CH1- и CL-доменах (так называемые заряженные остатки);

на фиг. 31А - иллюстрация стратегии рандомизации CDR-участков родительского клона 8B8. Показаны вариабельные домены родительского клона 8B8 и CDR-участки (выделенные прямоугольником) согласно нумерации Кэбота. (X) обозначает рандомизированные положения. На фиг. 31Б - схематическое

описание стратегии создания библиотеки. Показаны стратегии ПЦР-амплификации и клонирования, применяемые для создания библиотеки на основе 8B8 с А) рандомизированными CDR1- и CDR2-участками в легкой и тяжелой цепи или Б) рандомизированными CDR1- и CDR3-участками легкой цепи и CDR3-участком тяжелой цепи. Указаны соответствующие ферменты, применяемые для клонирования в фагмиде;

на фиг. 32 - результаты сравнительного анализа первичной структуры последовательности родительского клона 8B8 антитела к CD19 с отобранными связывающими агентами с созревшей аффинностью. Показаны все последовательности клона 8B8 и всех отобранных связывающих агентов с созревшей аффинностью. CDR и тяжелых, и легких цепей обозначены рамкой;

на фиг. 33 - результаты SPR-анализа родительского клона 8B8 и его вариантов с созревшей аффинностью. Показаны сенсограммы, полученные для клона 8B8 и его производных с созревшей аффинностью, в которых отсутствуют "горячие" точки N27d и N28 в LCDR1;

на фиг. 34 - иллюстрация схемы анализа измерения одновременного связывания нацеленной на CD19 содержащей тримерный разделенный 4-1BBL конструкции с hu4-1BB и huCD19 (пример 8.2);

на фиг. 35 - графики, описывающие одновременное связывание нацеленных на CD19 содержащих тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул (конструкции 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 и 4.4) (аналит 1) с иммобилизованным человеческим 4-1BB и человеческим CD19 (аналит 2);

на фиг. 36 - результаты анализа связывания различных нацеленных на CD19 или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций с экспрессирующими 4-1BB CD4- и CD8-Т-клетками из предварительно активированных РНА-Л и пролейкином и повторно реактивированных антителом к человеческому CD3/к человеческому CD28 человеческих РВМС. Связывание обнаруживали с помощью конъюгированного с флуорохромом, таким как R-фикоэритрин, F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического. Показана зависимость медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации тестируемых конструкций. Для лучшей формы представления кривые связывания разделяли на две различные группы графиков, при этом кривые для конструкции 3.4 и контроля Е (контроль изотипа huIgG1 P329G LALA) применяли в качестве кривых сравнения. Оценивали связывание на CD45⁺CD3⁺CD8⁺-Т-клетках (фиг. 36А) и CD45⁺CD3⁺CD4⁺-Т-клетках (фиг. 36Б). Уровень экспрессии 4-1BB на CD8-Т-клетках в норме выше, чем на CD4-Т-клетках. Все конструкции связывались с человеческим 4-1BB практически со сходной аффинностью;

на фиг. 37 - результаты анализа связывания различных нацеленных на CD19 или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) антигенсвязывающих молекул с экспрессирующими человеческий CD 19 клеточными линиями В-клеточной лимфомы, такими как диффузная крупноклеточная неходжкинская В-клеточная лимфома SU-DHL-8 (37А), острый лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников В-лимфоцитов Nalm6 (37Б), диффузная крупноклеточная лимфобластная лимфома Toledo (37В) и диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома OCI-Ly18 (37Г). Связывание обнаруживали с помощью конъюгированного с флуорохромом, таким как R-фикоэритрин, F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического. Показана зависимость медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации тестируемых конструкций. Для лучшей формы представления кривые связывания разделяли на три различные группы графиков, при этом кривые для конструкции 3.4 и контроля Е (контроль изотипа huIgG1 P329G LALA) применяли в качестве кривых сравнения. Все конструкции связывались с человеческим CD19 практически со сходной аффинностью;

на фиг. 38 - данные об индуцированной активацией NFκВ экспрессии люциферазы и активности нацеленных на CD19 или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) антигенсвязывающих молекул. Уровень испускаемого света (в единицах URL) измеряли в течение 0,5 с/лунку и строили график зависимости от применяемой концентрации нацеленных на CD19 или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций 3.1 и 3.3 и контрольных молекул Б и В. Экспрессирующие человеческий 4-1BB репортерные клетки HeLa инкубировали в течение 7,5 ч в присутствии экспрессирующих перекрестноцитный человеческий CD19 клеток SU-DHL-8 или клеток Пфайфера или без них. Измеряли URL и строили график зависимости от концентраций различных нацеленных на CD19 или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций. Соотношение клеток составляло: одна экспрессирующая 4-1BB репортерная клетка Т293-НЕК на 2,5 или 5 опухолевых клеток;

на фиг. 39 - данные о связывании различных гуманизированных вариантов Т84.66 IgG на экспрессирующих СЕА клетках человеческой аденокарциномы желудка. На основе полученных данных был отобран гуманизированный вариант 1 для включения в нацеленные на СЕА содержащие тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) антигенсвязывающие молекулы;

на фиг. 40 - конструкции 5.1-5.6 нацеленных на СЕА содержащих тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении. Предварительная подготовка и получения указанных конструкций описано в примере 11. VH- и VL-домены представляют собой

домена антитела к CEA T84.66-LCHN, жирной черной точкой обозначена модификация типа "knob-into-hole". Символом * обозначены аминокислотные модификации в CH1- и CL-доменах (так называемые заряженные остатки);

на фиг. 41А - схематическое изображение человеческого антигена NA3В3А2-avi His, применяемого для оценки связывания нацеленных на CEA, содержащих тримерный разделенный 4-1ВВL-Fc (kih) антигенсвязывающих молекул. На фиг. 41Б - схематическое изображение схемы анализа измерения одновременного связывания нацеленной на CEA содержащей тримерный разделенный 4-1ВВL конструкции с hu4-1ВВ и человеческим NA3В3А2 (пример 12.1);

на фиг. 42 - графики, на которых продемонстрировано одновременное связывание нацеленных на CEA содержащих тримерный 4-1ВВL в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул (конструкции 5.4, 5.6, 5.7 и 5.8 (аналит 1) с иммобилизованными человеческим 4-1ВВ и человеческим NA3В3А2 (аналит 2);

на фиг. 43 - результаты анализа связывания различных нацеленных на CEA или ненацеленных содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1ВВL-Fc (kih) конструкций с экспрессирующими 4-1ВВ CD4- и CD8-Т-клетками из предварительно активированных РНА-L и пролейкином и повторно реактивированных антителом к человеческому CD3/к человеческому CD28 человеческих РВМС. Связывание обнаруживали с помощью конъюгированного с флуорохромом, таким как R-фикоэритрин, F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcy-специфического. Показана зависимость медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации тестируемых конструкций. Для лучшей формы представления кривые связывания разделяли на две различные группы графиков, при этом кривые для конструкции 5.4 и контроля Е (контроль изотипа huIgG1 P329G LALA) применяли в качестве кривых сравнения. Оценивали связывание на CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺-Т-клетках (нижняя группа графиков) и CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺-Т-клетках (верхняя группа графиков). Уровень экспрессии 4-1ВВ на CD8-Т-клетках в норме выше, чем на CD4-Т-клетках. Все конструкции связывались с человеческим 4-1ВВ практически со сходной аффинностью;

на фиг. 44 - результаты анализа связывания нацеленных на CEA или ненацеленных содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1ВВL-Fc (kih) конструкций с экспрессирующей человеческий CEA линией клеток рака желудка человека MKN-45 (слева) и линией клеток колоректальной аденокарциномы человека LS180 (справа). Связывание обнаруживали с помощью конъюгированного с флуорохромом, таким как R-фикоэритрин, F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcy-специфического. Показана зависимость медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации тестируемых конструкций;

на фиг. 45 - данные об индуцированной активацией NFκB экспрессии люциферазы и активности нацеленных на CEA или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1ВВL-Fc (kih) антигенсвязывающих молекул. Уровень испускаемого света (в единицах URL) измеряли в течение 0,5 с/лунку и строили график зависимости от применяемой концентрации нацеленных на CEA или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1ВВL-Fc (kih) конструкций 5.4, 5.6, 5.7 и 5.3 и контрольных молекул. Экспрессирующие человеческий 4-1ВВ репортерные клетки HeLa инкубировали в течение 6 ч в присутствии экспрессирующих перекрестношитый человеческий CEA клеток рака желудка человека MKN-45. Соотношение клеток составляло: одна экспрессирующая 4-1ВВ репортерная клетка T293-НЕК на три опухолевые клетки;

на фиг. 46А и 46Б - компоненты для сборки одновалентной нацеленной на FAP конструкции, содержащей разделенный тримерный человеческий лиганд для OX40 (конструкция 6.1). На фиг. 46А показан димерный лиганд, слитый с CL-доменом человеческого IgG1, на фиг. 46Б - мономерный лиганд, слитый с CH1-доменом человеческого IgG1. На фиг. 46В - нацеленная на FAP содержащая тримерный OX40L антигенсвязывающая молекула (конструкция 6.1). На фиг. 46Г - "ненацеленная" конструкция на основе DP47 человеческого IgG1 PGLALA (контроль Е);

на фиг. 47А - результаты анализа связывания нацеленной на FAP содержащей тримерный человеческий OX40L конструкции с FAP-позитивными клетками WM-266-4. WM-266-4-клетки экспрессируют высокие уровни человеческого фибробласт-активирующего белка (huFAP). С клетками WM-266-4 связывались только нацеленные на FAP содержащие лиганд для OX40-Fc (kih) конструкции (закрашенные квадраты), но не контрольная конструкция 5 (закрашенные ромбы). Связывание представлено в виде медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) для меченного с помощью флуоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ) F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcy-специфического, применяемого в качестве вторичного идентифицирующего антитела. MFI измеряли с помощью проточной цитометрии. На оси х отложена концентрация конструкций антител. На фиг. 47Б - результаты анализа связывания нацеленной на FAP содержащей лиганд для OX40-Fc (kih) конструкции с негативными по человеческому FAP и негативными по человеческому OX40 клетками A549, меченными с помощью NucLight Red®. Установлено, что нацеленная на FAP содержащая лиганд для OX40-Fc (kih) конструкция не связывалась с OX40-негативными, FAP-негативными опухолевыми клетками A549. Связывание представлено в виде медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) для меченного с помощью ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcy-специфического, применяемого в качестве

вторичного идентифицирующего антитела. MFI измеряли с помощью проточной цитометрии и осуществляли коррекцию на фоновый уровень путем вычитания MFI для "пустого" контроля;

на фиг. 48А - результаты анализа связывания конструкции FAP-Ox40L с покоящимися и активированными человеческими CD4-Т-клетками. OX40 не экспрессируется на покоящихся человеческих CD4-Т-клетках (левая часть). В отсутствие экспрессирующих человеческий OX40 клеток связывание не обнаружено (графики слева). После активации человеческих PBMC имеет место повышающая регуляция OX40 на CD4⁺-Т-клетках (правая часть). Конструкция FAP-OX40L связывалась с OX40⁺-активированными CD4-Т-клетками. Связывание представлено в виде медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) для меченного с помощью ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического, применяемого в качестве вторичного идентифицирующего антитела. MFI измеряли с помощью проточной цитометрии и осуществляли коррекцию на фоновый уровень путем вычитания MFI для "пустого" контроля. На оси x отложена концентрация конструкций антител. На фиг. 48Б представлены данные, демонстрирующие, что OX40 не экспрессируется на покоящихся человеческих CD8-Т-клетках (левая часть). В отсутствие экспрессирующих человеческий OX40 клеток связывание не обнаружено (графики слева). После активации человеческих PBMC имеет место повышающая регуляция OX40 на CD8⁺-Т-клетках (правая часть). Экспрессия OX40 на человеческих CD8⁺-Т-клетках ниже, чем на CD4⁺-Т-клетках и варьируется в зависимости от донора и момента времени. Уровень экспрессии OX40 на представленных CD8-Т-клетках был низким. Конструкция FAP-OX40L связывалась с OX40⁺-активированными CD4-Т-клетками. Связывание представлено в виде медианных значений интенсивности флуоресценции (MFI) для меченного с помощью ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического, применяемого в качестве вторичного идентифицирующего антитела. MFI измеряли с помощью проточной цитометрии и осуществляли коррекцию на фоновый уровень путем вычитания MFI для "пустого" контроля. На оси x отложена концентрация конструкций антител;

на фиг. 49 - данные, демонстрирующие активацию пути передачи сигнала NFκB с помощью нацеленной на FAP содержащей разделенный тримерный человеческий OX40L антигенсвязывающей молекулы (FAP-OX40L) в репортерных клетках HeLa_hOx40_NFκB_Luc1. Представлены данные об активации с использованием перекрестной сшивки (правый график) или без нее (левый график) с применением вторичного антитела. Репортерные клетки культивировали в течение 5 ч в присутствии FAP-OX40L в указанных концентрациях с или без перекрестной сшивки с поликлональным вторичным антителом, F(ab)₂-фрагментом козьего IgG против huIgG1, Fcγ-специфическим, применяемым в соотношении 1:2. Люциферазную активность оценивали согласно методу, описанному в примере 6.1. Для характеристики активности использовали единицы испускания света (URL), измеренные в течение 0,5 с, в зависимости от концентрации в нМ тестируемой конструкции. Испускание URL происходило в результате опосредуемого люциферазой окисления люциферина с образованием оксилуциферина;

на фиг. 50А - данные об активации NFκB с помощью FAP-OX40L в репортерных клетках HeLa_hOx40_NFκB_Luc1 в присутствии FAP-позитивных клеток. Представлены данные об активации пути передачи сигнала NFκB в репортерных клетках с помощью FAP-OX40L в присутствии характеризующихся низким уровнем экспрессии человеческого FAP клеток NIH-3T3 (соотношение: 3 опухолевые FAP-клетки на 1 репортерную клетку). Опосредуемую NFκB люциферазную активность характеризовали с использованием единиц испускания света (URL), измеренных в течение 0,5 с, в зависимости от концентрации в нМ тестируемых соединений. Испускание URL происходило в результате опосредуемого люциферазой окисления люциферина с образованием оксилуциферина. Осуществляли коррекцию величин на фоновый уровень путем вычитания URL для "пустого" контроля. Для более эффективного сравнения определяли площадь под кривой для соответствующих представленных кривых дозовой зависимости в качестве маркера агонистической способности каждой конструкции. Результаты сравнения проиллюстрированы на фиг. 50Б. Площадь под кривой рассчитывали с помощью программы GraphPad Prism. Осуществляли коррекцию величин на фоновый уровень путем вычитания величины для "пустого" контроля;

на фиг. 51 - данные об опосредуемой OX40 костимуляции субоптимально стимулированных TCR покоящихся человеческих PBMC (пример 15.5). Перекрестная гиперсшивка FAP-Ox40L в результате присутствия клеток NIH/3T3-huFAP, клон 39 значительно повышала выживаемость и пролиферацию человеческих CD4- и CD8-Т-клеток. Представлены данные о количестве случаев присутствия живых CD4⁺- (слева) и CD8⁺- (справа) Т-клеток. Вычитали фоновые значения, полученные для образцов, содержащих только антитело к человеческому CD3 (клон V9, huIgG1), покоящиеся человеческие PBMC и клетки NIH/3T3-huFAP клон 39. Таким образом, продемонстрировано усиливающее действие костимуляции OX40, но отсутствие воздействия самой субоптимальной стимуляции антителом к CD3. На графиках внизу (озаглавленных "пролиферация" представлены данные о поддержании субоптимальной стимуляции TCR покоящихся человеческих PBMC при использовании иммобилизованной на клеточной поверхности конструкции FAP-OX40L.

Подробное описание изобретения

Определения.

Если не указано иное, то технические и научные понятия, применяемые в описании, имеют значе-

ния, которые обычно используют в области техники, к которой относится изобретение. Для целей интерпретации настоящей заявки следует применять приведенные ниже определения, и если это возможно, то понятия, применяемые в единственном числе, включают также их применение во множественном числе и наоборот.

В контексте настоящего описания понятие "антигенсвязывающая молекула" в наиболее широком смысле относится к молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. Примерами антигенсвязывающих молекул являются антитела, фрагменты антител и антигенсвязывающие белки-каркасы ("скаффолд-белки").

В контексте настоящего описания понятие "фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени" относится к полипептидной молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. В одном из объектов изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью активировать передачу сигнала через антиген его клетки-мишени. В конкретном объекте изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью направлять субстанцию, с которой он связан (например, тримерный лиганд семейства TNF), к сайту-мишени, например к определенному типу опухолевых клеток или стромы опухоли, несущих антигенную детерминанту. Фрагменты, обладающие способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, включают антитела и их фрагменты, более подробно представленные в настоящем описании. Кроме того, фрагменты, обладающие способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, включают антигенсвязывающие белки-каркасы, более подробно представленные в настоящем описании, например, связывающие домены, основой которых являются созданные повторы белков или созданные повторы доменов (см., например, WO 2002/020565).

Касательно антитела или его фрагмента понятие "участок, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени" относится к части молекулы, которая содержит область, специфически связывающуюся и комплементарную части антигена или всему антигену. Фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, может представлять собой, например, один или несколько переменных доменов антитела (которые называют также переменными областями антитела). В частности, фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, содержит переменную область легкой цепи антитела (VL) и переменную область тяжелой цепи антитела (VH).

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используется в его наиболее широком смысле, и оно относится к различным структурам антител, включая (но, не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела, моноспецифические и мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью.

Понятие "моноклональное антитело" в контексте настоящего описания относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, идентичны и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например содержащих мутации, встречающиеся в естественных условиях или возникающие в процессе производства препарата моноклонального антитела, указанные варианты, как правило, присутствуют в минорных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела к различным детерминантам (эпитопам), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты на антигене.

В контексте описания понятие "моноспецифическое" антитело означает антитело, которое имеет один или несколько сайтов связывания, каждый из которых связывается с одним и тем же эпитопом одного и того же антигена. Понятие "биспецифическая" означает, что антигенсвязывающая молекула обладает способностью специфически связываться по меньшей мере с двумя различными антигенными детерминантами. Как правило, биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит два антигенсвязывающих сайта, каждый из которых является специфическим в отношении различных антигенных детерминант. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает способностью одновременно связываться с двумя антигенными детерминантами, прежде всего с двумя антигенными детерминантами, экспрессируемыми на двух различных клетках.

В контексте настоящего описания понятие "валентность" означает наличие определенного количества сайтов связывания в антигенсвязывающей молекуле. Так, понятия "двухвалентная", "четырёхвалентная" и "шестивалентная" означает присутствие двух сайтов связывания, четырех сайтов связывания и шести сайтов связывания соответственно в антигенсвязывающей молекуле.

Понятия "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "целое антитело" в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, практически сходную с нативной структурой антитела. Понятие "нативные антитела" относится к встречающимся в естественных условиях молекулам иммуноглобулинов с различными структурами. Например, нативные антитела IgG-класса представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. Начиная с N-конца к С-концу, каждая тяжелая цепь имеет

вариабельную область (VH), которую называют также вариабельным тяжелым доменом или вариабельным доменом тяжелой цепи, за которой следует три константных домена (CH1, CH2 и CH3), которые называют также константной областью тяжелой цепи. Аналогично этому, начиная с N-конца к С-концу, каждая легкая цепь имеет вариабельную область (VL), которую называют также вариабельным легким доменом или вариабельным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL), который называют также константной областью легкой цепи. Тяжелая цепь антитела может относиться к одному из пяти типов, которые обозначают как α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) или μ (IgM), некоторые из которых можно дополнительно подразделять на подтипы, например $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3), $\gamma 4$ (IgG4), $\alpha 1$ (IgA1) и $\alpha 2$ (IgA2). Легкая цепь антитела может принадлежать к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), в зависимости от аминокислотной последовательности ее константного домена.

Понятие "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, обладающую способностью связываться с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, димерные антитела (диабоды), тримерные антитела (триабоды), тетрамерные антитела (тетрабоды), кросс-Fab-фрагменты; линейные антитела: одноцепочечные молекулы антител (например, scFv); и однодоменные антитела. Обзор некоторых фрагментов антител см., например, у Hudson и др., *Nat. Med.* 9, 2003, с. 129-134. Обзор scFv-фрагментов см., например, у Plückthun в: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, т. 113, под ред. Rosenburg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1994, с. 269-315; см. также WO 93/16185; и US № 5571894 и 5587458. Обсуждение Fab- и F(ab')₂-фрагментов, содержащих остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладающих удлинненным временем полужизни *in vivo*, см. в US № 5869046. Димерные антитела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими (см., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson и др., *Nat. Med.* 9, 2003, с. 129-134; и Hollinger и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, с. 6444-6448. Тримерные и тетрамерные антитела описаны также у Hudson и др., *Nat. Med.* 9, 2003, с. 129-134. Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь вариабельный домен тяжелой цепи или его часть или весь вариабельный домен легкой цепи антитела или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (фирма Domantis, Inc., Валтам, шт. Массачусетс; см., например US № 6248516 B1). Фрагменты антител можно создавать с помощью различных методик, включая (но, не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получать с использованием рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фага), как указано в настоящем описании.

Расщепление интактных антител папином приводит к образованию двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, которые называют "Fab"-фрагментами, каждый из которых содержит вариабельные домены тяжелой и легкой цепей, а также константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. В контексте настоящего описания понятие "Fab-фрагмент" относится к фрагменту антитела, содержащему фрагмент легкой цепи, который содержит VL-домен и константный домен легкой цепи (CL), и VH-домен и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксильный конец CH1-домена тяжелой цепи, включая один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела. Fab'-SH обозначает Fab'-фрагменты, в который остаток(тки) цистеина константных доменов несет(ут) тиольные группы. Обработка пепсином позволяет получать F(ab')₂-фрагменты, которые имеют два антигенсвязывающих сайта (два Fab-фрагмента) и часть Fc-области.

Понятие "Кросс-Fab-фрагмент" или "xFab-фрагмент" или "кроссовер-Fab-фрагмент" относится к Fab-фрагменту, в котором либо вариабельные области, либо константные области тяжелой и легкой цепи обменены. Возможны две различные композиции цепи кроссовер-молекулы Fab, и они могут входить в биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении: с одной стороны, имеет место обмен вариабельными областями тяжелой и легкой цепи Fab, т.е. кроссовер-молекула Fab содержит пептидную цепь, состоящую из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области тяжелой цепи (CH1), и пептидную цепь, состоящую из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области легкой цепи (CL). Указанную кроссовер-молекулу Fab обозначают также как CrossFab_(VLVH). С другой стороны, когда друг на друга обменены константные области тяжелой и легкой цепи Fab, то кроссовер-молекула Fab содержит пептидную цепь, состоящую из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области легкой цепи (CL), и пептидную цепь, состоящую из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области тяжелой цепи (CH1). Указанную кроссовер-молекулу Fab обозначают также как CrossFab_(CLCH1).

"Одноцепочечный Fab-фрагмент" или "scFab" представляет собой полипептид, состоящий из вариабельного домена тяжелой цепи (VH) антитела, константного домена 1 (CH1) антитела, вариабельного домена легкой цепи (VL) антитела, константного домена легкой цепи (CL) антитела и линкера, в котором указанные домены антитела и указанный линкер имеют один из следующих порядков расположения в

направлении от N-конца к C-концу: а) VH-CH1-линкер-VL-CL, б) VL-CL-линкер-VH-CH1, в) VH-CL-линкер-VL-CH1 или г) VL-CH1-линкер-VH-CL; и в котором указанный линкер представляет собой полипептид, состоящий по меньшей мере из 30 аминокислот, предпочтительно примерно от 32 до 50 аминокислот. Указанные одноцепочечные Fab-фрагменты стабилизируют с помощью встречающейся в естественных условиях дисульфидной связи между CL-доменом и CH1-доменом. Кроме того, указанные одноцепочечные молекулы Fab можно дополнительно стабилизировать посредством создания межцепочечных дисульфидных связей путем встраивания остатков цистеина (например, в положение 44 в вариабельной тяжелой цепи и в положение 100 в вариабельной легкой цепи согласно нумерации Кэбота).

"Одноцепочечный кроссовер-Fab-фрагмент" или "х-scFab" представляет собой полипептид, состоящий из вариабельного домена тяжелой цепи (VH) антитела, константного домена 1 (CH1) антитела, вариабельного домена легкой цепи (VL) антитела, константного домена легкой цепи (CL) антитела и линкера, в котором указанные домены антитела и указанный линкер имеют один из следующих порядков расположения в направлении от N-конца к C-концу: а) VH-CL-линкер-VL-CH1 и б) VL-CH1-линкер-VH-CL; где VH и VL вместе образуют антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с антигеном, и в котором указанный линкер представляет собой полипептид, состоящий по меньшей мере из 30 аминокислот. Кроме того, указанные молекулы х-scFab можно дополнительно стабилизировать посредством создания межцепочечных дисульфидных связей путем встраивания остатков цистеина (например, в положение 44 в вариабельной тяжелой цепи и в положение 100 в вариабельной легкой цепи согласно нумерации Кэбота).

"Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv)" представляет собой слитый белок вариабельных областей тяжелой (V_H) и легких (V_L) цепей антитела, соединенных коротким линкерным пептидом, который содержит от 10 до примерно 25 аминокислот. Линкер, как правило, представляет собой богатый глицином линкер для придания гибкости, а также богатый серином или треонином для обеспечения растворимости, и он может соединять либо N-конец V_H с C-концом V_L, либо наоборот. Указанный белок сохраняет специфичность исходного антитела, несмотря на удаление константных областей и интродукцию линкера. Антитела в виде scFv описаны, например, у Houston J.S., *Methods in Enzymol.*, 203, 1991, сс. 46-96). Кроме того, фрагменты антител содержат одноцепочечные полипептиды, которые имеют характеристики VH-домена, а именно, обладают способностью к сборке с VL-доменом, или характеристики VL, а именно, обладают способностью к сборке с VH-доменом с образованием антигенсвязывающего сайта, и тем самым обладают антигенсвязывающим свойством полноразмерных антител.

"Антигенсвязывающие белки-каркасы (скаффолд-белки)" известны в данной области, например, фибронектин и созданные содержащие анкириновые повторы белки (DARPin), применяли в качестве альтернативных каркасов для антигенсвязывающих доменов (см. Gebauer и Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody Therapeutics. Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13, 2009, сс. 245-255 и Stumpp и др., *Darpins: A new generation of protein Therapeutics. Drug Discov. Today* 13, 2008, сс. 695-701). В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий белок-каркас выбран из группы, включающей CTLA-4 (эвибоди (Evibody)), липокаины (антикалин (Anticalin)), полученную из белка А молекулу, такую как Z-домен белка А (Affibody, SpA), А-домен (авимер/максибоди (Avimer/Maxibody)), сывороточный трансферрин (транс-боди), белок, содержащий анкириновые повторы (DARPin), вариабельный домен легкой цепи или тяжелой цепи антитела (однодоменное антитело, sdAb), вариабельный домен тяжелой цепи антитела (нанободи, aVH), V_{NAR}-фрагменты, фибронектин (аднектин (AdNectin)), лектиновый домен С-типа (тетранектин), вариабельный домен нового антигенного рецептора β-лактамазы (V_{NAR}-фрагменты), человеческий γ-кристаллин или убиквитин (молекулы-аффилины (Affilin), домен Кунитц-типа человеческих ингибиторов протеаз, микрободи, такие как белки из семейства knottin (кноттины, ингибиторы цистеинового узла), пептидные аптамеры и фибронектин (аднектин).

CTLA-4 (ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4) относится к CD28-семейству рецепторов, которые главным образом экспрессируются на CD4⁺-Т-клетках. Его внеклеточный домен имеет укладку, напоминающую укладку вариабельного домена Ig. Петли, соответствующие CDR антител, можно заменять на гетерологичную последовательность для придания различных связывающих свойств. Молекулы CTLA-4, сконструированные таким образом, что они обладают различными связывающими специфичностями, известны также как эвибоди (например, US № 7166697B1). Дополнительные сведения см. в *Journal of Immunological Methods* 248 (1-2), 2001, сс. 31-45.

Липокаины относятся к семейству внеклеточных белков, которые транспортируют малые гидрофобные молекулы, такие как стероиды, билины, ретиноиды и липиды. Они имеют жесткую вторичную структуру в виде β-складки с рядом петель на открытом конце конической структуры, их можно создавать для связывания с различными антигенами-мишенями. Антикалины состоят из 160-180 аминокислот и их получают из липокаинов. Дополнительные сведения см. в *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 2000, сс. 337-350, в US № 7250297 B1 и US № 2007/0224633.

Аффибоди представляет собой каркас, полученный из белка А *Staphylococcus aureus*, который можно создавать для связывания с антигеном. Домен состоит из трехспирального пучка, содержащего примерно 58 аминокислот. Библиотеки были созданы путем рандомизации поверхностных остатков. Допол-

нительные сведения см. в Protein Eng. Des. Sel. 17, 2004, сс. 455-462 и EP 1641818 A1.

Авимеры представляют собой мультидоменные белки, полученные из А-домена семейства белков-каркасов. Нативные домены, состоящие примерно из 35 аминокислот, адаптируют определенную связанную дисульфидами структуру. Разнообразие создают путем "перестановки" встречающихся в естественных условиях вариаций, характерных для семейства А-доменов. Дополнительные сведения см. в Nature Biotechnology 23(12), 2005, сс. 1556-1561 и Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), июнь 2007, сс. 909-917.

Трансферрин представляет собой мономерный сывороточный транспортный гликопротеин. Трансферрины можно создавать для связывания с различными антигенами-мишенями путем встраивания пептидных последовательностей в приемлемую поверхностную петлю. Примеры сконструированных трансферриновых каркасов включают транс-боди. Дополнительные сведения см. в J. Biol. Chem. 274, 1999, сс. 24066-24073.

Сконструированные белки, содержащие анкириновые повторы (DARPin), получают из анкирина, который относится к семейству белков, опосредующих присоединение интегральных мембранных белков к цитоскелету. Один анкириновый повтор представляет собой состоящий из 33 остатков мотив, включающий две α -спирали и β -изгиб. Их можно создавать для связывания с различными антигенами-мишенями путем рандомизации остатков в первой α -спирали и β -изгибе каждого повтора. Их связывающую поверхность раздела можно увеличивать путем увеличения количества модулей (метод созревания аффинности). Дополнительные сведения см. в J. Mol. Biol. 332, 2003, сс. 489-503, PNAS 100(4), 2003, сс. 1700-1705 и J. Mol. Biol. 369, 2007, сс. 1015-1028, а также в US № 2004/0132028 A1.

Однодоменное антитело представляет собой фрагмент антитела, состоящий из единичного мономерного варибельного домена антитела. Впервые единичный домен был получен из варибельного домена тяжелой цепи антитела верблюдов (нанабоди или $V_{\text{H}}\text{H}$ -фрагменты). Кроме того, понятие однодоменное антитело включает авономный варибельный домен человеческой тяжелой цепи (aVH) или V_{NAR} -фрагменты, полученные из акул.

Фибронектин представляет собой каркас, который можно создавать для связывания антигена. Аднектины состоят из каркаса из встречающейся в естественных условиях аминокислотной последовательности 10-го домена из 15 повторяющихся единиц человеческого фибронектина типа III (FN3). Можно создавать три петли на одном конце "β-сэндвича", что позволяет аднектину специфически распознавать представляющую интерес терапевтическую мишень. Дополнительные сведения см. в Protein Eng. Des. Sel. 18, 2005, сс. 435-444, US № 2008/0139791, WO 2005/056764 и US № 6818418 B1.

Пептидные аптамеры представляют собой комбинаторные распознающие молекулы, которые состоят из константного белка-каркаса, как правило, тиоредоксина (TrxA), который содержит ограниченную варибельную пептидную петлю, встроенную в активный сайт. Дополнительные сведения см. в Expert Opin. Biol. Ther. 5, 2005, сс. 783-797.

Микрободи получают из встречающихся в естественных условиях микробелков, состоящих из 25-50 аминокислот, которые содержат 3-4 цистеиновых мостика - примеры микробелков включают KalataBI и конотоксин и кноттины. Микробелки имеют петлю, которую можно подвергать инженерии таким образом, чтобы она включала вплоть до 25 аминокислот, без воздействия на общую укладку микробелка. Дополнительные сведения о создании кноттин-доменов см. в WO 2008/098796.

Понятие "антигенсвязывающая молекула, которая связывается с таким же эпитопом", что и референс-молекула, относится к антигенсвязывающей молекуле, которая блокирует связывание референс-молекулы с ее антигеном на 50% или более при оценке в условиях конкуренции, и, наоборот, референс-молекула блокирует связывание антигенсвязывающей молекулы с ее антигеном на 50% или более при оценке в условиях конкуренции.

Понятие "антигенсвязывающий домен" относится к части антигенсвязывающей молекулы, которая содержит область, специфически связывающуюся и являющуюся комплементарной части антигена или полному антигену. Если антиген является крупным, то антигенсвязывающая молекула может связываться только с конкретной частью антигена, которую называют эпитопом. Антигенсвязывающий домен может представлять собой, например, один или несколько варибельных доменов антитела (которые называют также варибельными областями). Предпочтительно антигенсвязывающий домен содержит варибельную область легкой цепи (VL) антитела и варибельную область тяжелой цепи антитела (VH).

В контексте настоящего описания понятие "антигенная детерминанта" является синонимом понятий "антиген" и "эпитоп" и относится к сайту (например, участку, состоящему из смежных аминокислот, или конформационной конфигурации, состоящей из различных областей несмежных аминокислот) на полипептидной макромолекуле, с которой связывается антигенсвязывающий фрагмент с образованием комплекса антигенсвязывающий фрагмент-антиген. Пригодные антигенные детерминанты могут присутствовать, например, на поверхности опухолевых клеток, на поверхности инфицированных вирусом клеток, на поверхности других больных клеток, на поверхности иммунных клеток, клеток, находящихся в свободном состоянии в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM). Белки, которые можно применять в качестве антигенов в настоящем изобретении, если не указано иное, могут представлять

собой любые нативные формы белков из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). В конкретном варианте осуществления изобретения антиген представляет собой человеческий белок. В контексте настоящего описания при ссылке на конкретный белок подразумевается "полноразмерный", непротессированный белок, а также любая форма белка, полученная в результате процессинга в клетке. Под понятие подпадают также встречающиеся в естественных условиях варианты белка, например сплайсинговые варианты или аллельные варианты.

Понятие "специфически связывается" означает, что связывание является избирательным в отношении антигена и его можно отличать от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Способность антигенсвязывающей молекулы связываться со специфическим антигеном можно определять с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или других методик, известных специалисту в данной области, например, с помощью методики на основе поверхностного плазмонного резонанса (осуществляя анализ с помощью устройства BIAcore) (Liljeblad и др., Glyco J. 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr. Res. 28, 2002, сс. 217-229). В одном из вариантов осуществления изобретения уровень связывания антигенсвязывающей молекулы с неродственным белком составляет менее чем примерно 10% от уровня связывания антигенсвязывающей молекулы с антигеном, при измерении, например, с помощью SPR. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула, которая связывается с антигеном, характеризуется величиной константы диссоциации (K_D), составляющей ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} до 10^{-13} М, например от 10^{-9} до 10^{-13} М).

Понятие "аффинность" или "аффинность связывания" относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между индивидуальным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена). Если не указано иное, то в контексте настоящего описания понятие "аффинность связывания" относится к присущей компонентам связывающейся пары (например, антителу и антигену) аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y можно, как правило, характеризовать с помощью константы диссоциации (K_D), которая представляет собой отношение констант скорости реакции диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} соответственно). Таким образом, эквивалентные аффинности могут соответствовать различным константам скорости, если соотношение констант скорости остается таким же. Аффинность можно оценивать общепринятыми методами, известными в данной области, включая представленные в настоящем описании методы. Конкретным методом измерения аффинности является метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В контексте настоящего описания понятие "антиген клетки-мишени" относится к антигенной детерминанте, присутствующей на поверхности клетки-мишени, например клетке в опухоли, такой как раковая клетка или клетка стромы опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген клетки-мишени представляет собой антиген на поверхности опухолей клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген клетки-мишени выбирают из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), карциноэмбриональный антиген (CEA), ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), CD19, CD20 и CD33. В частности, антиген клетки-мишени представляет собой фибробласт-активирующий белок (FAP).

Понятие "фибробласт-активирующий белок (FAP)", известный также как пролилэндопептидаза FAP или сепраза (КФ 3.4.21), если не указано иное, относится к любой нативной форме FAP из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди), приматы кроме человека (например, обезьяны циномогус (яванский макак-крабод) и грызуны (например, мыши и крысы). Понятие относится к полноразмерному непротессированному FAP, а также к любой форме FAP, полученной в результате процессинга в клетке. Под понятие подпадают также встречающиеся в естественных условиях варианты FAP, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, обладает способностью специфически связываться с FAP человека, мышей и/или обезьян циномогус. Аминокислотная последовательность человеческого FAP представлена в UniProt (www.uniprot.org), код доступа № Q12884 (версия 149, SEQ ID NO: 20) или в NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2. Внеклеточный домен (ECD) человеческого FAP простирается от аминокислотного положения 26 до 760. Аминокислотная и нуклеотидная последовательности меченного His человеческого FAP-ECD представлены в SEQ ID NO: 15 и 16 соответственно. Аминокислотная последовательность мышино FAP представлена в UniProt, код доступа № P97321 (версия 126, SEQ ID NO: 23) или NCBI RefSeq NP_032012.1. Внеклеточный домен (ECD) мышино FAP простирается от аминокислотного положения 26 до 761. В SEQ ID NO: 24 и 25 представлены аминокислотная и нуклеотидная последовательности меченного His мышино FAP-ECD соответственно. В SEQ ID NO: 26 и 27 представлены аминокислотная и нуклеотидная последовательности соответственно меченного FAP-ECD обезьян циномогус. Предпочтительно анти-FAP-связывающая молекула, предлагаемая в изобретении, связывается с внеклеточным доменом FAP. Примеры анти-FAP-связывающих молекул приведены в международной заявке на патент WO 2012/020006 A2.

Понятие "карциноэмбриональный антиген (CEA)", известный также как родственный молекуле клеточной адгезии 5 карциноэмбриональный антиген (CEACAM5), если не указано иное, относится к любой нативной форме CEA из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди), приматы кроме человека (например, обезьяны циномолгус) и грызуны (например, мыши и крысы). Аминокислотная последовательность человеческого CEA представлена в UniProt, код доступа № P06731 (версия 151, SEQ ID NO: 28). CEA ранее был идентифицирован в качестве ассоциированного с опухолью антигена (Gold и Freedman, *J Exp Med.*, 121, 1965, сс. 439-462; Berinstein N.L., *J. Clin. Oncol.*, 20, 2002, сс. 2197-2207). Хотя CEA первоначально был классифицирован в качестве белка, который экспрессируется только в эмбриональной ткани, в настоящее время CEA обнаружен в некоторых типах здоровых тканей взрослых особей. Эти ткани имеют в основном эпителиальное происхождение и включают клетки желудочно-кишечной, респираторной и мочеполовой систем, а также клетки ободочной кишки, шейки матки, потовых желез и предстательной железы (Nap и др., *Tumour Biol.*, 9(2-3), 1988, сс. 145-153; Nap и др., *Cancer Res.*, 52(8), 1992, сс. 2329-2339). В опухолях эпителиального происхождения, а также их метастазах CEA присутствует в качестве ассоциированного с опухолью антигена. Хотя присутствие CEA само по себе не свидетельствует о превращении в раковую клетку, распределение CEA является показательным. В здоровой ткани CEA, как правило, экспрессируется на апикальной поверхности клетки (Hammarstrom S., *Semin Cancer Biol.* 9(2), 1999, сс. 67-81), делая ее недоступной для антитела, присутствующего в кровотоке. В отличие от здоровой ткани в случае раковых клеток CEA имеет тенденцию к экспрессии по всей их поверхности (Hammarström S., *Semin Cancer Biol.* 9(2), 1999, сс. 67-81). Указанное изменение схемы экспрессии делает CEA доступным для связывания с антителом в раковых клетках. Помимо этого, в раковых клетках возрастает уровень экспрессии CEA. Кроме того, повышенный уровень экспрессии CEA стимулирует повышенную межклеточную адгезию, что может приводить к метастазам (Marshall J., *Semin Oncol.*, 30 (приложение 8), 2002, сс. 30-36). Преобладание экспрессии CEA в различных типах опухолей, как правило, является очень высоким. В соответствии с опубликованными данными анализ, проведенный авторами изобретения, который осуществляли в образцах тканей, подтвердил его высокое преобладание, при этом он обнаружен примерно в 95% образцов колоректальной карциномы (CRC), 90% образцов рака поджелудочной железы, 80% образцов рака желудка, 60% образцов немелкоклеточного рака легкого (NSCLC, где имела место совместная экспрессия с HER3) и 40% образцов рака молочной железы; низкий уровень экспрессии обнаружен при мелкоклеточном раке легкого и глиобластоме.

CEA легко отщепляется от клеточной поверхности и проникает в кровоток из опухолей либо непосредственно, либо через лимфатические сосуды. Благодаря этой особенности уровень CEA в сыворотке использовали в качестве клинического маркера для диагностики различных видов рака и скрининга в отношении рецидива различных видов рака, прежде всего колоректального рака (Goldenberg D.M., *The International Journal of Biological Markers*, 7, 1992, сс. 183-188; Chau I. и др., *J. Clin. Oncol.*, 22, 2004, сс. 1420-1429; Flamini и др., *Clin. Cancer Res.*, 12(23), 2006, сс. 6985-6988).

Понятие "ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), известный также как хондроитинсульфат-протеогликан 4 (CSPG4), если не указано иное, относится к любой нативной форме MCSP из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди), приматы кроме человека (например, обезьяны циномолгус) и грызуны (например, мыши и крысы). Аминокислотная последовательность человеческого MCSP представлена в UniProt, код доступа № Q6UVK1 (версия 103, SEQ ID NO: 29).

Понятие "рецептор эпидермального фактора роста (EGFR)" известный также как протоонкоген c-ErbB-1 или рецепторная тирозинпротеинкиназа erbB-1, относится, если не указано иное, к любой нативной форме EGFR из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди), приматы кроме человека (например, обезьяны циномолгус) и грызуны (например, мыши и крысы). Аминокислотная последовательность человеческого EGFR представлена в UniProt, код доступа № P00533 (версия 211, SEQ ID NO: 30).

Понятие "CD19" относится к антигену CD19 лимфоцитов, известному также как поверхностный антиген B4 В-лимфоцитов или антиген Т-клеточной поверхности Leu-12, и относится, если не указано иное, к любой нативной форме CD19 из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди), приматы кроме человека (например, обезьяны циномолгус) и грызуны (например, мыши и крысы). Аминокислотная последовательность человеческого CD19 представлена в UniProt, код доступа № P15391 (версия 160, SEQ ID NO: 31). Понятие относится к "полноразмерному" непротессированному CD19, а также любой форме человеческого CD19, полученной в результате процессинга в клетке, если антитело, указанное в настоящем описании, связывается с ним. CD19 представляет собой структурно определенный рецептор клеточной поверхности, экспрессируемый на поверхности человеческих В-клеток, включая (но не ограничиваясь только ими) пре-В-клетки, В-клетки на ранней стадии развития (т.е. незрелые В-клетки), зрелые В-клетки при терминальной дифференцировке в плазматические клетки и злокачественные В-клетки. CD19 экспрессируется в большинстве случаях при пре-В-клеточных острых лимфобластных лейкозах (ALL), неходжкинских лимфомах, В-клеточных хронических лимфоцитарных лейкозах (CLL), пролимфоцитарных лейкозах, воло-

сатоклеточных лейкозах, острых лимфоцитарных лейкозах общего типа и при некоторых острых лимфобластных лейкозах с нулевым фенотипом. Экспрессия CD19 на плазматических клетках позволяет предположить также, что он может экспрессироваться на дифференцированных В-клеточных опухолях, таких как множественная миелома. Таким образом, антиген CD19 является мишенью для иммунотерапии при лечении неходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза и/или острого лимфобластного лейкоза.

Понятие "CD20" относится к антигену В-лимфоцитов CD20, известному также как трансмембранный четырехдоменный представитель 1 подсемейства A (MS4A1), поверхностный антиген B1 В-лимфоцитов или антиген поверхности лейкоцитов Leu-16, и относится, если не указано иное, к любой нативной форме CD20 из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди), приматы кроме человека (например, обезьяны циномолгус) и грызуны (например, мыши и крысы). Аминокислотная последовательность человеческого CD20 представлена в UniProt, код доступа № P11836 (версия 149, SEQ ID NO: 32).

Понятие "CD33" относится к поверхностному антигену миелоидных клеток CD33, известному также как SIGLEC3 или gp67, и относится, если не указано иное, к любой нативной форме CD33 из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди), приматы кроме человека (например, обезьяны циномолгус) и грызуны (например, мыши и крысы). Аминокислотная последовательность человеческого CD33 представлена в UniProt, код доступа № P20138 (версия 157, SEQ ID NO: 33).

Понятие "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антигенсвязывающей молекулы с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., Kuby Immunology, 6-е изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена.

Понятие "гипервариабельный участок" или "HVR" в контексте настоящего описания относится к каждому из участков вариабельного домена антитела, последовательности которых являются гипервариабельными, и/или которые образуют структуры в виде петель ("гипервариабельные петли"). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR, как правило, содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из "определяющих комплементарность участков" (CDR), последние отличаются наиболее выраженной вариабельностью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. Приведенные в качестве примера гипервариабельные петли включают аминокислотные остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), и 96-101 (H3) (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917). Приведенные в качестве примера CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) включают аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35B (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Гипервариабельные участки (HVR) часто обозначают как "определяющие комплементарность участки" (CDR), и эти понятия в контексте настоящего описания используются взаимозаменяемо, и они относятся к участкам вариабельной области, которые образуют антигенсвязывающие области. Эта конкретная область описана у Kabat и др., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 1983 и у Chothia и др., J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917, причем эти определения относятся к перекрывающимся аминокислотным остаткам или поднаборам аминокислотных остатков при их сравнении друг с другом. Однако в контексте настоящего описания подразумевается возможность применения любого определения CDR антитела или его вариантов. Соответствующие аминокислотные остатки, из которых состоят CDR, как они определены в каждой из процитированных выше ссылок, представлены в сравнении ниже в табл. А. Точные номера остатков, которые образуют конкретный CDR, должны варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области на основе данных об аминокислотной последовательности вариабельной области антитела легко могут определять, какие остатки входят в конкретный CDR.

Таблица А. Определения CDR

	Кэбот	Хотиа	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-32
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹Нумерация всех входящих в CDR остатков в табл. А дана в соответствии с номенклатурой, предложенной Кэботом с соавторами (см. ниже).

Обозначение "AbM" с прописной буквой "b", использованное в табл. А, относится к CDR, как они

определены программой для моделирования антител "AbM" компании Oxford Molecular Group.

Кэбот с соавторами предложили также систему нумерации (номенклатуру) последовательностей переменных областей, которую можно применять для любого антитела. Обычный специалист в данной области может однозначно применять эту систему "нумерации по Кэботу" к любой последовательности переменной области, не имея никаких экспериментальных данных, кроме сведений о самой последовательности. В контексте настоящего описания понятие "нумерация по Кэботу" относится к системе нумерации, описанной у Kabat и др., "Sequence of Proteins of Immunological Interest", изд-во U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983. Если не указано иное, то ссылки на нумерацию положений конкретных аминокислотных остатков в переменной области антитела даны в соответствии с системой нумерации по Кэботу.

За исключением CDR1 в VH, CDR, как правило, содержат аминокислотные остатки, которые образуют гиперпеременные петли. CDR содержат также "определяющие специфичность остатки" или "SDR", которые представляют собой остатки, контактирующие с антигеном. SDR, содержащиеся в областях CDR, обозначают как укороченные -CDR или a-CDR. Приведенные в качестве примера a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 и a-CDR-H3) содержат аминокислотные остатки 31-34 (L1), 50-55 (L2), 89-96 (L3), 31-35B (H1), 50-58 (H2) и 95-102 (H3) (см. Almagro и Fransson, Front. Biosci. 13, 2008, ss. 1619-1633). Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в переменном домене (например, остатки FR) в настоящем описании нумеруют согласно Kabat и др., выше.

В контексте настоящего описания понятие "с созревшей аффинностью" касательно антигенсвязывающих молекул (например, антител) относится к антигенсвязывающей молекуле, полученной из антигенсвязывающей референс-молекулы, например, с помощью мутации, которая связывается с тем же антигеном, предпочтительно связывается с тем же эпитопом, что и референс-антитело; и обладает более высокой аффинностью к антигену, чем антигенсвязывающая референс-молекула. Созревание аффинности, как правило, включает модификацию одного или нескольких аминокислотных остатков в одном или нескольких CDR антигенсвязывающей молекулы. Как правило, антигенсвязывающая молекула с созревшей аффинностью связывается с тем же эпитопом, что и исходная антигенсвязывающая референс-молекула.

"Каркасные участки" или "FR" представляют собой участки переменных доменов, отличные от остатков гиперпеременных участков (HVR). FR переменного домена, как правило, представлены четырьмя FR-доменами: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, расположены в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Для целей настоящего описания "акцепторный человеческий каркасный участок" означает каркасный участок, содержащий аминокислотную последовательность каркасного участка переменного домена легкой цепи (VL) или каркасного участка переменного домена тяжелой цепи (VH), происходящий из каркасного участка человеческого иммуноглобулина или консенсусного человеческого каркасного участка, указанного ниже. Акцепторный человеческий каркасный участок "происходящий из" каркасного участка человеческого иммуноглобулина или консенсусного человеческого каркасного участка может содержать такую же аминокислотную последовательность или может содержать замены в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество аминокислотных замен составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность акцепторного человеческого каркасного участка VL идентична последовательности каркасного участка VL человеческого иммуноглобулина или последовательности консенсусного человеческого каркасного участка.

Понятие "химерное" антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из конкретного источника или конкретных видов, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого источника или других видов.

Понятие "класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, входящего/входящей в тяжелую цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

Понятие "гуманизованное" антитело относится к химерному антителу, которое содержит аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизованное антитело может содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют участкам нечеловеческого антитела, а все или практически все FR соответствуют участкам человеческого антитела. Гуманизованное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящей из человеческого антитела. Понятие "гуманизованная форма" антитела, например нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подвергали гуманизации. Другие формы "гуманизованных антител", подпадающие под объем настоящего изобретения, представляют собой антитела, в которых константная область дополни-

тельно модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом для создания свойств, которые требуются согласно изобретению, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания с Fc-рецептора (FcR).

"Человеческое антитело" представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком или человеческой клеткой, или полученную из источника, отличного от человека, с использованием спектра человеческих антител или других кодирующих человеческое антитело последовательностей. Из указанного определения человеческого антитела специально исключено гуманизованное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-домен" или "Fc-область" относится к С-концевой области тяжелой цепи антитела, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Понятие относится к нативной последовательности Fc-областей и вариантам Fc-областей. Fc-область IgG содержит CH2-домен IgG и CH3-домен IgG. "CH2-домен" Fc-области человеческого IgG, как правило, простирается от аминокислотного остатка, находящегося примерно в положении 231, до аминокислотного остатка, находящегося примерно в положении 340. В одном из вариантов осуществления изобретения к CH2-домону присоединена углеводная цепь. В контексте настоящего описания CH2-домен может иметь нативную последовательность CH2-домена или последовательность варианта CH2-домена. "CH3-домен" содержит сегмент С-концевых остатков до CH2-домена в Fc-области (т.е. от аминокислотного остатка, находящегося примерно в положении 341, до аминокислотного остатка, находящегося примерно в положении 447 IgG). В контексте настоящего описания CH3-домен может иметь нативную последовательность CH3-домена или последовательность варианта CH3-домена (например, CH3-домен с интродуцированной "выпуклостью" ("выступ") в одной его цепи и с соответствующей интродуцированной "полостью" ("впадина") в другой его цепи; см. US № 5821333, специально включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Указанные варианты CH3-доменов можно применять для усиления гетеродимеризации двух неидентичных тяжелых цепей антитела, согласно описанному в настоящем описании методу. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако С-концевой лизин (Lys447) Fc-области может либо присутствовать, либо отсутствовать. Если специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константном участке соответствует системе EU-нумерации, которую называют также EU-индексом, описанной у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Технология "knob-into-hole" описана, например, в US № 5731168; US № 7695936; у Ridgway и др., *Prot Eng* 9, 1996, сс. 617-621 и Carter, J. *Immunol. Meth.* 248, 2001, сс. 7-15. В целом, метод включает интродукцию выпуклости ("выступ") на поверхности раздела первого полипептида и соответствующей полости ("впадина") в поверхности раздела второго полипептида, в результате выпуклость может помещаться в полость, усиливая тем самым образование гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости конструируют путем замены аминокислот с небольшими боковыми цепями на поверхности раздела первого полипептида на аминокислоты с более крупными боковыми цепями (например, на тирозин или триптофан). Компенсирующие полости идентичного или сходного с выпуклостями размера конструируют в поверхности раздела второго полипептида путем замены аминокислот с крупными боковыми цепями на аминокислоты с менее крупными боковыми цепями (например, аланин или треонин). Выпуклость и полость можно создавать, изменяя нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептиды, например, с помощью сайтспецифического мутагенеза или с использованием пептидного синтеза. В конкретном варианте осуществления изобретения модификация, приводящая к образованию "выступа", включает аминокислотную замену T366W в одной из двух субъединиц Fc-домена, и модификация, приводящая к образованию "впадины", включает аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V в другой одной из двух субъединиц Fc-домена. В другом конкретном варианте осуществления изобретения субъединица Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа", дополнительно содержит аминокислотную замену S354C, а субъединица Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "впадины", дополнительно содержит аминокислотную замену Y349C. Интродукция этих двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-домена, дополнительно стабилизирующего димер (Carter, J. *Immunol. Methods* 248, 2001, сс. 7-15). Нумерация соответствует EU-индексу (Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Подразумевается, что "область, эквивалентная Fc-области иммуноглобулина" включает встречающиеся в естественных условиях аллельные варианты Fc-области иммуноглобулина, а также варианты, имеющие изменения, приводящие к заменам, добавлениям или делециям, которые не снижают существенно способность иммуноглобулина опосредовать эффекторные функции (такие как антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность). Например, одну или несколько аминокислот можно изымать путем делеции из N-конца или С-конца Fc-области иммуноглобулина без существенного снижения биологической функции. Указанные варианты можно выбирать согласно общим правилам, известным в данной области, так, чтобы оказывать минимальное воздействие на активность (см., напри-

мер, Bowie J.U. и др., Science 247, 1990, сс. 1306-1310).

Понятие "эффекторные функции" относится к видам биологической активности, присущим Fc-области антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примерами эффекторных функций антитела являются: способность связываться с C1q и комплементзависимая цитотоксичность (CDC), способность связываться с Fc-рецептором, антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), секреция цитокинов, опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора) и активация В-клеток.

"Активирующий Fc-рецептор" представляет собой Fc-рецептор, который после взаимодействия с Fc-областью антитела осуществляет процесс передачи сигналов, которые стимулируют осуществление несущей рецептор клеткой эффекторных функций. Активирующие Fc-рецепторы включают FcγRIIIa (CD 16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) и FcαRI (CD89). Конкретный активирующий Fc-рецептор представляет собой человеческий FcγRIIIa (см. UniProt, код доступа № P08637, версия 141).

Понятие "представитель семейства лигандов TNF" или "лиганд семейства TNF" относится к провоспалительному цитокину. Цитокины в целом и, в частности, представители семейства лигандов TNF играют решающую роль в стимуляции и координации иммунной системы. К настоящему времени идентифицировано 19 цитокинов в качестве представителей суперсемейства лигандов TNF (фактор некроза опухоли) на основе сходства последовательностей, функциональных и структурных характеристик. Все эти лиганды представляют собой трансмембранные белки типа II с С-концевым внеклеточным доменом (эктодомен), N-концевым внутриклеточным доменом и единичным трансмембранным доменом. С-концевой внеклеточный домен, который обозначают как домен гомологии TNF (THD), характеризуется идентичностью 20-30% аминокислот между представителями суперсемейства и ответствен за связывание с рецептором. Эктодомен TNF ответствен также за способность лигандов TNF образовывать тримерные комплексы, которые распознаются их специфическими рецепторами.

Представителей лигандов семейства TNF выбирают из группы, включающей лимфотоксин α (известный также как LTA или TNFSF1), TNF (известный также как TNFSF2), LTβ (известный также как TNFSF3), OX40L (известный также как TNFSF4), CD40L (известный также как CD154 или TNFSF5), FasL (известный также как CD95L, CD178 или TNFSF6), CD27L (известный также как CD70 или TNFSF7), CD30L (известный также как CD153 или TNFSF8), 4-1BBL (известный также как TNFSF9), TRAIL (известный также как APO2L, CD253 или TNFSF10), RANKL (известный также как CD254 или TNFSF11), TWEAK (известный также как TNFSF12), APRIL (известный также как CD256 или TNFSF13), BAFF (известный также как CD257 или TNFSF13B), LIGHT (известный также как CD258 или TNFSF14), TL1A (известный также как VEGI или TNFSF15), GITRL (TNFSF18), EDA-A1 (известный также как эктодисплазин A1) и EDA-A2 (известный также как эктодисплазин A2). Понятие относится, если не указано иное, к любому нативному лиганду семейства TNF из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди), приматы кроме человека (например, обезьяны циномогус) и грызуны (например, мыши и крысы). В конкретных вариантах осуществления изобретения представителя семейства лигандов TNF выбирают из группы, состоящей из OX40L, FasL, CD27L, TRAIL, 4-1BBL, CD40L и GITRL. В конкретном варианте осуществления изобретения представителя семейства лигандов TNF выбирают из 4-1BBL и OX40L.

Дополнительную информацию, в частности о последовательностях представителей семейства лигандов TNF, можно почерпнуть из публично доступных баз данных, таких как Uniprot (www.uniprot.org). Например, человеческие лиганды TNF имеют следующие аминокислотные последовательности: человеческий лимфотоксин α (UniProt, код доступа. P01374, SEQ ID NO: 34), человеческий TNF (UniProt, код доступа № P01375, SEQ ID NO: 35), человеческий лимфотоксин β (UniProt, код доступа № Q06643, SEQ ID NO: 36), человеческий OX40L (UniProt, код доступа № P23510, SEQ ID NO: 37), человеческий CD40L (UniProt, код доступа № P29965, SEQ ID NO: 38), человеческий FasL (UniProt, код доступа № P48023, SEQ ID NO: 39), человеческий CD27L (UniProt, код доступа № P32970, SEQ ID NO: 40), человеческий CD30L (UniProt, код доступа № P32971, SEQ ID NO: 41), 4-1BBL (UniProt, код доступа № P41273, SEQ ID NO: 42), TRAIL (UniProt, код доступа № P50591, SEQ ID NO: 43), RANKL (UniProt, код доступа № 014788, SEQ ID NO: 44), TWEAK (UniProt, код доступа № 043508, SEQ ID NO: 45), APRIL (UniProt, код доступа № 075888, SEQ ID NO: 46), BAFF (UniProt, код доступа № Q9Y275, SEQ ID NO: 47), LIGHT (UniProt, код доступа № 043557, SEQ ID NO: 48), TL1A (UniProt, код доступа № 095150, SEQ ID NO: 49), GITRL (UniProt, код доступа № Q9UNG2, SEQ ID NO: 50) и эктодисплазин A (UniProt, код доступа № Q92838, SEQ ID NO: 51).

"Эктодомен" представляет собой домен мембранного белка, который простирается во внеклеточное пространство (т.е. пространство вне клетки-мишени). Эктодомены, как правило, представляют собой участки белков, которые иницируют контакт с поверхностями, что приводит к трансдукции сигнала. Таким образом, эктодомен представителя семейства лигандов TNF, указанный в настоящем описании, представляет собой участок белка лиганда TNF, который простирается во внеклеточное пространство

(внеклеточный домен), но включает также более короткие участки, ответственные за тримеризацию и связывание с соответствующим TNF-рецептором. Таким образом, понятие "эктодомен представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент" относится к внеклеточному домену представителя семейства лигандов TNF, который образует внеклеточный домен или его участки, которые все еще могут связываться с рецептором (домен, связывающий рецептор).

Понятие "костимуляторный представитель семейства лигандов TNF" или "костимуляторный лиганд семейства TNF" относится к подгруппе представителей семейства лигандов TNF, которые обладают способностью оказывать костимуляторное действие на пролиферацию и производство цитокинов Т-клетками. Указанные лиганды семейства TNF могут костимулировать TCR-сигналы после взаимодействия с их соответствующими TNF-рецепторами, и взаимодействие с их рецепторами приводит к рекрутменту TNFR-ассоциированных факторов (TRAF), которые инициируют каскады передачи сигналов, что приводит к Т-клеточной активации. Костимуляторные лиганды семейства TNF выбирают из группы, состоящей из 4-1BBL, OX40L, GITRL, CD70, CD30L и LIGHT, более конкретно костимуляторные лиганды семейства TNF выбирают из 4-1BBL и OX40L.

Как описано выше, 4-1BBL представляет собой трансмембранный белок типа II и является одним из представителей семейства лигандов TNF. Установлено, что полный или полноразмерный 4-1BBL, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, образует тримеры на поверхности клеток. Образование тримеров определяется специфическими мотивами эктодомена 4-1BBL. Указанные мотивы в контексте настоящего описания обозначают как "область тримеризации". Аминокислоты 50-254 последовательности человеческого 4-1BBL (SEQ ID NO: 52) образуют внеклеточный домен 4-1BBL, но даже его фрагменты могут образовывать тримеры. В конкретных вариантах осуществления изобретения понятие "эктодомен 4-1BBL или его фрагмент" относится к полипептиду, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4 (аминокислоты 52-254 человеческого 4-1BBL), SEQ ID NO: 1 (аминокислоты 71-254 человеческого 4-1BBL), SEQ ID NO: 3 (аминокислоты 80-254 человеческого 4-1BBL) и SEQ ID NO: 2 (аминокислоты 85-254 человеческого 4-1BBL), или полипептиду, имеющему аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 96 (аминокислоты 71-248 человеческого 4-1BBL), SEQ ID NO: 375 (аминокислоты 52-248 человеческого 4-1BBL), SEQ ID NO: 374 (аминокислоты 80-248 человеческого 4-1BBL) и SEQ ID NO: 373 (аминокислоты 85-248 человеческого 4-1BBL), но понятие включает также другие фрагменты эктодомена, обладающие способностью к тримеризации.

Как описано выше, OX40L представляет собой другой трансмембранный белок типа II и является дополнительным представителем семейства лигандов TNF. Полный или полноразмерный OX40L имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. Аминокислоты 51-183 последовательности человеческого OX40L (SEQ ID NO: 53) образуют внеклеточный домен OX40L, но под понятие подпадают также и его фрагменты, которые обладают способностью образовывать тримеры. В конкретных вариантах осуществления изобретения понятие "эктодомен OX40L или его фрагмент" относится к полипептиду, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53 (аминокислоты 51-183 человеческого OX40L) или SEQ ID NO: 54 (аминокислоты 52-183 человеческого OX40L), но понятие включает также другие фрагменты эктодомена, обладающие способностью к тримеризации.

Понятие "пептидный линкер" относится к пептиду, содержащему одну или несколько аминокислот, как правило примерно 2-20 аминокислот. Пептидные линкеры известны в данной области и указаны в настоящем описании. Приемлемыми неиммуногенными линкерными пептидами являются, например, пептидные линкеры $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ или $G_4(SG_4)_n$, в которых "n", как правило, обозначает число от 1 до 10, как правило от 1 до 4, в частности 2, т.е. пептиды, выбранные из группы, состоящей из GGGGS (SEQ ID NO: 128), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13), SGGGSGGGG (SEQ ID NO: 55) и GGGGS GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 56), но также включают последовательности GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 57), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 58), GSGSGNGS (SEQ ID NO: 59), GGSGSGSG (SEQ ID NO: 60), GGSGSG (SEQ ID NO: 61), GGSG (SEQ ID NO: 62), GGSGNGSG (SEQ ID NO: 63), GGNGSGSG (SEQ ID NO: 64) и GGNGSG (SEQ ID NO: 65). Наибольший интерес представляют пептидные линкеры $(G_4S)_1$ или GGGGS (SEQ ID NO: 128), $(G_4S)_2$ или GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13) и d GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 57), более предпочтительно $(G_4S)_2$ или GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13) и GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 57).

Понятие "аминокислота" в контексте настоящего описания обозначает группу встречающихся в естественных условиях карбокси- α -аминокислот, таких как аланин (трехбуквенный код: ala, однобуквенный код: A), аргинин (arg, R), аспарагин (asn, N), аспарагиновая кислота (asp, D), цистеин (cys, C), глутамин (gln, Q), глутаминовая кислота (glu, E), глицин (gly, G), гистидин (his, H), изолейцин (ile, I), лейцин (leu, L), лизин (lys, K), метионин (met, M), фенилаланин (phe, F), пролин (pro, P), серин (ser, S), треонин (thr, T), триптофан (trp, W), тирозин (tyr, Y) и валин (val, V).

Понятие "одноцепочечный слитый белок" в контексте настоящего описания относится к одноцепочечному полипептиду, состоящему из одного или двух эктодоменов указанного представителя семейства лигандов TNF, который слит с участком антигенсвязывающего фрагмента или Fc-областью. Слияние можно осуществлять с помощью непосредственного связывания N- или C-концевой аминокислоты антигенсвязывающего участка через пептидный линкер с C- или N-концевой аминокислотой эктодомена ука-

занного представителя семейства лигандов TNF.

Под понятием "слитый" или "связанный" подразумевают, что компоненты (например, полипептид и эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF) соединены пептидными связями либо непосредственно, либо через один или несколько пептидных линкеров.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно полипептидной (белковой) референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивания последовательностей и интродукции при необходимости брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и при этом какие-либо консервативные замены не учитываются при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, которые находятся в компетенции специалиста в данной области, например, с использованием публично доступных компьютерных программ, таких как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN, SAWI или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего изобретения величину % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием предназначенной для сравнения последовательностей компьютерной программы ALIGN-2. Предназначенная для сравнения последовательностей компьютерная программа ALIGN-2 разработана фирмой Genentech, Inc., и исходный код помещен на хранение вместе с документацией для пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером U.S. Copyright Registration, № TXU510087. Программа ALIGN-2 представляет собой публично доступную программу фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать из исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую версию UNIX V4.0D. В программе ALIGN-2 все параметры для сравнения последовательностей являются заданными и не должны изменяться. В ситуациях, когда ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности А относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б (которую другими словами можно обозначать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или отличается определенным % идентичности аминокислотной последовательности относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б), рассчитывают следующим образом:

$$100 \times \text{частное } X/Y,$$

где X обозначает количество аминокислотных остатков, оцененных программой сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при сравнительном анализе последовательностей А и Б с помощью указанной программы и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в Б. Должно быть очевидно, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, то % идентичности аминокислотной последовательности А относительно аминокислотной последовательности Б не должен быть равен % идентичности аминокислотной последовательности Б относительно аминокислотной последовательности А. Если специально не указано иное, то в контексте настоящего описания все величины % идентичности аминокислотных последовательностей получают согласно процедуре, описанной в последнем из предшествующих параграфов, с помощью компьютерной программы ALIGN-2.

Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются "варианты аминокислотных последовательностей" содержащих тримерный лиганд TNF антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании. Например, может оказаться желательным повышать аффинность связывания и/или другие биологические свойства содержащих тримерный лиганд TNF антигенсвязывающих молекул. Варианты аминокислотных последовательностей содержащих тримерный лиганд TNF антигенсвязывающих молекул можно получать путем интродукции соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулы, или путем пептидного синтеза. Указанные модификации включают, например, делеции и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечной конструкции можно использовать любую комбинацию делеций, инсерций и замен, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, способностью связываться с антигеном. Представляющие интерес сайты для замещающего мутагенеза включают HVR и каркасные участки (FR). Консервативные замены представлены в табл. Б под заголовком "предпочтительные замены" и дополнительно описаны ниже со ссылкой на классы (1)-(6) боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены можно интродуцировать в представляющую интерес молекулу и продукты подвергать скринингу в отношении требуемой активности, например, сохранения/повышения способности к связыванию антигена, пониженной иммуногенности или улучшенной ADCC или CDC.

Таблица Б

Исходный остаток	Приведенные в качестве примера замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Аминокислоты можно группировать на основе общих свойств боковых цепей следующим образом:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Под неконсервативными заменами подразумевают замену представителя одного из указанных классов на представителя из другого класса.

Понятие "варианты аминокислотной последовательности" включает полученные в результате замены варианты, в которых имеют место аминокислотные замены одного или нескольких остатков в гипервариабельном участке родительской антигенсвязывающей молекулы (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, образовавшийся(еся) вариант(ы), выбранный(ые) для дальнейшего изучения, должен(ны) иметь модификации (например, улучшения) определенных биологических свойств (например, повышенная аффинность, пониженная иммуногенность) относительно родительской антигенсвязывающей молекулы и/или должен(ны) практически сохранять определенные биологические свойства родительской антигенсвязывающей молекулы. Примером полученного в результате замены варианта является антитело с созревшей аффинностью, которое можно легко получать, например, с помощью методов созревания аффинности на основе фагового дисплея, которые указаны в настоящем описании. В целом, метод состоит в следующем: один или несколько остатков HVR подвергают мутации и вариант антигенсвязывающих молекул экспонируют на фаге и подвергают скринингу в отношении конкретной биологической активности (например, аффинности связывания). В некоторых вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции могут затрагивать один или несколько HVR, если указанные изменения не снижают существенно способность антигенсвязывающей молекулы связываться с антигеном. Например, в HVR могут быть сделаны консервативные изменения (например, консервативные замены, указанные в настоящем описании), которые не снижают существенно аффинность связывания. Ценным методом идентификации остатков или областей антитела, которые можно подвергать мутагенезу, является так называемый "аланин-сканирующий мутагенез", описанный у Cunningham B.C. и Wells J.A., Science 244, 1989, сс. 1081-1085. При осуществлении этого метода остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) идентифицируют и заменяют на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (например, аланин или полиаланин) для решения вопроса о том, будет ли это влиять на взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замены можно интродуцировать в те положения аминокислот, для которых продемонстрирована функциональная чувствительность к начальным заменам. В альтернативном или дополнительном варианте изучают кристаллическую структуру комплекса антиген-антигенсвязывающая молекула для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Указанные контактирующие остатки и соседние остатки можно рассматривать в качестве мишеней или исключать из рассмотрения в качестве кандидатов для замены. Варианты можно подвергать скринингу для решения вопроса о том, обладают ли они требуемыми свойствами.

Аминокислотные инсерции включают amino- и/или карбоксиконцевые слияния, варьирующие по

длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или большее количество остатков, а также инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков внутрь последовательности. Примером результата осуществления концевых инсерций является содержащая тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающая молекула с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерционные варианты молекул слияние N- или C-концов антитела с полипептидом, который удлиняет время полужизни в сыворотке содержащих тримерный лиганд TNF антигенсвязывающих молекул.

В некоторых вариантах осуществления изобретения содержащие тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, изменяют с целью повышения или понижения степени гликозилирования антитела. Добавление или делецию сайтов гликозилирования в антителе можно легко осуществлять. Варианты гликозилирования молекул легко можно получать путем такого изменения аминокислотной последовательности, которое позволяет создавать или удалять один или несколько сайтов гликозилирования. Если содержащая тримерный лиганд TNF антигенсвязывающая молекула содержит Fc-область, то можно изменять присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, которые продуцируются клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный биантенный олигосахарид, который, как правило, присоединен с помощью N-связи к Asn297 CH2-домена Fc-области (см., например, Wright A. и Morrison S.L., TIBTECH 15, 1997, сс. 26-32). Олигосахарид может включать различные углеводы, например маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стебле" биантенной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации олигосахарида в содержащей тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающей молекуле, предлагаемой в изобретении, можно осуществлять для создания вариантов с определенными улучшенными свойствами. Одним из объектов изобретения являются содержащие тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающие молекулы, имеющие углеводную структуру, в которой снижено содержание фукозы, присоединенной (прямо или косвенно) к Fc-области. Указанные фукозилированные варианты могут обладать улучшенной ADCC-функцией (см., например, US № 2003/0157108 (Presta L.) или US № 2004/0093621 (фирма Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Другие варианты содержащих тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, включают варианты с двурассекающими олигосахаридами, например, в которых биантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-области, двурассекается с помощью GlcNAc. Указанные варианты могут обладать пониженным уровнем фукозилирования и/или улучшенной ADCC-функцией, см., например, WO 2003/011878 (Jean-Mairet и др.); US № 6602684 (Umana и др.) и US 2005/0123546 (Umana и др.). Предложены также варианты по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Такие варианты антител могут обладать повышенной CDC-функцией, и они описаны, например, WO 1997/30087 (Patel и др.); WO 1998/58964 (Raju S.) и WO 1999/22764 (Raju S.).

В некоторых вариантах осуществления изобретения может оказаться желательным создавать "сконструированные с помощью цистеина варианты" содержащей тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, например, "тиоМАт", в которых один или несколько остатков в молекуле заменены на остатки цистеина. В конкретных вариантах осуществления изобретения замененные остатки находятся в доступных сайтах молекулы. Путем замены этих остатков на цистеин реакционноспособные тиольные группы помещаются в доступные сайты антитела и могут использоваться для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты, представляющие собой лекарственное средство, или фрагменты, представляющие собой линкер, связанный с лекарственным средством, с созданием иммуноконъюгата, указанного ниже в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения любой(ые) один или несколько следующих остатков может(гут) быть заменен(ы) на цистеин: V205 (нумерация по Кэботу) легкой цепи; A118 (EU-нумерация) тяжелой цепи и S400 (EU-нумерация) Fc-области тяжелой цепи. Сконструированные с помощью цистеина антигенсвязывающие молекулы можно получать согласно методу, например, описанному в US № 7521541.

В некоторых объектах изобретения содержащие тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно дополнительно модифицировать таким образом, чтобы они содержали дополнительные небелковые фрагменты, известные в данной области и легко доступные. Фрагменты, пригодные для дериватизации антитела, включают (но, не ограничиваясь только ими) водорастворимые полимеры. Примерами водорастворимых полимеров являются (но, не ограничиваясь только ими) полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран- или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущество при производстве благодаря его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным.

Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться и, если присоединено

более одного полимера, то они могут представлять собой одинаковые или различные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, применяемых для дериватизации, можно определять с учетом таких особенностей (но, не ограничиваясь только ими), как конкретные свойства или функции антитела, подлежащие усовершенствованию, предполагается ли применение производного биспецифического антитела в терапии в определенных условиях и т.д.

Другим объектом изобретения являются конъюгаты антитела и небелкового фрагмента, которые можно избирательно нагревать, воздействуя на них излучением. В одном из вариантов осуществления изобретения небелковый фрагмент представляет собой углеродную нанотрубку (Кам и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2005, сс. 11600-11605). Излучение может иметь любую длину волны и включает (но, не ограничиваясь только ими) длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой уничтожаются клетки, ближайшие к конъюгату: антитело-небелковый фрагмент.

Согласно другому объекту изобретения можно получать иммуноконъюгаты содержащих тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающих молекул. "Иммуноконъюгат" представляет собой антитело, конъюгированное с одной или несколькими гетерологичной(ыми) молекулой(ами), включая (но, не ограничиваясь только ими) цитотоксический агент.

Понятие "полинуклеотид" относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или конструкции, например матричной РНК (мРНК), РНК вирусного происхождения или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать обычную фосфодиэфирную связь или нетрадиционную связь (например, амидную связь, такую, которая присутствует в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Понятие "молекула нуклеиновой кислоты" относится к любому одному или нескольким сегментам нуклеиновой кислоты, например, фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде.

Под "выделенной" молекулой нуклеиновой кислоты или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, т.е. ДНК или РНК, которая отделена от ее нативного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий входящий в вектор полипептид, рассматривается как выделенный для целей настоящего изобретения. Другими примерами выделенного полинуклеотида являются рекомбинантные полинуклеотиды, присутствующие в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или полностью) полинуклеотиды, находящиеся в растворе. Выделенный полинуклеотид включает молекулу полинуклеотида, входящую в клетки, которые в норме содержат молекулу полинуклеотида, но молекула полинуклеотида присутствует вне хромосомы или имеет локализацию в хромосоме, отличную от ее локализации в хромосоме в естественных условиях. Выделенные молекулы РНК включают полученные *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты, предлагаемые в настоящем изобретении, а также формы с позитивной и негативной цепью и двухцепочечные формы. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, включают также указанные молекулы, полученные с помощью синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может представлять собой или может включать регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосом или терминатор транскрипции.

Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, имеющей/имеющим нуклеотидную последовательность, которая, например, на 95% "идентична" нуклеотидной референс-последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, подразумевается, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична референс-последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной референс-последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 95% нуклеотидной референс-последовательности, вплоть до 5% нуклеотидов в референс-последовательности можно изымать путем делеции или заменять на другой нуклеотид, или вплоть до 5% нуклеотидов от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эти изменения референс-последовательности могут иметь место в положениях на 5'- или 3'-конце нуклеотидной референс-последовательности или в ином положении между этими концевыми положениями, и их встраивают либо индивидуально между остатками в референс-последовательности, либо их встраивают в референс-последовательность в виде одной или нескольких смежных групп. На практике решение вопроса о том, идентична ли конкретная полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, можно решать, как правило, с использованием известных компьютерных программ, например, указанных выше для полипептидов (например, ALIGN-2).

Понятие "кассета экспрессии" относится к полинуклеотиду, полученному с помощью рекомбинации или синтеза, который содержит серии специфических нуклеотидных элементов, которые обеспечивают транскрипцию конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени. Рекомбинантную кассету экспрессии можно встраивать в плазмиду, хромосому, митохондриальную ДНК, плазмидную ДНК, вирус или фрагмент нуклеиновой кислоты. Как правило, рекомбинантная кассета экспрессии, представляющая собой часть экспрессионного вектора, включает среди прочих последовательностей подлежащую транскрипции нуклеотидную последовательность и промотор. В некоторых вариантах осуществления изобре-

тения кассета экспрессии, предлагаемая в изобретении, содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты.

Понятие "вектор" или "экспрессионный вектор" является синонимом понятия "экспрессионная конструкция" и относится к молекуле ДНК, которую применяют для интродукции и обеспечения экспрессии конкретного гена, с которой он функционально связан в клетке-мишени. Понятие включает вектор, представляющий собой самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Экспрессионный вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит кассету экспрессии. Экспрессионные векторы позволяют осуществлять транскрипцию стабильной мРНК в больших количествах. Когда экспрессионный вектор находится внутри клетки-мишени, то молекула рибонуклеиновой кислоты или белок, который кодируется геном, продуцируется в результате клеточного механизма транскрипции и/или трансляции. В одном из вариантов осуществления изобретения экспрессионный вектор, предлагаемый в изобретении, содержит кассету экспрессии, которая включает полинуклеотидные последовательности, которые кодируют биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты.

В контексте настоящего описания понятия "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используются взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичные трансформированные клетки, а также потомство, выведенное из них, независимо от количества пересевов. Потомство может не быть строго идентичным родительской клетке по составу нуклеиновых кислот, а может нести мутации. Под данное понятие подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга или селекции исходная трансформированная клетка. Клетка-хозяин представляет собой любой тип клеточной системы, которую можно применять для создания биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как (но, не ограничиваясь только ими) CHO-клетки, BHK-клетки, NSO-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышины миеломы линии P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки растений, но также клетки, находящиеся в трансгенном животном, трансгенном растении или в культивируемой растительной или животной ткани.

Понятие "эффективное количество" агента относится к количеству, необходимому для обеспечения физиологического изменения в клетке или ткани, в которую его вводят.

Понятие "терапевтически эффективное количество" агента, например фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному при применении в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата.

Терапевтически эффективное количество агента, например, элиминирует, снижает, замедляет, минимизирует или предупреждает нежелательные явления заболевания.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее. Млекопитающие представляют собой (но, не ограничиваясь только ими) одомашненных животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, люди и приматы кроме человека, такие как мартышки), кроликов и грызунов (например, мыши и крысы). Предпочтительно индивидуум или субъект представляет собой человека.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, что он обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и который не содержит дополнительных компонентов, которые обладают неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но, не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

Понятие "листовка-вкладыш в упаковку" в контексте настоящего описания относится к инструкциям, которые обычно помещают в поступающие в продажу упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности при применении указанных терапевтических продуктов.

В контексте настоящего описания понятие "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "процесс лечения") относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики или в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но, не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления

изобретения молекулы, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

В контексте настоящего описания понятие "рак" относится к пролиферативным заболеваниям, таким как лимфомы, лимфолейкозы, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), альвеолярно-клеточный рак легкого, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожная или внутриглазная меланома, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, гастральный рак, рак ободочной кишки (CRC), рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, карцинома фаллопиевых труб, карцинома эндометрия, карцинома шейки матки, карцинома влагалища, карцинома вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркома мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак пениса, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточная карцинома, карцинома почечной лоханки, мезотелиома, печеночно-клеточный рак, билиарный рак, неоплазмы центральной нервной системы (ЦНС), опухоли позвоночника, глиома ствола головного мозга, мультиформная глиобластома, астроцитомы, шванномы, эпендимомы, медуллобластомы, менингиомы, плоскоклеточные карциномы, аденома гипофиза и саркома Юинга, меланома, множественная миелома, В-клеточный рак (лимфома), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), волосатоклеточный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз, включая рефрактерные варианты любого из указанных выше видов рака и комбинации одного или нескольких видов рака.

Содержащие тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении.

В изобретении предложены новые содержащие тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающие молекулы с наиболее предпочтительными свойствами, такими как технологичность, стабильность, аффинность связывания, биологическая активность, эффективность целенаправленного действия (таргетинг) и пониженная токсичность.

Первым объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

- (а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и
- (б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

- (а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и
- (б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, и
- (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

- (а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и
- (б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, где представитель семейства лигандов TNF костимулирует активацию человеческих Т-клеток.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

- (а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и
- (б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пеп-

тидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, при этом эктодомены представителя семейства лигандов TNF во всех случаях являются идентичными.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по п.1 формулы изобретения, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что (I) первый полипептид содержит CH1- или CL-домен и второй полипептид содержит CL- или CH1-домен соответственно, при этом второй полипептид сцеплен с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменом, и при этом первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с CH1- или CL-доменом пептидным линкером, и при этом второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который соединен пептидным линкером с CL- или CH1-доменом указанного полипептида, или

(II) первый полипептид содержит CH3-домен и второй полипептид содержит CH3-домен соответственно, и при этом первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с С-концом CH3-домена пептидным линкером, и при этом второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который соединен пептидным линкером с С-концом CH3-домена указанного полипептида, или

(III) первый полипептид содержит VH-CL- или VL-CH1-домен и второй полипептид содержит VL-CH1-домен или VH-CL-домен соответственно, при этом первый полипептид сцеплен с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменом и при этом первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с VH или VL пептидным линкером, и при этом второй полипептид содержит один эктодомен представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, соединенный через пептидный линкер с VL или VH указанного полипептида.

В конкретном объекте изобретения антигенсвязывающая молекула содержит тримерный лиганд семейства TNF, который костимулирует активацию человеческих Т-клеток, выбранный из 4-1BBL и OX40L. Более конкретно представитель семейства лигандов TNF представляет собой 4-1BBL.

В другом объекте изобретения эктодомен представителя семейства лигандов TNF содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 375, прежде всего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 96. В одном из объектов изобретения эктодомен представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 96, прежде всего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 96. В конкретном объекте изобретения эктодомен представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4. В конкретном объекте изобретения первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97 и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с анти-

геном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183.

Еще одним объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 184 или SEQ ID NO: 185.

В другом объекте изобретения представитель семейства лигандов TNF представляет собой OX40L. Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой эктодомен представителя семейства лигандов TNF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, прежде всего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

Еще одним объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 371 или SEQ ID NO: 372, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54 соответственно.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый полипептид, содержащий CH1- или CL-домен, и второй полипептид, содержащий CL- или CH1-домен соответственно, при этом второй полипептид сцеплен с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1-и CL-доменом,

и где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с CH1- или CL-доменом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, соединенный через пептидный линкер с CL- или CH1-доменом указанного полипептида.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый полипептид, содержащий CH1-домен, и второй полипептид, содержащий CL-домен, при этом второй полипептид сцеплен с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменами,

и где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с CH1-доменом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, соединенный через пептидный линкер с CL-доменом указанного полипептида.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый полипептид, содержащий CL-домен, и второй полипептид, содержащий CH1-домен, при этом второй полипептид сцеплен с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменами,

и где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с CL-доменом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, соединенный через пептидный линкер с CH1-доменом указанного полипептида.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) один участок, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) более одного фрагмента, который обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, соединенный через пептидный линкер с указанным полипептидом.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) два фрагмента, обладающих способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит СНЗ-домен и второй полипептид содержит СНЗ-домен соответственно, и тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с С-концом СНЗ-домена пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, соединенный через пептидный линкер с С-концом СНЗ-домена указанного полипептида. В частности, указанная антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, содержит два фрагмента, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) два фрагмента, обладающих способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент,

в которой два фрагмента, обладающих способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, связываются с двумя различными антигенами клетки-мишени.

Следующим объектом изобретения является описанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, выбирают из группы, состоящей из антитела, фрагмента антитела и антигенсвязывающего белка-каркаса.

Следующим объектом изобретения является описанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, выбирают из группы, состоящей из фрагмента антитела, молекулы Fab, кроссовер-молекулы Fab, одноцепочечной молекулы Fab, молекулы Fv, молекулы scFv, однодоменного антитела, aVH и антигенсвязывающего белка-каркаса. В одном из объектов изобретения фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представ-

ляет собой aVN или антигенсвязывающий белок-каркас. В одном из объектов изобретения фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой антигенсвязывающий белок-каркас. В одном из объектов изобретения фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой антигенсвязывающий белок-каркас, который обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени.

В частности, антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, содержит один или два фрагмента, обладающих способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой кроссовер-молекулу Fab, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени. В частности, фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой Fab, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени.

Кроме того, предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, указанная в настоящем описании, для которой антиген клетки-мишени выбирают из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), карциноэмбриональный антиген (CEA), CD19, CD20 и CD33.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, в которой пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на С-конце с CH1-доменом тяжелой цепи с помощью второго пептидного линкера, и в которой один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент слит на С-конце с CL-доменом легкой цепи с помощью третьего пептидного линкера.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, в которой пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или его фрагменты, соединенные друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слиты на С-конце с CL-домен тяжелой цепи с помощью второго пептидного линкера, и в которой один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF слит на С-конце с CH1-доменом легкой цепи с помощью третьего пептидного линкера.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, в которой пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на С-конце с CL-доменом легкой цепи с помощью второго пептидного линкера, и в которой один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF слит на С-конце с CH1-доменом тяжелой цепи с помощью третьего пептидного линкера.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, указанная выше, в которой пептидный линкер представляет собой (G4S)₂. В одном из объектов изобретения первый пептидный линкер представляет собой (G4S)₂ (SEQ ID NO: 13), второй пептидный линкер представляет собой GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 57) и третий пептидный линкер представляет собой (G4S)₂ (SEQ ID NO: 13). В частности, изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей тримерный лиганд TNF, указанной выше, в которой первый пептидный линкер представляет собой (G4S)₂ (SEQ ID NO: 13), второй пептидный линкер представляет собой (G4S)₂ (SEQ ID NO: 13) и третий пептидный линкер представляет собой (G4S)₂ (SEQ ID NO: 13).

В другом объекте изобретения антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, указанная выше, содержит Fc-домен, который состоит из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации.

В частности, антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, содержит: (а) молекулу Fab, обладающую способностью, специфически связываться с антигеном клетки-мишени, в которой тяжелая цепь Fab слита на С-конце с N-концом CH2-домена в Fc-доме, и (в) Fc-домен, который состоит из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации.

В другом объекте изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG, в частности Fc-домен IgG1 или Fc-домен IgG4. Более конкретно Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1. В конкретном объекте изобретения Fc-домен содержит модификацию, усиливающую ассоциацию первой и второй субъединиц Fc-домена.

Модификации Fc-домена, приводящие к снижению связывания с Fc-рецептором и/или эффекторной функции.

Fc-домен антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемых в изобретении, состоит из пары полипептидных цепей, которые содержат домены тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекулы иммуноглобулина G (IgG) представляет

собой димер, каждая субъединица которого содержит константные домены CH2 и CH3 тяжелой цепи IgG. Две субъединицы Fc-домена обладают способностью к стабильной ассоциации друг с другом.

Fc-домен придает антигенсвязывающей молекуле, предлагаемой в изобретении, предпочтительные фармакокинетические свойства, включая продолжительное время полужизни в сыворотке, что обеспечивает хорошее накопление в ткани-мишени и предпочтительное соотношение распределения в ткани-крови. Однако в то же время он может приводить к нежелательной направленности биспецифических антител, предлагаемых в изобретении, к клеткам, которые экспрессируют Fc-рецепторы, а не к предпочтительным несущим антиген клеткам. Таким образом, в конкретных объектах изобретения Fc-домен антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, обладает пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором и/или пониженной эффекторной функцией по сравнению с нативным Fc-доменом IgG1. В одном из объектов изобретения Fc не связывается существенно с Fc-рецептором и/или не индуцирует эффекторную функцию. В конкретном объекте изобретения Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор. В одном из объектов изобретения Fc-рецептор представляет собой человеческий Fc-рецептор. В конкретном объекте изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий человеческий Fcγ-рецептор, более конкретно человеческий FcγRIIIa, FcγRI или FcγRIIa, наиболее предпочтительно человеческий FcγRIIIa. В одном из объектов изобретения Fc-домен не индуцирует эффекторную функцию. Пониженная эффекторная функция может представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) пониженную(ые) одну или несколько из следующих функций: пониженная комплементзависимая цитотоксичность (CDC), пониженная антитело-обусловленная клеточнозависимая фагоцитоз (ADCC), пониженный антитело-обусловленный клеточнозависимый апоптоз (ADCP), пониженная секреция цитокинов, пониженное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, пониженное связывание с NK-клетками, пониженное связывание с макрофагами, пониженное связывание с моноцитами, пониженное связывание с полиморфноядерными клетками, пониженная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, пониженное созревание дендритных клеток или пониженное Т-клеточное примирование.

В некоторых объектах изобретения одну или несколько аминокислотных модификаций можно интродуцировать в Fc-область антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, представленной в настоящем описании, создавая тем самым вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность человеческой Fc-области (например, Fc-области человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени;

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, и

(в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации, в которой Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ых) замену(н), которая(ые) снижает(ют) связывание с Fc-рецептором, в частности с Fcγ-рецептором.

В одном из объектов изобретения Fc-домен антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, содержит одну или несколько аминокислотную(ых) мутацию(ий), которая(ые) снижает(ют) аффинность связывания с Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. Как правило, одинаковая(ые) одна или несколько аминокислотных мутаций присутствует(ют) в каждой из двух субъединиц Fc-домена. В частности, Fc домен содержит аминокислотную замену в положении E233, L234, L235, N297, P331 и P329 (EU-нумерация). В частности, Fc-домен содержит аминокислотные замены в положениях 234 и 235 (EU-нумерация) и/или 329 (EU-нумерация) тяжелых цепей IgG. Более конкретно, предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, которая содержит Fc-домен с аминокислотными заменами L234A, L235A и P329G ("P329G LALA", EU-нумерация) в тяжелых цепях IgG. Аминокислотные замены L234A и L235A обозначают как LALA-мутация. Комбинация "P329G LALA" аминокислотных замен практически полностью элиминирует связывание с Fcγ-рецептором Fc-домена человеческого IgG1, и описана в опубликованной заявке на патент WO 2012/130831 A1, в которой описаны методы получения указанных мутантных Fc-доменов и методы определения их свойства, таких как связывание с Fc-рецептором или эффекторные функции. "EU-нумерация" означает систему нумерации согласно EU-индексу, описанную у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Fc-домены с пониженной способностью связываться с Fc-рецептором и/или эффекторной функцией

включают также Fc-домены с заменой одного или нескольких остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 в Fc-домене (US № 637056). К указанным мутантам Fc относятся мутанты Fc с заменами в двух или большем количестве из аминокислотных положений 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант Fc-домена "DANA" с заменой остатков 265 и 297 на аланин (US № 7332581).

В другом объекте изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4. Антитела подкласса IgG4 обладают пониженной аффинностью к связыванию с Fc-рецепторами и пониженными эффекторными функциями по сравнению с антителами подкласса IgG1. В одном из объектов изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4, который содержит аминокислотные замены в положении S228 (нумерация по Кэботу), конкретно аминокислотную замену S228P. В более конкретном объекте изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4, который содержит аминокислотные замены в положениях L235E и S228P, и P329G (EU-нумерация). Указанные мутанты Fc-домена IgG4 и их способность связываться с Fcγ-рецептором описаны в WO 2012/130831.

Мутантные Fc-домены можно получать путем аминокислотной делеции, замены, инсерции или модификации с использованием генетических или химических методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать сайтнаправленный мутагенез кодирующей ДНК последовательности, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильность нуклеотидных замен можно подтверждать, например, секвенированием.

Связывание с Fc-рецепторами можно легко определять, например, с помощью ELISA или поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием стандартного оборудования, такого как устройство BIAcore (фирма GE Healthcare), и с применением таких Fc-рецепторов, которые можно получать методом рекомбинантной экспрессии. Приемлемый указанный анализ связывания представлен в настоящем описании. Альтернативно этому, аффинность связывания с Fc-доменами или активирующими клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих Fc-домен, с Fc-рецепторами можно оценивать с использованием клеточных линий, для которых известно, что они экспрессируют конкретные Fc-рецепторы, такие как человеческие NK-клетки, экспрессирующие FcγIIIa-рецептор.

Эффекторную функцию Fc-домена или биспецифических антител, предлагаемых в изобретении, которые содержат Fc-домен, можно оценивать методами, известными в данной области. Приемлемый анализ для оценки ADCC представлен в настоящем описании. Другие примеры анализов *in vitro*, предназначенных для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы, описаны в US № 5500362; у Hellstrom и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1986, сс. 7059-7063 и Hellstrom и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1985, сс. 1499-1502; US № 5821337; у Bruggemann и др., J. Exp. Med. 166, 1987, сс. 1351-1361. Альтернативно этому, можно применять методы, основанные на нерадиоактивном анализе (см., например, АСТП™ - нерадиоактивный анализ цитотоксичности с помощью проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, шт. Калифорния); и CytoTox 96®- нерадиоактивный анализ цитотоксичности (фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин)). Приемлемыми эффекторными клетками для таких анализов являются моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, с использованием созданных на животных моделей, описанных у Clynes и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1998, сс. 652-656.

В некоторых вариантах осуществления изобретения снижают связывание с Fc-домена с компонентом системы комплемента, в частности с C1q. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал пониженной эффекторной функцией, указанная пониженная эффекторная функция включает пониженную CDC. Можно осуществлять анализы связывания C1q для решения вопроса о том, могут ли биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, связываться с C1q и, как следствие, обладают ли они CDC-активностью (см., например, анализы связывания с C1q и C3c с помощью ELISA, описанные в WO 2006/029879 и WO 2005/100402). Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro и др., J. Immunol. Methods 202, 1996, с. 163; Cragg и др., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 и Cragg и Glennie, Blood 103, 2004, сс. 2738-2743).

В конкретном объекте изобретения Fc-домен содержит модификацию, усиливающую ассоциацию первой и второй субъединиц Fc-домена.

Модификации Fc-домена, усиливающие гетеродимеризацию.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит: (а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; (б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом пептидным линкером, и тем, что второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации, и в которой Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ых) замену(н), которая(ые) снижа-

ет(ют) связывание с Fc-рецептором, прежде всего Fcγ-рецептором. Таким образом, они содержат разные фрагменты, слитые с одной или с другой из двух субъединиц Fc-домена, которые, как правило, присутствуют в двух неидентичных полипептидных цепях ("тяжелые цепи"). Рекомбинантная совместная экспрессия этих полипептидов и последующая димеризация приводят к нескольким возможным комбинациям двух полипептидов. Для повышения выхода и чистоты антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, при их получении методами рекомбинации целесообразно интродуцировать в Fc-домен антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемых в изобретении, модификацию, которая усиливает ассоциацию требуемых полипептидов.

Таким образом, Fc-домен антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемых в изобретении, содержит модификацию, которая усиливает ассоциацию первой и второй субъединиц Fc-домена. Сайт наиболее сильного белок-белкового взаимодействия двух субъединиц Fc-домена человеческого IgG находится в СНЗ-домене Fc-домена. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация находится в СНЗ-домене Fc-домена.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация представляет собой так называемую модификацию типа "knob-in-hole", которая включает модификацию, приводящую к образованию "выступа" на одной из двух субъединиц Fc-домена и к образованию "впадины" в другой одной из двух субъединиц Fc-домена. Таким образом, конкретным объектом изобретения является описанная выше антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит молекулу IgG, в которой Fc-область первой тяжелой цепи содержит первый модуль димеризации, а Fc-область второй тяжелой цепи содержит второй модуль димеризации, что обеспечивает гетеродимеризацию двух тяжелых цепей молекулы IgG, и первый модуль димеризации содержит "выступы", а второй модуль димеризации содержит "впадины" в соответствии с технологией "knob-into-hole".

Технология "knob-into-hole" описана, например, в US № 5731168; US № 7695936; у Ridgway и др., Prot. Eng. 9, 1996, сс. 617-621 и Carter, J. Immunol. Meth. 248, 2001, сс. 7-15. В целом, метод включает интродукцию выпуклости ("выступ") на поверхности раздела первого полипептида и соответствующей полости ("впадина") в поверхности раздела второго полипептида, в результате выпуклость может помещаться в полость, усиливая тем самым образование гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости конструируют путем замены аминокислот с небольшими боковыми цепями на поверхности раздела первого полипептида на аминокислоты с более крупными боковыми цепями (например, на тирозин или триптофан). Компенсирующие полости идентичного или сходного с выпуклостями размера конструируют в поверхности раздела второго полипептида путем замены аминокислот с крупными боковыми цепями на аминокислоты с менее крупными боковыми цепями (например, аланин или треонин).

Таким образом, согласно конкретному объекту изобретения в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемых в изобретении, аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, который имеет больший объем боковой цепи, что приводит к образованию выпуклости в СНЗ-домене первой субъединицы, которая может помещаться в полость в СНЗ-домене второй субъединицы, и в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, который имеет меньший объем боковой цепи, что приводит к образованию полости в СНЗ-домене второй субъединицы, в которую может помещаться выпуклость в СНЗ-домене первой субъединицы.

Выпуклость и полость можно создавать путем изменения нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды, например, с помощью сайтнаправленного мутагенеза или путем пептидного синтеза.

В конкретном объекте изобретения в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена остаток треонина в положении 366 заменен остатком триптофана (T366W), и в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена остаток тирозина в положении 407 заменен остатком валина (Y407V). Более конкретно, во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток треонина в положении 366 заменен остатком серина (T366S) и остаток лейцина в положении 368 заменен остатком аланина (L368A). Более конкретно, в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 заменен остатком цистеина (S354C) и во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 заменен остатком цистеина (Y349C). Интродукция этих двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-домена, дополнительно стабилизирующего димер (Carter, J. Immunol. Methods 248, 2001, сс. 7-15).

В альтернативном варианте осуществления изобретения модификация, усиливающая ассоциацию первой и второй субъединиц Fc-домена, представляет собой модификацию, которая опосредует определяемые электростатическим действием воздействия, например, описанные в публикации РСТ WO 2009/089004. В целом, указанный метод включает замену одного или нескольких аминокислотных остатков на поверхности раздела двух субъединиц Fc-домена на заряженные аминокислотные остатки, в результате чего образование гомодимера становится электростатически невыгодным, а гетеродимеризация становится электростатически выгодной.

Модификации в СН1/CL-доменах.

Для дальнейшего улучшения правильного спаривания антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, могут включать различные замены заряженных аминокислот (так на-

зываемые "заряженные остатки"). Эти модификации интродуцируют в скрещенные или нескрещенные CH1- и CL-домены. Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой в одном из CL-доменов аминокислота в положении 123 (EU-нумерация) заменена на аргинин (R) и аминокислота в положении 124 (EU-нумерация) заменена на лизин (K) и в которой в одном из CH1-доменов аминокислоты в положении 147 (EU-нумерация) и положении 213 (EU-нумерация) заменены на глутаминовую кислоту (E).

Более конкретно, в изобретении предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой в CL-домене, примыкающем к представителю семейства лигандов TNF, аминокислота в положении 123 (EU-нумерация) заменена на аргинин (R) и аминокислота в положении 124 (EU-нумерация) заменена на лизин (K), и в которой в CH1-домене, примыкающем к представителю семейства лигандов TNF, аминокислоты в положении 147 (EU-нумерация) и положении 213 (EU-нумерация) заменены на глутаминовую кислоту (E).

Конкретные антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит

первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, обе образующие молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени,

первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слитого на его С-конце с помощью второго пептидного линкера со второй тяжелой или легкой цепью,

и второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF, слитый на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера со второй легкой или тяжелой цепью соответственно.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на его С-конце с CH1-доменом, который является частью тяжелой цепи, и второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CL-доменом, который является частью легкой цепи.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на его С-конце с помощью второго пептидного линкера с CL-доменом, который является частью тяжелой цепи, и второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CH1-доменом, который является частью легкой цепи.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на его С-конце с помощью второго пептидного линкера с VH-доменом, который является частью тяжелой цепи, и второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с VL-доменом, который является частью легкой цепи.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по пп.21-23 формулы изобретения, в которой в CL-домене, примыкающем к представителю семейства лигандов TNF, аминокислота в положении 123 (EU-нумерация) заменена на аргинин (R) и аминокислота в положении 124 (EU-нумерация) заменена на лизин (K), и в которой в CH1-домене, примыкающем к представителю семейства лигандов TNF, аминокислоты в положении 147 (EU-нумерация) и положении 213 (EU-нумерация) заменены на глутаминовую кислоту (E). Указанные модификации приводят к появлению так называемых заряженных остатков с предпочтительными свойствами, позволяющими избегать нежелательных воздействий, таких, например, как ошибочное спаривание.

Кроме того, предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, указанная в настоящем описании, антиген клетки-мишени которой выбирают из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), карциноэмбриональный антиген (CEA), CD19, CD20 и CD33.

Антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, антигеном клетки-мишени которых является FAP.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, антигеном клетки-мишени которой является фибробласт-активирующий белок (FAP).

NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, который содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, который содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, который содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, которая содержит

первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, обе образующие молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени,

вторую тяжелую цепь, содержащую два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, и слиты на С-конце с помощью второго пептидного линкера с CH1-доменом, и вторую легкую цепь, содержащую один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, слитую на ее С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CL-доменом, и где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и первую легкую цепь, которая содержит VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или

первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и первую легкую цепь, которая содержит VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 113, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 114.

Следующим конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, и где антигенсвязывающая молекула содержит первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, обе образующие молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, вторую тяжелую цепь, содержащую два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, соединенные друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слитые на С-конце с помощью второго пептидного линкера с CL-доменом, и вторую легкую цепь, содержащую один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, слитый на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CH1-доменом, и где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и первую легкую цепь, которая содержит VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или

первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и первую легкую цепь, которая содержит VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 173, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 174.

Более конкретно, предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, обе образующие молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, в которой первая тяжелая цепь содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и первая легкая цепь содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, и

(б) вторую тяжелую цепь, содержащую два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, соединенные друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слитые на его С-конце с помощью второго пептидного линкера с CL-доменом, и вторую легкую цепь, содержащую один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, слитый на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CH1-доменом, при этом вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119 или SEQ ID NO: 173 и вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120 или SEQ ID NO: 174. В частности, вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119 и вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

Кроме того, в изобретении предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, и

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит CH3-домен и второй полипептид содержит CH3-домен соответственно, и в которой первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с С-концом CH3-домена с помощью пептидного линкера, и в которой второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который соединен с помощью пептидного линкера с С-концом CH3-домена указанного полипептида.

В конкретном объекте изобретения указанная антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, содержит два фрагмента, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном клетки мишени.

Более конкретно, указанная антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, или

(II) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, или

(III) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая выбрана из группы, включающей:

а) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

б) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116;

в) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 100, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 101, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 102, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 103, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 104, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 105.

В конкретном объекте изобретения антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или

первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 355, и

(III) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 356.

Антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, антигеном клетки-мишени которых является CD19.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, антигеном клетки-мишени которой является CD19.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с CD19, содержит VH-домен, содержащий (I) CDR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195 или SEQ ID NO: 252, (II) CDR-H2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 253, и (III) CDR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197 или SEQ ID NO: 254, и VL-домен, содержащий (IV) CDR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198 или SEQ ID NO: 249, (V) CDR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199 или SEQ ID NO: 250, и (VI) CDR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200 или SEQ ID NO: 251.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с CD19 и содержит VH-домен, содержащий (I) CDR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195, (II) CDR-H2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196, и (III) CDR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197, и VL-домен, содержащий (IV) CDR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198, (V) CDR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199, и (VI) CDR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в изобретении, в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с CD19 и содержит VH-домен, содержащий (I) CDR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 252, (II) CDR-H2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 253, и (III) CDR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 254, и VL-домен, содержащий (IV) CDR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249, (V) CDR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250, и (VI) CDR-L3, который содержит аминокислотную последовательность NO: 251.

В другом объекте изобретения фрагмент, который обладает способностью специфически связываться с CD19, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 201, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 202.

В другом объекте изобретения фрагмент, который обладает способностью специфически связываться с CD19, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 357, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 358.

В другом объекте изобретения фрагмент, который обладает способностью специфически связываться с CD19, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, или фрагмент, который обладает способностью специфически связываться с CD19, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 358.

Другим объектом изобретения является предлагаемая в изобретении антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, который содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и

тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Другим объектом изобретения является предлагаемая в изобретении антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, который содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97 и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

Другим объектом изобретения является предлагаемая в изобретении антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, который содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 358, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Конкретным объектом изобретения является предлагаемая в изобретении антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, который содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 358, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97 и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые обе образуют молекулу Fab, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, вторую тяжелую цепь, содержащую два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагментов, соединенных друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слитых на С-конце с помощью второго пептидного линкера с CH1-доменом, и вторую легкую цепь, содержащую один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CL-доменом, и где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокис-

лотную последовательность SEQ ID NO: 202, или

первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 358,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 113, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 114.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит

первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые обе образуют молекулу Fab, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени,

вторую тяжелую цепь, содержащую два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагментов, соединенных друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слитых на С-конце с помощью второго пептидного линкера с CL-доменом, и вторую легкую цепь, содержащую один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который на слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CH1-доменом, и где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, или

первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 358,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 173, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 174.

Кроме того, изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени,

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит CH3-домен и второй полипептид содержит CH3-домен соответственно и в которой первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с С-концом CH3-домена с помощью пептидного линкера, и в которой второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, соединенный через пептидный линкер с С-концом CH3-домена указанного полипептида.

В конкретном объекте изобретения указанная антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, содержит два фрагмента, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном клетки мишени.

Более конкретно, указанная антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, или

(II) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, или

(III) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 309, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279, или

(IV) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 313, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность 279.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая выбрана из группы, включающей:

а) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, и

домен, содержащий (IV) CDR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324, (V) CDR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 325, и (VI) CDR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326.

Конкретным объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой молекулу Fab, которая обладает способностью специфически связываться с CEA и содержит VH-домен, содержащий (I) CDR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 321, (II) CDR-H2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 322, и (III) CDR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 323, и VL-домен, содержащий (IV) CDR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324, (V) CDR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 325, и (VI) CDR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326.

В другом объекте изобретения фрагмент, который обладает способностью специфически связываться с CEA, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 327, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 328.

В другом объекте изобретения фрагмент, который обладает способностью специфически связываться с CEA, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 327, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 328.

В другом объекте изобретения фрагмент, который обладает способностью специфически связываться с CEA, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 329, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 330.

В одном из объектов изобретения фрагмент, который обладает способностью специфически связываться с CEA, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330.

Другим объектом изобретения является предлагаемая в изобретении антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, который содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Другим объектом изобретения является предлагаемая в изобретении антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, который содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330, и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит

первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые обе образуют молекулу Fab, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени,

вторую тяжелую цепь, содержащую два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагментов, соединенных друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слитые на С-конце с помощью второго пептидного линкера с CH1-доменом, и вторую легкую цепь, содержащую один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который на слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CL-доменом, и где антигенсвязывающая молекула со-

держит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 113, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 114.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, где антигенсвязывающая молекула содержит

первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые обе образуют молекулу Fab, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени,

вторую тяжелую цепь, содержащую два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагментов, соединенных друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слитых на его С-конце с помощью второго пептидного линкера с CL-доменом, и вторую легкую цепь, содержащую один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, который на слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CH1-доменом, и где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330,

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 173, и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 174.

Кроме того, изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит:

(а) по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени,

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит CH3-домен и второй полипептид содержит CH3-домен соответственно и в которой первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, которые соединены друг с другом и с С-концом CH3-домена с помощью пептидного линкера, и в которой второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент, соединенный через пептидный линкер с С-концом CH3-домена указанного полипептида.

В конкретном объекте изобретения указанная антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, содержит два фрагмента, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном клетки мишени.

Более конкретно, указанная антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, или

(II) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая выбрана из группы, включающей:

а) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 333, первую легкую цепь,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116;

б) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 333, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118;

в) молекулу, которая содержит две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338;

г) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 333, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120;

д) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 333, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 173, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 174; и

е) молекулу, которая содержит две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342.

В частности, в изобретении предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 333, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

Полинуклеотиды.

Изобретение относится также к выделенным полинуклеотидам, которые кодируют антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, представленную в настоящем описании, или ее фрагмент.

Выделенные полинуклеотиды, которые кодируют антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемые в изобретении, можно экспрессировать в виде индивидуального полинуклеотида, который кодирует полную антигенсвязывающую молекулу, или в виде нескольких (например, двух или большего количества) совместно экспрессируемых полинуклеотидов. Полипептиды, кодируемые совместно экспрессируемыми полинуклеотидами, можно соединять, например, через дисульфидные связи или другими путями с образованием функциональной антигенсвязывающей молекулы. Например, часть иммуноглобулина, представляющая собой легкую цепь, может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, кодирующего часть, представляющую собой тяжелую цепь иммуноглобулина. При совместной экспрессии полипептиды тяжелой цепи должны связываться с полипептидами легкой цепи с образованием иммуноглобулина.

В некоторых объектах изобретения выделенный полинуклеотид кодирует описанную полную антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемую в изобретении. В частности, выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, содержащийся в описанной антигенсвязывающей молекуле, которая содержит тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении.

Одним из объектов настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, который кодирует антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, где полинуклеотид содержит: (а) последовательность, которая кодирует фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, (б) последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или два их фрагмента, которые соединены друг с другом с помощью пептидного линкера, и (в) последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент.

Другим объектом изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд для 4-1BB, где полинуклеотид содержит: (а) последовательность, которая кодирует фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, (б) последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий два эктодомена 4-1BBL или два его фрагмента, которые соединены друг с другом с помощью пептидного линкера, и (в) последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий один эктодомен 4-1BBL или его фрагмент.

Другим объектом изобретения является выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий два фрагмента 4-1BBL, которые содержат аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 90, 95, 98 или 100% аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 96, и полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий один фрагмент 4-1BBL, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 90, 95, 98 или 100% аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 96.

Кроме того, предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд для OX40, где полинуклеотид содержит: (а) последовательность, которая кодирует фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, (б) последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий два эктодомена OX40L или два его фрагмента, которые соединены друг с другом с помощью пептидного линкера, и (в) последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий один эктодомен OX40L или его фрагмент.

Другим объектом изобретения является выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий два фрагмента 4-1BBL, которые содержат аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 90, 95, 98 или 100% аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, и полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий один фрагмент 4-1BBL, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 90, 95, 98 или 100% аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54.

Другими объектами изобретения являются полинуклеотиды, содержащие последовательность, которая по меньшей мере примерно на 90, 95, 98 или 100% идентична конкретным кДНК-последовательностям, указанным в настоящем описании. Конкретным объектом изобретения является полинуклеотид, содержащий последовательность, которая идентична одной из конкретных кДНК-последовательностей, указанных в настоящем описании.

В других объектах изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 5, 6, 97, 98, 99, 183, 184 или 185. В другом объекте изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 14, 15, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 173 или 174.

В следующих объектах изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 66, 67, 68, 69, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 137, 138, 141, 142, 143, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 162, 163, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 203, 204, 207, 208, 211, 212, 215, 216, 273, 274, 277, 278, 281, 282, 285, 286, 289, 290, 293, 294, 297, 298, 301, 302, 305, 307, 308, 311, 312, 315, 316, 331, 332, 335, 336, 339, 340, 343, 344, 347, 348, 353 или 354.

В некоторых объектах изобретения полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В других вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой РНК, например, в форме матричной РНК (мРНК). РНК, предлагаемая в настоящем изобретении, может быть одноцепочечной или двухцепочечной.

Методы рекомбинации.

Антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемые в изобретении, можно получать, например, путем твердофазного пептидного синтеза (например, твердофазный синтез Меррифилда) или методом рекомбинации. Для рекомбинантного получения один или несколько полинуклеотидов, кодирующих антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, или ее полипептидные фрагменты, например описанные выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанный полинуклеотид можно легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур. Одним из объектов изобретения является вектор, предпочтительно экспрессионный вектор, содержащий один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Методы, хорошо известные специалистам в данной области, можно применять для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующую последовательность антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF (фрагмента), наряду с приемлемыми контролирующими транскрипцию/трансляцию сигналами. Эти методы включают технологии рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и рекомбинации/генетической рекомбинации *in vivo* (см., например, методы, описанные у Maniatis и др., Maniatis и др., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; и Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, изд-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989). Экспрессионный вектор может представлять собой часть плазмиды, вируса или может представлять собой фрагмент нуклеиновой кислоты. Экспрессионный вектор включает кассету экспрессии, в которой полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, или ее полипептидные фрагменты (т.е. кодирующую область), клонируют с обеспечением функциональной связи с промотором и/или другими элементами, контролирующими транскрипцию или трансляцию. В контексте настоящего описания "кодирующая область" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, он, в случае его присутствия, может рассматриваться как часть кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, 5'- и 3'-нетранслируемые области и т.п., не являются частью кодирующей области. Две или большее количество кодирующих областей может присутствовать в индивидуальной полинуклеотидной конструкции, например индивидуальном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например отдельных (различных) векторах. Кроме того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может содержать две или большее количество кодирующих областей, например вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, может кодировать один или несколько полипептидов, которые пост- или котрансляционно разделяются на конечные белки посредством протеолитического расщепления. Кроме того, вектор, поли-

нуклеотид или нуклеиновая кислота, предлагаемый/предлагаемая в изобретении, может кодировать гетерологичные кодирующие области, либо слитые, либо не слитые с полинуклеотидом, который кодирует антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, или ее полипептидные фрагменты, предлагаемые в изобретении, или их варианты или производные. Гетерологичные кодирующие области включают (но, не ограничиваясь только ими) специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен. Функциональная связь имеет место, когда кодирующая область генного продукта, например полипептида, ассоциирована с одной или несколькими регуляторными последовательностями таким образом, чтобы экспрессия генного продукта находилась под воздействием или контролем регуляторной(ых) последовательности(ей). Два ДНК-фрагмента (таких как кодирующая область полипептида и ассоциированный с ней промотор) являются "функционально связанными", если индукция промоторной функции приводит к транскрипции мРНК, кодирующей требуемый генный продукт, и если природа связи между двумя ДНК-фрагментами не оказывает воздействия на способность регулирующих экспрессию последовательностей направлять экспрессию генного продукта, или не оказывает воздействия на способность ДНК-матрицы к транскрипции. Таким образом, промоторная область должна быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор обладает способностью осуществлять транскрипцию нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять собой специфический для клетки промотор, который обеспечивает значительную транскрипцию ДНК только в предварительно отобранных клетках. Другие контролирующие транскрипцию элементы, помимо промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, можно функционально связывать с полинуклеотидом для обеспечения специфической для клетки транскрипции.

Приемлемые промоторы и другие контролирующие транскрипцию области представлены в настоящем описании. Специалистам в данной области известно широкое разнообразие контролирующих транскрипцию областей. Они включают (но, не ограничиваясь только ими) контролирующие транскрипцию области, которые функционируют в клетках позвоночных животных, такие как (но, не ограничиваясь только ими) сегменты промоторов и энхансеров из цитомегаловирусов (например, немедленно-ранний промотор в сочетании с интроном-А), обезьяньего вируса 40 (например, ранний промотор) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). Другие контролирующие транскрипцию области включают области, выведенные из генов позвоночных животных, таких как ген актина, белка теплового шока, бычьего гормона роста и кроличьего Р-глобина, а также другие последовательности, которые могут контролировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительные приемлемые контролирующие транскрипцию области включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также индуцибельные промоторы (например, промоторы, индуцируемые тетрациклинами). Аналогично этому, обычным специалистам в данной области известно широкое разнообразие контролирующих трансляцию элементов. Они включают (но, не ограничиваясь только ими) сайты связывания рибосом, кодоны инициации трансляции и терминирующие кодоны и элементы, выведенные из вирусных систем (в частности внутренний сайт связывания (посадки) рибосом или IRES, который обозначают также как CITE-последовательность). Кассета экспрессии может включать также другие характерные структуры, такие как сайт инициации репликации и/или интегрированные в хромосому элементы, такие как длинные концевые повторы (LTR) ретровирусов, или инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

Кодирующие области полинуклеотида и нуклеиновой кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть ассоциированы с дополнительными кодирующими областями, которые кодируют секреторные или сигнальные пептиды, которые направляют секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом, предлагаемым в настоящем изобретении. Например, если требуется секреция антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, или ее полипептидных фрагментов, то ДНК, кодирующую сигнальную последовательность, можно помещать против хода транскрипции относительно нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, или ее полипептидные фрагменты. Согласно гипотезе, касающейся сигналов, белки, секретлируемые клетками млекопитающих, имеют сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, который/которая отщепляется от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Обычным специалистам в данной области должно быть очевидно, что полипептиды, секретлируемые клетками позвоночных животных, как правило, имеют сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от транслируемого полипептида с образованием секретлируемой или "зрелой" формы полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют нативный сигнальный пептид, например сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина или функциональное производное указанной последовательности, которое сохраняет способность обеспечивать секрецию полипептида, функционально связанного с ним. Альтернативно этому, можно применять гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или его функциональное производное. Например, лидерную последовательность дикого типа можно заменять на лидерную последовательность человеческого тканевого активатора плазминогена (ТРА) или мышинной β -глюкуронидазы.

ДНК, кодирующую короткую белковую последовательность, которую можно применять для облег-

чения дальнейшей очистки (например, гистидиновую метку), или предназначенную для мечения слитого белка, можно включать внутрь или на концы полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, или ее полипептидные фрагменты.

Дополнительным объектом изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько векторов, предлагаемых в изобретении. Полинуклеотиды и векторы могут обладать любыми особенностями, индивидуально или в сочетании, указанными в настоящем описании касательно полинуклеотидов и векторов соответственно. В одном из объектов изобретения клетка-хозяин содержит (например, трансформирована или трансфектирована) вектор, содержащий полинуклеотид, который кодирует антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемую в изобретении (или ее часть). В контексте настоящего описания понятие "клетка-хозяин" относится к любому типу клеточной системы, которую можно конструировать для получения слитых белков, предлагаемых в изобретении, или их фрагментов. Клетки-хозяева, пригодные для репликации и для поддержания экспрессии антигенсвязывающих молекул, хорошо известны в данной области. Такие клетки можно трансфектировать или трансдуцировать соответствующим образом конкретным экспрессионным вектором и можно выращивать большее количество содержащих вектор клеток с целью внесения в ферментеры для крупномасштабных процессов получения антигенсвязывающей молекулы в достаточных для клинических применений количествах. Приемлемыми клетками-хозяевами являются прокариотические микроорганизмы, такие как *E.coli*, или различные эукариотические клетки, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки насекомых или т.п. Например, полипептиды можно получать в бактериях, в частности, когда отсутствует потребность в гликозилировании. После экспрессии полипептид можно выделять из пасты бактериальных клеток в растворимую фракцию и можно дополнительно очищать. Помимо прокариот, в качестве хозяев для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют полипептид, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были "гуманизированы", что позволяет получать полипептид с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215).

Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии (гликозилированных) полипептидов, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные бакуловирусные штаммы и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, US № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях). В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных животных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью SV40 (C0S-7); линия клеток почки эмбриона человека (293 или клетки линии 293, субклонированные с целью выращивания в суспензионной культуре, Graham и др., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4-клетки, описанные, например, у Mather, *Biol. Reprod.*, 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая dhfr⁻-CHO-клетки (Urlaub и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0, P3X63 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства белка, см., например, у Yazaki и Wu, в: *Methods in Molecular Biology* под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например культивируемые клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки бактерий и клетки растений (но не ограничиваясь только ими), а также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного, трансгенного растения или культивируемой растительной или животной ткани. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, предпочтительно клетку млекопитающего, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO), клетка почки человеческого эмбриона (HEK) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20). В данной области известны стандартные технологии для экспрессии чужеродных генов в этих системах. Клетки, экспрессирующие полипептид, содержащий либо тяжелую, либо легкую цепь иммуноглобулина, можно конструировать таким образом, чтобы в них происходила экспрессия других цепей иммуноглобулина, например,

таким образом, чтобы экспрессируемый продукт представлял собой иммуноглобулин, который имеет как тяжелую, так и легкую цепь. Одним из объектов изобретения является способ получения антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, или ее полипептидных фрагментов, где способ заключается в том, что культивируют клетку-хозяина, содержащую полинуклеотиды, которые кодируют антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемую в изобретении, или ее полипептидные фрагменты, представленные в настоящем описании, в условиях, пригодных для экспрессии антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, или ее полипептидных фрагментов, и выделяют антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемую в изобретении, или ее полипептидные фрагменты из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

В антигенсвязывающей молекуле, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, компоненты (по меньшей мере один фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, один полипептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты, и полипептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF или его фрагмент) не сливают генетически друг с другом. Полипептиды создают так, что их компоненты (два эктодомена представителя семейства лигандов TNF или их фрагменты и другие компоненты, такие как CH или CL) были слиты друг с другом непосредственно или через линкерную последовательность. Состав и длину линкера можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области, и можно оценивать эффективность. Примеры линкерных последовательностей, расположенных между различными компонентами антигенсвязывающих молекул, представлены в приведенных в настоящем описании последовательностях. Можно включать также дополнительные последовательности для встраивания сайта расщепления, если требуется разделение индивидуальных компонентов слитого белка, например последовательность, распознаваемую эндопептидазой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагменты, обладающие способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени (например, Fab-фрагменты), образующие часть антигенсвязывающей молекулы, содержат, по меньшей мере, вариабельную область иммуноглобулина, которая обладает способностью связываться с антигеном. Вариабельные области могут образовывать часть встречающихся в естественных условиях или не встречающихся в естественных условиях антител или их фрагментов или могут быть получены из них. Методы получения поликлональных антител и моноклональных антител хорошо известны в данной области (см., например, Harlow и Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Не встречающиеся в естественных условиях антитела можно создавать с помощью твердофазного пептидного синтеза, можно получать с помощью методов рекомбинации (например, описанных в US № 4186567) или можно получать, например, путем скрининга комбинаторных библиотек, содержащих вариабельные области тяжелых цепей и вариабельные области легких цепей (см., например, US № 5969108 на имя McCafferty).

Согласно изобретению можно использовать иммуноглобулин из любого вида животного. Примерами иммуноглобулинов, которые можно применять согласно настоящему изобретению, являются (но, не ограничиваясь только ими) конструкции, полученные из организма мышей, приматов или человека. Если слитый белок предназначен для применения на человеке, то можно использовать химерную форму иммуноглобулина, в которой константные области иммуноглобулина получают из человеческого антитела. Гуманизированную или полностью человеческую форму иммуноглобулина можно получать также с помощью методов, хорошо известных в данной области (см., например, US № 5565332 на имя Winter). Для осуществления гуманизации можно применять различные методы, такие как (но, не ограничиваясь только ими): (а) трансплантация нечеловеческих (например, из антитела-донора) CDR в человеческий (например, антитело-реципиент) каркасный участок и константные области, сохраняющие или не сохраняющие имеющие решающее значение остатки каркасного участка (например, остатки, важные для сохранения хорошей антигенсвязывающей аффинности или функций антитела), (б) трансплантация только нечеловеческих определяющих специфичность участков (SDR или a-CDR; остатки имеют решающее значение для взаимодействия антитело-антиген) в человеческие каркасные и константные области, или (в) трансплантация полных нечеловеческих вариабельных доменов, но их "маскировка" напоминающим человеческий сегментом путем замены поверхностных остатков. Обзор гуманизированных антител и методов их получения см., например, у Almagro и Fransson, *Front Biosci* 13, 12008, сс. 1619-1633, и они описаны также, например, у Riechmann и др., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; US, № 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Jones и др., *Nature* 321, 1986, сс. 522-525; Morrison и др., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison и Oi, *Adv. Immunol.* 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeven и др., *Science* 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, *Molec. Immun.* 31(3), 1994, сс. 169-217; Kashmiri и др., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34 (описание трансплантации SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28, 1991, сс. 489-498 (описание метода изменения поверхности ("повторное покрытие")); Dall'Acqua и др., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (описание "перестановки FR") и Osbourn и др., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68, и Klimka и др., *Br. J. Cancer.* 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода на основе "целенаправленной селекции" для перестановки FR). Конкретные иммуноглобулины, предлагаемые в

изобретении, представляют собой человеческие иммуноглобулины. Человеческие антитела и человеческие вариабельные области можно получать с помощью различных методик, известных в данной области. Человеческие антитела описаны в целом, у van Dijk и van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 2001, сс. 368-374 и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20, 2008, сс. 450-459. Человеческие вариабельные области могут образовывать часть человеческих моноклональных антител или могут быть получены из них с помощью метода гибридом (см., например, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63). Человеческие антитела и человеческие вариабельные области можно получать также путем введения иммуногена трансгенному животному, которое модифицировано таким образом, что может продуцировать интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими вариабельными областями в ответ на контрольное заражение антигеном (см., например, Lonberg, *Nat. Biotech.* 23, 2005, сс. 1117-1125). Человеческие антитела и человеческие вариабельные области можно создавать также путем выделения последовательностей вариабельных областей Fv-клона, отобранных из человеческих фаговых дисплейных библиотек (см., например, Hoogenboom и др. в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. O'Brien и др., изд-во Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37); и McCafferty и др., *Nature* 348, 552-554; Clackson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628). Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv-(scFv)-фрагментов, либо в виде Fab-фрагментов.

В некоторых объектах изобретения фрагменты, обладающие способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени (например, Fab-фрагменты), входящие в антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, создают так, чтобы они обладали повышенной аффинностью связывания согласно методам, описанным, например, в публикации PCT WO 2012/020006 (см. примеры, в которых описано созревание аффинности) или в опубликованной заявке на патент U.S. № 2004/0132066. Способность антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, связываться со специфической антигенной детерминантой можно оценивать количественно либо с помощью твердофазного ферментного анализа (ELISA), либо другими методиками, известными специалисту в данной области, например с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (Liljeblad и др., *Glyco J.* 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, *Endocr. Res.* 28, 2002, сс. 217-229). Анализы в условиях конкуренции можно применять для идентификации антигенсвязывающей молекулы, конкурирующей с референс-антителом за связывание с конкретным антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная конкурирующая антигенсвязывающая молекула связывается с тем же самым эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается антигенсвязывающая референс-молекула. Подробные приведенные в качестве примеров методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены у Morris, "Epitope Mapping Protocols", в *Methods in Molecular Biology*, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996. При осуществлении приведенного в качестве примера анализа в условиях конкуренции иммобилизованный антиген инкубируют в растворе, содержащем первую меченую антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с антигеном, и вторую немеченую антигенсвязывающую молекулу, которая подлежит тестированию в отношении ее способности конкурировать с первой антигенсвязывающей молекулой за связывание с антигеном. Вторая антигенсвязывающая молекула может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный антиген инкубируют в растворе, содержащем первую меченую антигенсвязывающую молекулу, но не содержащем вторую немеченую антигенсвязывающую молекулу. После инкубации в условиях, обеспечивающих связывание первого антитела с антигеном, избыток несвязанного антитела удаляют и оценивают количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном, существенно снижено в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что вторая антигенсвязывающая молекула конкурирует с первой антигенсвязывающей молекулой за связывание с антигеном (см. Harlow и Lane. *Antibodies: A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, гл. 14, 1988).

Антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд TNF, предлагаемые в изобретении, полученные с помощью представленных в настоящем описании методов, можно очищать с использованием известных в данной области методик, таких как жидкостная хроматография высокого разрешения, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, гель-фильтрация и т.п. Фактические условия, применяемые для очистки конкретного белка, зависят, в частности, от таких факторов, как чистый заряд, гидрофобность, гидрофильность и т.д., и они должны быть очевидны специалисту в данной области. Для очистки антитела с помощью аффинной хроматографии можно использовать лиганд, рецептор или антиген, с которым связывается антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд TNF. Например, для очистки с помощью аффинной хроматографии слитых белков, предлагаемых в изобретении, можно использовать матрикс с белком А или белком G. Последовательное применение аффинной хроматографии на белке А или G и гель-фильтрации можно применять для выделения антигенсвязывающей молекулы практически согласно методу, описанному в разделе "Примеры". Чистоту антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд TNF, или ее фрагментов можно определять с помощью любого из широкого разнообразия хорошо известных аналитических методов,

включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т.п. Например, установлено, что антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд TNF, которые экспрессировали с помощью методов, которые описаны в разделе "Примеры", являются интактными и правильно собранными, что продемонстрировано с помощью ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях и невосстанавливающих условиях.

Анализы.

Антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно идентифицировать, подвергать скринингу или характеризовать их физические/химические свойства и/или виды биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области.

1) Анализ аффинности.

Аффинность антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, к соответствующему TNF-рецептору можно определять с помощью методов, изложенных в разделе "Примеры", с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя стандартную инструментальную базу, например устройство BIAcore (фирма GE Healthcare) и рецепторы или белки-мишени, которые можно получать с помощью рекомбинантной экспрессии. Аффинность антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, к антигену клетки-мишени можно определять с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя стандартную инструментальную базу, например устройство BIAcore (фирма GE Healthcare) и рецепторы или белки-мишени, которые можно получать с помощью рекомбинантной экспрессии. Конкретный иллюстративный и приведенный в качестве примера вариант измерения аффинности связывания описан в примере 4. Согласно одному из объектов изобретения величину K_D измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса с помощью устройства BIAcore® T100 (фирма GE Healthcare) при 25°C.

2) Анализ связывания и другие анализы.

Связывание антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, представленной в настоящем описании, с соответствующими экспрессируемыми клетками рецепторами, можно оценивать с использованием клеточных линий, экспрессирующих конкретный рецептор или антиген-мишень, например, с помощью проточной цитометрии (FACS). В одном из объектов изобретения в анализах связывания использовали свежeweделенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), экспрессирующие TNF-рецептор. Указанные клетки применяли непосредственно после выделения (наивные PMBC) или после стимуляции (активированные PMBC). В другом объекте изобретения применяли активированные мышинные спленоциты (экспрессирующие молекулу TNF-рецептора) для демонстрации связывания антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, с соответствующими экспрессирующими TNF-рецептор клетками.

В другом объекте изобретения применяли линии раковых клеток, экспрессирующих антиген клетки-мишени, например FAP, для демонстрации связывания антигенсвязывающих молекул с антигеном клетки-мишени.

В другом объекте изобретения можно применять анализы в условиях конкуренции для идентификации антигенсвязывающей молекулы, которая конкурирует с конкретным антителом или антигенсвязывающей молекулой за связывание с мишенью или TNF-рецептором соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная конкурирующая антигенсвязывающая молекула связывается с тем же самым эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается специфическое антитело к мишени или специфическое антитело к TNF-рецептору. Подробные приведенные в качестве примеров методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены у Morris, "Epitope Mapping Protocols", в Methods in Molecular Biology, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996.

3) Анализ активности.

Одним из объектов изобретения являются анализы, предназначенные для идентификации антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, которые связываются со специфическим антигеном клетки-мишени или со специфическим TNF-рецептором, которые обладают биологической активностью. Биологическая активность может включать, например, агонистическую передачу сигнала через TNF-рецептор на клетках, которые экспрессируют антиген клетки-мишени. Предложены также антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, которые идентифицированы с помощью анализов как обладающие биологической активностью *in vitro*.

В некоторых объектах изобретения антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, тестируют в отношении указанной биологической активности. Анализы оценки биологической активности молекул, предлагаемых в изобретении, описаны в примере 6. Кроме того, анализы для детекции клеточного лизиса (например, путем измерения высвобождения ЛДГ), кинетики индукции апоптоза (например, путем измерения активности каспазы 3/7) или апоптоза (например, с использованием TUNEL-анализа) хорошо известны в данной области. Кроме того, биологическую активность указанных комплексов можно оценивать по их воздействию на выживаемость, пролиферацию и секрецию лимфокинов различными субпопуляциями лимфоцитов, такими как NK-клетки, NKT-клетки или

γδТ-клетки, или оценивать их способность модулировать фенотип и функцию антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки, моноциты/макрофаги или В-клетки.

Фармацевтические композиции, препаративные формы и пути введения.

Следующим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, представленных в настоящем описании, например предназначенные для применения в любом из указанных ниже терапевтических способов. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любую из антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любую из антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, представленных в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, указанное ниже.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат в терапевтически эффективном количестве одну или несколько антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, которая(ые) растворена(ы) или диспергирована(ы) в фармацевтически приемлемом носителе. Понятия "фармацевтически или фармакологически приемлемый" относится к молекулярным субстанциям и композициям, которые, в целом, нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях, т.е. не вызывают вредные, аллергические или другие нежелательные реакции при введении при необходимости животному, такому, например, как человек. Приготовление фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере одну антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, и необязательно дополнительное действующее вещество, должно быть очевидно специалистам в данной области в свете настоящего описания, например, из справочника Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенного в настоящее описание в качестве ссылки. В частности, композиции представляют собой лиофилизированные препаративные формы или водные растворы. В контексте настоящего описания "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, буферы, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибные агенты), агенты для придания изотоничности, соли, стабилизаторы и их комбинации, которые должны быть известны обычному специалисту в данной области.

Парентеральные композиции включают композиции, созданные для введения путем инъекции, например подкожной, внутрикожной, внутрь повреждения, внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, подоболочечной или внутрибрюшинной инъекции. Для инъекции антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемые в изобретении, можно включать в препаративные формы в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический соляной буфер. Раствор может содержать предназначенные для получения препаративной формы агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно этому, слитые белки могут находиться в порошкообразной форме, предназначенной для восстановления перед применением приемлемым наполнителем, например, стерильной не содержащей пирогенов водой. Стерильные инъекционные растворы приготавливают путем включения слитых белков, предлагаемых в изобретении, в требуемом количестве в соответствующий растворитель при необходимости в сочетании с различными другими ингредиентами, перечисленными ниже. Стерильность можно легко обеспечивать, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных действующих веществ в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и/или другие ингредиенты. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, суспензий или эмульсий предпочтительными методами получения являются вакуумная сушка или сушка вымораживанием, которые позволяют получать порошок действующего вещества в сочетании с любым дополнительным требуемым ингредиентом из предварительно стерилизованной фильтрацией жидкой среды. При необходимости жидкая среда перед осуществлением инъекции должна быть соответствующим образом забуферена и жидкому разбавителю сначала придана изотоничность с помощью достаточного количества соляного раствора или глюкозы. Композиция должны быть стабильной в условиях приготовления и хранения и защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Принято поддерживать загрязнение эндотоксинами на минимальном безопасном уровне, например менее 0,5 нг/мг белка. Пригодные фармацевтически приемлемые носители включают (но, не ограничиваясь только ими): буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид; бензетонийхлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол, резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и

другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Водные суспензии для инъекций могут содержать соединения, которые повышают вязкость суспензии, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, сорбит, декстран или т.п. Необязательно суспензия может содержать также стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость соединений, что позволяет получать высококонцентрированные растворы. Кроме того, суспензии действующих веществ можно получать в виде соответствующих масляных предназначенных для инъекции суспензий. Приемлемые липофильные растворители или наполнители включают жирные нелетучие масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеаты или триглицериды, или липосомы.

Действующие вещества можно заключать в микрокапсулы, например, полученные с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например в гидроксипропилметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (18-е изд., изд-во Mack Printing Company, 1990). Приемлемыми примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие полипептид, такие матрицы представляют собой изделия определенной формы, например пленки или микрокапсулы. В конкретном варианте осуществления изобретения для достижения пролонгированной абсорбции инъектируемой композиции можно применять в композиции агенты, замедляющие абсорбцию, такие, например, как моностеарат алюминия, желатин или их комбинации.

В контексте настоящего описания фармацевтически приемлемые носители включают также диспергирующие агенты интерстициальных лекарственных средств, такие как растворимые активные в нейтральной среде гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, фирма Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и методы их применения, в том числе gHuPH20, описаны в публикациях патентов США 2005/0260186 и 2006/0104968. Согласно одному из объектов изобретения sHASEGP объединяют с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликанами, такими как хондроитиназы.

Примеры лиофилизированных композиций антител описаны в US № 6267958. Водные композиции антител включают композиции, описанные в № US 6171586 и WO 2006/044908, последние композиции включают гистидин-ацетатный буфер.

Помимо описанных выше композиций, слитые белки можно приготавливать также в виде препарата в форме депо. Указанные препаративные формы длительного действия можно применять путем имплантации (например, подкожной или внутримышечной) или внутримышечной инъекции. Так, например, слитые белки можно включать в препаративные формы в сочетании с приемлемыми полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменными смолами, или в виде умеренно растворимых производных, например, умеренно растворимой соли.

Фармацевтические композиции, содержащие слитые белки, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать с помощью общепринятых процессов смешения, растворения, эмульгирования, капсулирования, захвата или лиофилизации. Фармацевтические композиции можно включать в препаративные формы с помощью общепринятого метода с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ, которые облегчают обработку белков, с получением препаратов, которые можно применять в фармацевтических целях. Соответствующая форма зависит от выбранного пути введения.

Антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерные лиганды семейства TNF, можно включать в композиции в виде свободной кислоты или свободного основания, в нейтральной форме или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли представляют собой соли, которые практически сохраняют биологическую активность свободной кислоты или свободного основания. Они включают кислотнo-аддитивные соли, например соли, образованные со свободными аминoгруппами белковой композиции, или образованные с неорганическими кислотами, такими, например, как соляная или фосфорная кислота, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота. Соли, образованные со свободной карбоксильной группой, можно получать также из неорганических оснований, таких, например, как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа; или таких органических оснований как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин. Фармацевтические соли имеют тенденцию к более высокой растворимости в водных и других протонных растворителях по сравнению с соответствующими формами в виде свободных оснований.

Композиция, представленная в настоящем описании, может содержать также более одного действующего вещества, если это необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно вещества с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Такие действующие вещества должны присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для решения поставленной задачи.

Композиции, предназначенные для применения *in vivo*, как правило, должны быть стерильными. Это легко можно осуществлять путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Способы и композиции для терапевтического применения.

Любую из антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, представленных в настоящем описании, можно применять в терапевтических способах.

Для применения в терапевтических способах антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемые в изобретении, можно включать в состав препаративных форм, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину заболевания, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам.

Одним из объектов изобретения являются антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в качестве лекарственного средства. Следующими объектами изобретения являются антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения при лечении заболевания, прежде всего для применения для лечения рака. Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в способе лечения. Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, которая представлена в настоящем описании, предназначенная для применения при лечении заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. Некоторыми объектами изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предназначенная для применения в способе лечения индивидуума, который имеет заболевание, заключающемся в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве слитый белок. В некоторых объектах изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. Примеры видов рака включают солидные опухоли, рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак матки, рак шейки матки, рак эндометрия, рак пищевода, рак ободочной кишки, колоректальный рак, ректальный рак, рак желудка, рак предстательной железы, рак крови, рак кожи, плоскоклеточную карциному, рак кости и рак почки, меланому, В-клеточную лимфому, В-клеточный лейкоз, неходжжескую лимфому и острый лимфобластный лейкоз. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. Таким образом, предложены антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, указанные в настоящем описании, для применения для лечения рака. Субъект, пациент или "индивидуум", нуждающийся в лечении, как правило, представляет собой млекопитающее, более конкретно человека.

Другим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, указанная в настоящем описании, для применения для лечения инфекционных заболеваний, в частности, для лечения вирусных инфекций. Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, указанная в настоящем описании, для применения для лечения аутоиммунных заболеваний, таких, например, как волчанка.

Одним из объектов изобретения является антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, указанная в настоящем описании, для применения для лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), рака молочной железы, колоректального рака (CRC), рака поджелудочной железы (PAC), рака желудка, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и мезотелиомы, когда антиген клетки-мишени представляет собой FAP.

Одним из объектов изобретения является применение антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, для производства или приготовления лекарственного средства, которое предназначено для лечения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом. В одном из объектов изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения заболевания, заключающемся в том, что вводят индивидууму, который имеет заболевание, в терапевтически эффективном количестве лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение, прежде всего рак. Таким образом, одним из объектов изобретения является применение антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, для производства или приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака. Примеры видов рака включают солидные опухоли, рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак матки, рак шейки матки, рак эндометрия, рак пищевода, рак ободочной кишки, колоректальный рак, ректальный рак, рак желудка, рак предстательной железы, рак крови, рак кожи, плоскоклеточную карциному, рак кости и рак почки, меланому, В-клеточную лимфому, В-клеточный лейкоз, неходжжескую лимфому и острый лимфобластный лейкоз. Другие нарушения клеточной пролиферации, которые можно лечить с использо-

ванием антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в настоящем изобретении, включают (но, не ограничиваясь только ими) неоплазмы, локализованные в: животе, кости, молочной железе, пищеварительной системе, печени, поджелудочной железе, брюшине, эндокринных железах (надпочечник, парашитовидная, гипофиз, яички, яичник, тимус, щитовидная), глазу, голове и шеи, нервной системе (центральной и периферической), лимфатической системе, тазовой области, коже, мягкой ткани, селезенке, грудном отделе и мочеполовой системе. Также под объем изобретения подпадают предраковые состояния или повреждения и метастазы рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбирают из группы, включающей почечно-клеточный рак, рак кожи, рак легкого, колоректальный рак, рак молочной железы, рак головного мозга, рак головы и шеи. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что в некоторых случаях антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, не может обеспечивать исцеление, а может только оказывать частичное благоприятное воздействие. В некоторых вариантах осуществления изобретения физиологические изменения, характеризующиеся некоторым благоприятным действием, рассматриваются также как терапевтически ценные. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения количество антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, которое обеспечивает физиологическое изменение, рассматривается как "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество".

Другим объектом изобретения является применение антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, указанной в настоящем описании, для производства или приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения инфекционных заболеваний, в частности для лечения вирусных инфекций или для лечения аутоиммунных заболеваний, таких, например, как волчанка.

Следующим объектом изобретения является способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемую в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения указанному индивидууму вводят композицию, которая содержит слитый белок, предлагаемый в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В некоторых объектах изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В конкретном объекте изобретения заболевание представляет собой рак. В некоторых объектах изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой млекопитающее, предпочтительно человека.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении (при ее применении индивидуально или в сочетании с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами), должна зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, пути введения, веса тела пациента, типа слитого белка, серьезности и течения заболевания, от того, вводят ли слитый белок в превентивных или терапевтических целях, предшествующих или осуществляемых одновременно терапевтических вмешательств, истории болезни пациента и ответа на слитый белок и от предписания лечащего врача. Практикующий специалист, ответственный за введение, в любом случае, должен определять концентрацию действующего(их) вещества(в) в композиции и соответствующую(ие) дозу(ы) для индивидуального пациента. Различные схемы введения доз включают (но, не ограничиваясь только ими) однократное введение или несколько введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

Антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, можно вводить пациенту в виде одной обработки или серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания возможная начальная доза антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, для введения пациенту, например, с использованием одного или нескольких индивидуальных введений или с помощью непрерывной инфузии, может составлять примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг). Типичная суточная доза может составлять от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от отмеченных выше факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или более продолжительного периода в зависимости от состояния лечение, как правило, должно продолжаться до достижения требуемого подавления имеющихся симптомов заболевания. В качестве примера, доза слитого белка может составлять от примерно 0,005 до примерно 10 мг/кг. В другом примере (но, не ограничиваясь только указанным) доза на одно введение может составлять от примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 мкг/кг веса тела, примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 до примерно 1000 мг/кг веса тела или более, и находится в любом указанном диапазоне. В качестве примеров (но, не ограничиваясь только ими) указанного диапазона значений, можно вводить от примерно 5 до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 5 мкг/кг веса тела до примерно 500 мг/кг веса тела и т.д. с учетом указанных выше уровней доз. Так, пациенту можно вводить одну или не-

сколько доз, составляющих примерно 0,5, 2,0, 5,0 или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить прерывисто, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, чтобы пациент получал от примерно двух до примерно двадцати или, например, примерно шесть доз слитого белка). Можно вводить начальную более высокую ударную дозу, после которой применять одну или несколько более низких доз. Однако можно использовать другие схемы введения доз. Успех такой терапии легко оценивать с помощью общепринятых методик и анализов.

Антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемую в изобретении, как правило, следует применять в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. При применении для лечения или предупреждения болезненного состояния антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемые в изобретении, или их фармацевтические композиции, вводят или применяют в терапевтически эффективном количестве. Определение терапевтически эффективного количества находится в компетенции специалистов в данной области, прежде всего в свете представленного подробного описания изобретения.

Для системного введения терапевтически эффективную дозу можно сначала определять с помощью анализов *in vitro*, например анализов с использованием клеточных культур. Затем дозу можно включать в форму для изучения на животных моделях для достижения концентрации в кровотоке, находящейся в диапазоне, включающем значение IC_{50} , определенное на клеточной культуре. Указанную информацию можно использовать для более точного определения доз, которые можно применять на людях.

Начальные дозы можно оценивать также, исходя из данных, полученных *in vivo*, например, на животных моделях, используя методики, хорошо известные в данной области. Обычный специалист в данной области легко может оптимизировать применение на людях на основе данных, полученных на животных.

Уровень доз и интервал можно регулировать индивидуально для получения уровней в плазме антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, которые являются достаточными для поддержания терапевтического действия. Обычные дозы, предназначенные для введения пациенту путем инъекции, составляют от примерно 0,1 до 50 мг/кг/день, как правило, от примерно 0,5 до 1 мг/кг/день. Для достижения терапевтически эффективных уровней в плазме можно вводить несколько доз каждый день. Уровни в плазме можно оценивать, например, с помощью ЖХВР.

В случаях местного применения или избирательного поглощения эффективная местная концентрация антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, может не соответствовать концентрации в плазме. Специалист в данной области может оптимизировать терапевтически эффективные местные дозы без чрезмерных экспериментов.

Применение в терапевтически эффективной дозе антигенсвязывающих молекул, содержащих тримерный лиганд семейства TNF, представленных в настоящем описании, должно, как правило, обеспечивать терапевтическую пользу, не вызывая существенной токсичности. Токсичность и терапевтическую эффективность слитого белка можно определять с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных. Анализы на клеточных культурах или опыты на животных можно применять для определения значений LD_{50} (доза, смертельная для 50% популяции) и ED_{50} (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции). Соотношение доз, характеризующих токсические и терапевтические действия, обозначают как терапевтический индекс, который можно выражать в виде соотношения LD_{50}/ED_{50} . Антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, имеющие высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемая в настоящем изобретении, характеризуется высоким терапевтическим индексом. Данные, полученные в анализах с использованием клеточных культур и в опытах на животных, можно применять для определения диапазона доз, которые можно применять на людях. Доза лежит предпочтительно в диапазоне концентраций в кровотоке, которые включают ED_{50} , обладающих невысокой токсичностью или не обладающих токсичностью. Доза может варьироваться в зависимости от различных факторов, например, от применяемой лекарственной формы, применяемого пути введения, состояния индивидуума и т.п. Точную препаративную форму, путь введения и дозу может выбирать индивидуально врач в зависимости от состояния пациента (см., например, Fingl и др. в *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, гл. 1, 1975, с. 1, публикация полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Лечащему врачу пациентов, которым вводят слитые белки, предлагаемые в изобретении, должно быть очевидно, как и когда заканчивать, прерывать или регулировать введение из-за токсичности, дисфункции органов и т.п. И, наоборот, лечащему врачу должно быть известно, как регулировать лечение в сторону применения более высоких доз, если клинический ответ является неадекватным (предотвращая токсичность). Величина вводимой дозы при лечении представляющего интерес нарушения должна варьироваться в зависимости от серьезности состояния, подлежащего лечению, пути введения и т.п. Серьезность состояния можно, например, оценивать среди прочего с помощью стандартных прогностических методов оценки. Кроме того, доза и предполагаемая частота введения дозы должны также варьироваться в зависимости от возраста, веса тела и ответа индивидуального пациента.

Другие средства и варианты лечения.

Антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемые в изобретении, можно вводить в сочетании с одним или несколькими другими средствами. Например, слитый белок, предлагаемый в изобретении, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством. Понятие "терапевтическое средство" включает любое средство, которое вводят для лечения симптома или заболевания у индивидуума, который нуждается в таком лечении. Указанное дополнительное терапевтическое средство может представлять собой любое действующее вещество, которое можно применять при конкретном показании, подлежащем лечению, предпочтительно с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательное действие друг на друга. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой противораковое средство.

Указанные другие средства могут присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для указанных целей. Эффективное количество указанных других средств зависит от количества применяемого слитого белка, типа нарушения или лечения, и других указанных выше факторов. Антигенсвязывающие молекулы, содержащие тримерный лиганд семейства TNF, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием указанных в настоящем описании путей введения, или в дозах, составляющих примерно от 1 до 99% от указанных в настоящем описании доз, или в любой дозе и с использованием любого пути введения, которые согласно эмпирическим/клиническим данным рассматриваются как приемлемые.

Отмеченные выше комбинированные терапии предусматривают совместное введение (когда два или большее количество терапевтических средств включают в одну и ту же или в отдельные композиции) и раздельное введение, в этом случае введение антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF, предлагаемой в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта.

Изделия.

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которые размещены на контейнере или прилагаются к нему. Приемлемыми контейнерами являются, например, банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного (IV) раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд TNF, предлагаемую в изобретении.

На этикетке или листовке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать: (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд TNF, предлагаемую в изобретении; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или иное терапевтическое средство. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может содержать листовку-вкладыш в упаковку, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния.

В альтернативном или дополнительном варианте изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Таблица В (последовательности)

SEQ ID NO:	Обозначение	Последовательность
1	человеческий (hu) 4-1BBL (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FFQLELRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
2	hu 4-1BBL (85-254)	DLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRVAVAGEG SGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN

		AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
3	hu 4-1BBL (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
4	hu 4-1BBL (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSRSE
5	димерный hu 4- 1BBL (71-254), соединенный с помощью (G4S) ₂ - линкера	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRS AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPA GLPSRSE
6	мономерный hu 4- 1BBL (71-254) плюс (G4S) ₂ - линкер	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEG GGGSGGGGS
7	анти-FAP(28H1), CDR-H1	SHAMS
8	анти-FAP(28H1), CDR-H2	AIWASGEQYYADSVKG
9	анти-FAP(28H1), CDR-H3	GWLGNFYD
10	анти-FAP(28H1), CDR-L1	RASQSVRSYLA
11	анти-FAP(28H1), CDR-L2	GASTRAT
12	анти-FAP(28H1), CDR-L3	QQGQVIPPT
13	(G4S) ₂	GGGSGGGGS
14	димерный hu 4- 1BBL (71-254)- CH1-Fc-цепь с «выступом»	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRS AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPA GLPSRSEGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

		QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
15	мономерный hu 4- 1BBL (71-254)-CL	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEG GGGSGGGGSRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
16	анти-FAP(28H1), VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWV RQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYWGQG TLVTVSS
17	анти-FAP(28H1), VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQ QKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK
18	анти-FAP(28H1), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
19	анти-FAP(28H1), легкая цепь	см. таблицу 2
20	человеческий (hu) FAP	UniProt № Q12884
21	эктодомен hu FAP + поли-lys-метка + his ₆ -метка	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFPPNWISG QEYLHQSAADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNASN YGLSPDRQFVYLESYSLKWLRYSYTATYIYDLSNGE FVRGNELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRP GDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALW WSPNGKFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYPTINIP YPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPPAMIASS DYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFRE DWQTDWCPKTQEHIEESRTGWAGGFFVSTPVFSYDAI SYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAINIF RVTQDSLFSYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVT CHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGPPISTLHD GRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEIKKLEVDEIT LWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAV NWISYLASKEGMVIALVDGRGTAFAQGDKLLYAVYRK LGVYEVEDQITAVRKFIEMGFIDEKRIAIWGSYGGY VSSLALASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERFM GLPTKDDNLEHYKNSTVMARAIFYRNVDYLLIHGTA DDNVHVFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSQNHGL SGLSTNHLTYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKKKKGHHHH HH
22	нуклеотидная последовательность конструкции	CGCCCTTCAAGAGTTCATAACTCTGAAGAAAATACA ATGAGAGCACTCACACTGAAGGATATTTTAAATG GAACATTTTCTTATAAAACATTTTTCCTCAAACACTGGAT

	эктодомен hu FAP + поли-lys-метка + his ₆ -метка	TTCAGGACAAGAATATCTTCATCAATCTGCAGATAA CAATATAGTACTTTATAATATTGAAACAGGACAATC ATATACCATTTTGAGTAATAGAACCATGAAAAGTGT GAATGCTTCAAATTACGGCTTATCACCTGATCGGCA ATTTGTATATCTAGAAAAGTGATTATTCAAAGCTTTG GAGATACTCTTACACAGCAACATATTACATCTATGA CCTTAGCAATGGAGAATTTGTAAGAGGAAATGAGCT TCCTCGTCCAATTCAGTATTTATGCTGGTCGCCTGTT GGGAGTAAATTAGCATATGTCTATCAAAAACAATATC TATTTGAAACAAAGACCAGGAGATCCACCTTTTCAA ATAACATTTAATGGAAGAGAAAAATAAATATTTAAT GGAATCCCAGACTGGGTTTATGAAGAGGAAATGCTT GCTACAAAATATGCTCTCTGGTGGTCTCCTAATGGA AAATTTTGGCATATGCGGAATTTAATGATACGGAT ATACCAGTTATTGCCTATTCCTATTATGGCGATGAAC AATATCCTAGAACAAATAAATATTCCATACCCAAAGG CTGGAGCTAAGAATCCCGTTGTTCCGATATTTATTAT CGATACCACTTACCCTGCGTATGTAGGTCCCCAGGA AGTGCCTGTTCCAGCAATGATAGCCTCAAGTGATTA TTATTTCAAGTTGGCTCACGTGGGTTACTGATGAACG AGTATGTTTGCAGTGGCTAAAAAGAGTCCAGAATGT TTCGGTCCTGTCTATATGTGACTTCAGGGAAGACTG GCAGACATGGGATTGTCCAAAGACCCAGGAGCATAT AGAAGAAAGCAGAACTGGATGGGCTGGTGGATTCTT TGTTTCAACACCAGTTTTTCAGCTATGATGCCATTTTCG TACTACAAAATATTTAGTGACAAGGATGGCTACAAA CATATTCATATATCAAAGACACTGTGGAATAATGCT ATTCAAATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATAAAT ATATTCAGAGTAACACAGGATTCCTGTTTTATTCTA GCAATGAATTTGAAGAATACCCTGGAAGAAGAAAC ATCTACAGAATTAGCATTGGAAGCTATCCTCCAAGC AAGAAGTGTGTTACTTGCCATCTAAGGAAAGAAAGG TGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCGACTACGCC AAGTACTATGCACTTGTCTGCTACGGCCCAGGCATC CCCATTTCCACCCTTCATGATGGACGCACTGATCAA GAAATTTAAATCCTGGAAGAAAAACAAGGAATTGGA AAATGCTTTGAAAAATATCCAGCTGCCTAAAGAGGA AATTAAGAACTTGAAGTAGATGAAATTACTTTATG GTACAAGATGATTCTTCCTCCTCAATTTGACAGATC AAAGAAGTATCCCTTGCTAATTCAAGTGTATGGTGG TCCCTGCAGTCAGAGTGTAAAGGTCTGTATTTGCTGTT AATTGGATATCTTATCTTGCAAGTAAGGAAGGGATG GTCATTGCCTTGGTGGATGGTCGAGGAACAGCTTTC CAAGGTGACAACTCCTCTATGCAGTGTATCGAAAG CTGGGTGTTTATGAAGTTGAAGACCAGATTACAGCT GTCAGAAAATTCATAGAAATGGGTTTCATTGATGAA AAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTCCTATGGAGG ATACGTTTCATCACTGGCCCTTGCTCTGGAAGTGGT CTTTTCAAATGTGGTATAGCAGTGGCTCCAGTCTCC AGCTGGGAATATTACGCGTCTGTCTACACAGAGAGA TTCATGGGTCTCCCAACAAAGGATGATAATCTTGAG CACTATAAGAATTCAACTGTGATGGCAAGAGCAGAA TATTTCAAGAAATGTAGACTATCTTCTCATCCACGGA ACAGCAGATGATAATGTGCACTTTCAAACTCAGCA CAGATTGCTAAAGCTCTGGTTAATGCACAAGTGGAT TTCCAGGCAATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGC
--	---	---

		TTATCCGGCCTGTCCACGAACCACTTATACACCCAC ATGACCCACTTCCTAAAGCAGTGTCTCTTTGTCAG ACGGCAAAAAGAAAAAGAAAAGGGCCACCACCAT CACCATCAC
23	мышинный FAP	UniProt № P97321
24	эктодомен мышинного FAP + поли-lys-метка + his ₆ -метка	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYFPNWISE QEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSVNATDY GLSPDRQFVYLESYSLWRYSTATYIYDLQNGEF VRGYELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRP DPPFQITYTGRENRIENGIPDWVYEEEMLATKYALWW SPDGKFLAYVEFNDSIDIPIAYSYYGDGQYPRITINIPY KAGAKNPVVRVFIVDTTYPHHVGPMEVPPVPEMIASSD YYFSWLTWVSSERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFRED WHAWECPKNQEHVEESRTGWAGGFFVSTPAFSQDAT SYYKIFSDKDGKHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAIYIF RVTQDSLFISSNEFEGYPGRRNIYRISIGNSPPSKKCVT CHLRKERCQYYTASFYKAKYYALVCYGPGLPISTLH DGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLPKVEIKKLKDG LTFWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVKSVF AVNWITYLASKEGIVIALVDGRGTAFQGDKFLHAVYR KLGVEVEDQLTAVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGF YVSSLALASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYIYASISERFM GLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGTA DDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGIL SGRSQNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKKKKGHHHH HH
25	нуклеотидная последовательность конструкции эктодомен мышинного FAP + поли-lys-метка + his ₆ -метка	CGTCCCTCAAGAGTTTACAAACCTGAAGGAAACACA AAGAGAGCTCTTACCTTGAAGGATATTTTAAATG GAACATTCTCATATAAAACATATTTTCCCACTGGA TTTCAGAACAAAGATATCTTCATCAATCTGAGGATG ATAACATAGTATTTTATAATATTGAAACAAGAGAAAT CATATATCATTTTGGAGTAATAGCACCATGAAAAGTG TGAATGCTACAGATTATGGTTTGTACCTGATCGGC AATTTGTGTATCTAGAAAGTGATTATTCAAAGCTCT GGCGATATTCATACACAGCGACATACTACATCTACG ACCTTCAGAATGGGGAATTTGTAAGAGG ATACGAGCTCCCTCGTCCAATTCAGTATCTATGCTG GTCGCTGTGGGAGTAAATTAGCATATGTATATCA AAACAATATTTATTTGAAACAAAGACCAGGAGATCC ACCTTTTCAAATAACTTATACTGGAAGAGAAAAATAG AATATTTAATGGAATACCAGACTGGGTTTATGAAGA GGAATGCTTGCCACAAAATATGCTCTTTGGTGGTC TCCAGATGGAAAATTTTGGCATATGTAGAATTTAA TGATTCAGATATACCAATTATTCCTATTCTTATTAT GGTGATGGACAGTATCCTAGAACTATAAATATTCCA TATCCAAAGGCTGGGGCTAAGAATCCGGTTGTTTCGT GTTTTTATTGTTGACACCACCTACCCTCACCACGTGG GCCAATGGAAGTGCCAGTTCCAGAAATGATAGCCT CAAGTGACTATTATTTAGCTGGCTCACATGGGTGT CCAGTGAACGAGTATGCTTGCAGTGGCTAAAAAGAG TGCAGAATGTCTCAGTCCTGTCTATATGTGATTTAG GGAAGACTGGCATGCATGGGAATGTCCAAAGAACC AGGAGCATGTAGAAGAAAGCAGAACAGGATGGGCT GGTGGATTCTTTGTTTCGACACCAGCTTTTAGCCAGG ATGCCACTTCTTACTACAAAATATTTAGCGACAAGG ATGGTTACAAACATATTCATACATCAAAGACACTG

		TGGAAAATGCTATTCAAATTACAAGTGGCAAGTGGG AGGCCATATATATATTCCGCGTAACACAGGATTAC TGTTTTATTCTAGCAATGAATTTGAAGGTTACCTGG AAGAAGAAACATCTACAGAATTAGCATTGGAACTC TCCTCCGAGCAAGAAGTGTGTTACTTGCCATCTAAG GAAAGAAAAGGTGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAG CTACAAAGCCAAGTACTATGCACTCGTCTGCTATGG CCCTGGCCTCCCCATTTCCACCCTCCATGATGGCCGC ACAGACCAAGAAATACAAGTATTAGAAGAAAACAA AGAACTGGAAAATTCTCTGAGAAATATCCAGCTGCC TAAAGTGGAGATTAAGAAGCTCAAAGACGGGGGAC TGACTTTCTGGTACAAGATGATTCTGCCTCCTCAGTT TGACAGATCAAAGAAGTACCCTTTGCTAATTCAAGT GTATGGTGGTCCTTGTAGCCAGAGTGTTAAGTCTGT GTTTGCTGTTAATTGGATAACTTATCTCGCAAGTAA GGAGGGGATAGTCATTGCCCTGGTAGATGGTCGGGG CACTGCTTTCCAAGGTGACAAATTCCTGCATGCCGT GTATCGAAAACCTGGGTGTATATGAAGTTGAGGACCA GCTCACAGCTGTCAGAAAATTCATAGAAATGGGTTT CATTGATGAAGAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTC CTACGGAGGTTATGTTTCATCCCTGGCCCTTGCTATCT GGAAGTGGTCTTTTCAAATGTGGCATAGCAGTGGCT CCAGTCTCCAGCTGGGAATATTACGCATCTATCTAC TCAGAGAGATTCATGGGCCTCCCAACAAAGGACGAC AATCTCGAACACTATAAAAATTCAACTGTGATGGCA AGAGCAGAATATTTAGAAATGTAGACTATCTTCTC ATCCACGGAACAGCAGATGATAATGTGCACTTTTCA AACTCAGCACAGATTGCTAAAGCTTTGGTTAATGCA CAAGTGGATTTCCAGGCGATGTGGTACTCTGACCAG AACCATGGTATATTATCTGGGCGCTCCCAGAATCAT TTATATACCCACATGACGCACTTCCTCAAGCAATGC TTTTCTTTATCAGACGGCAAAAAGAAAAAGAAAAAG GGCCACCACCATCACCATCAC
26	эктодомен FAP обезьян циномолгус + поли-lys-метка + his ₆ -метка	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFPPNWISG QEYLHQSDNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNASN YGLSPDRQFVYLEDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGE FVRGNELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRP GDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALW WSPNGKFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYPRINIP YPKAGAKNPFVRIFIIDTTYPAYVGPQEVVPAMIASSD YYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFRED WQTDWCPKTQEHIIESRTGWAGGFFVSTPVFSYDAIS YYKIFSDKDGKYKHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAINIFR VTQDSLFFYSNEFEDYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTC HLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGPPISTLHDG RTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKKEIKKLEVEITL WYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAV NWISYLASKEGMVIALVDGRGTAQGDKLLYAVYRK LGVYEVEDQITAVRKFIEMGFIDEKRIAIWGSYGGY VSSLALASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERFM GLPTKDDNLEHYKNSTVMARAHEYFRNVDYLLIHGTA DDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSQDNHGL SGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKKKKGHHHH HH
27	нуклеотидная последовательность	CGCCCTCCAAGAGTTTCATAACTCTGAAGAAAATACA ATGAGAGCACTCACACTGAAGGATATTTTAAATG

	конструкции эктодомен FAP обезьян циномолгус + поли-lys-метка + his₆-метка	GGACATTTTCTTATAAAACATTTTTCCAAACCTGGAT TTCAGGACAAGAATATCTTCATCAATCTGCAGATAA CAATATAGTACTTTATAATATTGAAACAGGACAATC ATATACCATTTTGAGTAACAGAACCATGAAAAGTGT GAATGCTTCAAATTATGGCTTATCACCTGATCGGCA ATTTGTATATCTAGAAAAGTGATTATTCAAAGCTTTG GAGATACTCTTACACAGCAACATATTACATCTATGA CCTTAGCAATGGAGAATTTGTAAGAGGAAATGAGCT TCCTCGTCCAATTCAGTATTTATGCTGGTCGCCTGTT GGGAGTAAATTAGCATATGTCTATCAAAACAATATC TATTTGAAACAAAGACCAGGAGATCCACCTTTTCAA ATAACATTTAATGGAAGAGAAAAATAAAATATTTAAT GGAATCCCAGACTGGGTTTATGAAGAGGAAATGCTT GCTACAAAATATGCTCTCTGGTGGTCTCCTAATGGA AAATTTTGGCATATGCGGAATTTAATGATACAGAT ATACCAGTTATTGCCTATTCCTATTATGGCGATGAAC AATATCCCAGAACAATAAATATTCCATACCCAAAGG CCGGAGCTAAGAATCCTTTTGTTCGGATATTTATTAT CGATACCACTTACCCTGCGTATGTAGGTCCCCAGGA AGTGCCTGTTCCAGCAATGATAGCCTCAAGTGATTA TTATTTCAAGTTGGCTCACGTGGGTACTGATGAACG AGTATGTTTGCAGTGGCTAAAAAGAGTCCAGAATGT TTCGGTCTTGTCTATATGTGATTTTCAGGGAAGACTG GCAGACATGGGATTGTCCAAAGACCCAGGAGCATAT AGAAGAAAGCAGAACTGGATGGGCTGGTGGATTCTT TGTTTCAACACCAGTTTTTCAGCTATGATGCCATTTCA TACTACAAAATATTTAGTGACAAGGATGGCTACAAA CATATTCATATATCAAAGACACTGTGGAATAATGCT ATTCAAATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATAAAT ATATTCAGAGTAACACAGGATTCACTGTTTTATTCTA GCAATGAATTTGAAGATTACCCTGGAAGAAGAAAC ATCTACAGAATTAGCATTGGAAGCTATCCTCCAAGC AAGAAGTGTGTTACTTGCCATCTAAGGAAAGAAAGG TGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCGACTACGCC AAGTACTATGCACTTGTCTGCTATGGCCCAGGCATC CCCATTTCCACCCTTCATGACGGACGCACTGATCAA GAAATTTAAATCCTGGAAGAAAACAAGGAATTGGA AAATGCTTTGAAAAATATCCAGCTGCCTAAAGAGGA AATTAAGAACTTGAAGTAGATGAAATTACTTTATG GTACAAGATGATTCTTCCTCCTCAATTTGACAGATC AAAGAAGTATCCCTTGCTAATTCAAGTGTATGGTGG TCCCTGCAGTCAGAGTGTAAGGTCTGTATTTGCTGTT AATTGGATATCTTATCTTGCAAGTAAGGAAGGGATG GTCATTGCCTTGGTGGATGGTCGGGGAACAGCTTTC CAAGGTGACAACTCCTGTATGCAGTGTATCGAAAG CTGGGTGTTTATGAAGTTGAAGACCAGATTACAGCT GTCAGAAAATTCATAGAAATGGGTTTCATTGATGAA AAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTCCTATGGAGG ATATGTTTCATCACTGGCCCTTGCATCTGGAAGTGGT CTTTTCAAATGTGGGATAGCAGTGGCTCCAGTCTCC AGCTGGGAATATTACGCGTCTGTCTACACAGAGAGA TTCATGGGTCTCCCAACAAAGGATGATAATCTTGAG CACTATAAGAATTCAACTGTGATGGCAAGAGCAGAA TATTTTCAGAAATGTAGACTATCTTCTCATCCACGGA ACAGCAGATGATAATGTGCACTTTCAAAACTCAGCA CAGATTGCTAAAGCTCTGGTTAATGCACAAGTGGAT
--	--	---

		TTCCAGGCAATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGC TTATCCGGCCTGTCCACGAACCACTTATACACCCAC ATGACCCACTTCCTAAAGCAGTGTCTCTTTGTCAG ACGGCAAAAAGAAAAAGAAAAGGGCCACCACCAT CACCATCAC
28	человеческий CEA	UniProt № P06731
29	человеческий MCSP	UniProt № Q6UVK1
30	человеческий EGFR	UniProt № P00533
31	человеческий CD19	UniProt № P15391
32	человеческий CD20	UniProt № P11836
33	человеческий CD33	UniProt № P20138
34	человеческий лимфотоксин α	UniProt № P01374
35	человеческий TNF	UniProt № P01375
36	человеческий лимфотоксин β	UniProt № Q06643
37	человеческий OX40L	UniProt № P23510
38	человеческий CD40L	UniProt № P29965
39	человеческий FasL	UniProt № P48023
40	человеческий CD27L	UniProt № P32970
41	человеческий CD30L	UniProt № P32971
42	человеческий 4- 1BBL	UniProt № P41273
43	человеческий TRAIL	UniProt № P50591
44	человеческий RANKL	UniProt № O14788
45	человеческий TWEAK	UniProt № O43508
46	человеческий APRIL	UniProt № O75888
47	человеческий BAFF	UniProt № Q9Y275
48	человеческий LIGHT	UniProt № O43557
49	человеческий TL1A	UniProt № O95150
50	человеческий GITRL	UniProt № Q9UNG2
51	человеческий эктодисплазин A	UniProt № Q92838
52	hu 4-1BBL (50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
53	hu OX40L (51-183)	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKV QNNSVIINCDFYLI SLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLF QLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDF HVNGGELILIHQNPGEFCVL

54	hu OX40L (52-183)	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQ NNSVIINCDGFYLI SLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQ LKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFH VNGGELILIHQNPGEFCVL
55	пептидный линкер (SG4) ₂	SGGGSGGGG
56	пептидный линкер G4(SG4) ₂	GGGSGGGSGGGG
57	пептидный линкер	GSPGSSSSGS
58	пептидный линкер (G4S) ₄	GGGSGGGSGGGSGGGGS
59	пептидный линкер	GS GSGNGS
60	пептидный линкер	GS GSGSG
61	пептидный линкер	GS GSG
62	пептидный линкер	GS G
63	пептидный линкер	GS GNGSG
64	пептидный линкер	GN GSGSG
65	пептидный линкер	GN GSG
66	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4- 1BBL (71-254)- CH1-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 2
67	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4- 1BBL (71-254)-CL1	См. таблицу 2
68	нуклеотидная последовательность конструкции анти- FAP(28H1)-Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 2
69	нуклеотидная последовательность конструкции анти- FAP (28H1), легкая цепь	См. таблицу 2
70	мышинный (mu) 4- 1BBL	UniProt № Q3U1Z9-1
71	нуклеотидная последовательность конструкции димерный mu 4- 1BBL (104-309, C137,160,246S)- CH1-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 13
72	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный mu 4- 1BBL (104-309,	См. таблицу 13

	C137, 160, 246S)-CL	
73	нуклеотидная последовательность конструкции анти-FAP, Fc-цепь с мутацией KK	См. таблицу 13
74	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-FAP	См. таблицу 13
75	димерный mu 4-1BBL (104-309, C137, 160, 246S) – CL-Fc-цепь с мутацией DD	См. таблицу 13
76	мономерный mu 4-1BBL (104-309, C137, 160, 246S)-CL1	См. таблицу 13
77	анти-FAP, Fc-цепь с мутацией KK	См. таблицу 13
78	анти-FAP, легкая цепь	См. таблицу 13
79	нуклеотидная последовательность DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
80	нуклеотидная последовательность легкой цепи DP47	См. таблицу 18
81	DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
82	DP47, легкая цепь	См. таблицу 18
83	человеческий 4-1BB-Fc(kih)	См. таблицу 31
84	обезьяний (циномолгус) 4-1BB-Fc(kih)	См. таблицу 31
85	мышинный 4-1BB-Fc(kih)	См. таблицу 31
86	нуклеотидная последовательность Fc-цепи с «впадиной»	См. таблицу 32
87	нуклеотидная последовательность конструкции человеческого 4-1BB-Fc(kih)	См. таблицу 32
88	нуклеотидная последовательность конструкции обезьяний (циномолгус) 4-	См. таблицу 32

	1BV-Fc(kih)	
89	нуклеотидная последовательность конструкции 4-1BV-Fc(kih)	См. таблицу 32
90	Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 32
91	конструкция человеческого 4-1BV-Fc(kih)	См. таблицу 32
92	конструкция обезьяний (циномолгус) 4-1BV-Fc(kih)	См. таблицу 32
93	конструкция мышинный 4-1BV-Fc(kih)	См. таблицу 32
94	нуклеотидная последовательность человеческого 4-1BV-His	См. таблицу 33
95	человеческий 4-1BV-His	См. таблицу 33
96	человеческий (hu) 4-1BBL (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
97	димерный hu 4-1BBL (71-248), соединенный с помощью (G4S) ₂ -линкера	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSG GGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLI DGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
98	димерный hu 4-1BBL (80-254), соединенный с помощью (G4S) ₂ -линкера	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAG VSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
99	димерный hu 4-1BBL (52-254), соединенный с помощью (G4S) ₂ -линкера	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSPWAVSGARA SPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA

		QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIP AGLPSRSE
100	анти-FAP(4B9), CDR-H1	SYAMS
101	анти-FAP(4B9), CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
102	анти-FAP(4B9), CDR-H3	GWFGGFNY
103	анти-FAP(4B9), CDR-L1	RASQSVTSSYLA
104	анти-FAP(4B9), CDR-L2	VGSRRAT
105	анти-FAP(4B9), CDR-L3	QQGIMLPPT
106	анти-FAP(4B9), VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQG TLVTVSS
107	анти-FAP(4B9), VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQ QKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
108	димерный hu 4- 1BBL (71-254)- CH1*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 4
109	мономерный hu 4- 1BBL (71-254)-CL*	см. таблицу 4
110	мономерный hu 4- 1BBL (71-254)- (G4S)1-CL*	см. таблицу 7
111	димерный hu 4- 1BBL (52-254)- CH1*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 10
112	мономерный hu 4- 1BBL (52-254)-CL*	см. таблицу 10
113	димерный hu 4- 1BBL (80-254)- CH1*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 11
114	мономерный hu 4- 1BBL (80-254)-CL*	см. таблицу 11
115	димерный hu 4- 1BBL (71-254)- CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 3
116	мономерный hu 4- 1BBL (71-254)- CH1*	см. таблицу 3
117	димерный hu 4- 1BBL (71-254)-CL- Fc-цепь с	см. таблицу 22

	«выступом»	
118	мономерный hu 4-1BBL (71-254)-CH1	см. таблицу 22
119	димерный hu 4-1BBL (71-248)-CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 24
120	мономерный hu 4-1BBL (71-248)-CH1*	см. таблицу 24
121	анти-FAP (28H1)-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 6
122	анти-FAP (28H1)-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 6
123	анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 23
124	анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 23
125	анти-FAP (4B9), легкая цепь	см. таблицу 21
126	анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным 4-1BBL (71-248)	см. таблицу 26
127	анти-FAP (4B9)-Fc-цепь, с «выступом», слитая с мономерным 4-1BBL (71-248)	см. таблицу 26
128	пептидный линкер	GGGS
129	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 3
130	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	см. таблицу 3
131	нуклеотидная	см. таблицу 4

	последовательность конструкции димерный hu 4- 1BBL (71-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	
132	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4- 1BBL (71-254)–CL*	см. таблицу 4
133	нуклеотидная последовательность конструкции анти- FAP (28H1) (VHCL)-Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 4
134	нуклеотидная последовательность легкой цепи (VLCH1) анти-FAP (28H1)	см. таблицу 4
135	анти-FAP (VHCL) (28H1), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 4
136	анти-FAP (28H1), легкая цепь (VLCH1)	см. таблицу 4
137	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4- 1BBL (71-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 5
138	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4- 1BBL (71-254) – CL*	см. таблицу 5
139	мономерный hu 4- 1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 5
140	димерный hu 4- 1BBL (71-254)–CL*	см. таблицу 5
141	нуклеотидная последовательность конструкции анти- FAP (28H1)- Fc- цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 6
142	нуклеотидная	см. таблицу 6

	последовательность конструкции анти-FAP (28H1)-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	
143	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254)–(G4S) ₁ -CL*	см. таблицу 7
144	нуклеотидная последовательность конструкции [анти-FAP (28H1)] ₂ -Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 8
145	[анти-FAP (28H1)] ₂ -Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 8
146	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-254) – анти-FAP (VHCL*)-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 9
147	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – анти-FAP (VLCH1*)	см. таблицу 9
148	димерный hu 4-1BBL (71-254) – анти-FAP (VHCL*)-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 9
149	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – анти-FAP (VLCH1*)	см. таблицу 9
150	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (52-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 10
151	нуклеотидная последовательность конструкции	см. таблицу 10

	мономерный hu 4-1BBL (52-254) – CL*	
152	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (80-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 11
153	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (80-254) – CL*	см. таблицу 11
154	нуклеотидная последовательность DP47, Fc-цепь с мутацией KK	см. таблицу 14
155	нуклеотидная последовательность легкой цепи DP47	см. таблицу 14
156	DP47, Fc-цепь с мутацией KK	см. таблицу 14
157	легкая цепь DP47	см. таблицу 14
158	нуклеотидная последовательность конструкции димерный mu 4-1BBL (104-309, C160S) – CL-Fc-цепь с мутацией DD	см. таблицу 15
159	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный мышиный 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1	см. таблицу 15
160	димерный mu 4-1BBL (104-309, C160S) – CL-Fc-цепь с мутацией DD	см. таблицу 15
161	мономерный мышиный 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1	см. таблицу 15
162	нуклеотидная последовательность анти-FAP (4B9), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 21

163	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-FAP (4B9)	см. таблицу 21
164	анти-FAP (4B9), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 21
165	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 22
166	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1	см. таблицу 22
167	нуклеотидная последовательность конструкции анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 23
168	нуклеотидная последовательность конструкции анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 23
169	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 24
170	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1*	см. таблицу 24
171	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 25

172	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1	см. таблицу 25
173	димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 25
174	мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1	см. таблицу 25
175	нуклеотидная последовательность конструкции анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-248)	см. таблицу 26
176	нуклеотидная последовательность конструкции анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-248)	см. таблицу 26
177	нуклеотидная последовательность конструкции DP47-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 27
178	нуклеотидная последовательность конструкции DP47-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 27
179	DP47-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 27
180	DP47, Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	см. таблицу 27
181	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи DP47 (hu IgG1 PGLALA)	см. таблицу 29
182	DP47, тяжелая цепь	см. таблицу 29

	(hu IgG1 PGLALA)	
183	мономерный hu 4-1BBL (71-254) плюс (G4S) ₁ -линкер	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEG GGGS
184	мономерный hu 4-1BBL (71-248) плюс (G4S) ₂ -линкер	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSG GGGS
185	мономерный hu 4-1BBL (71-248) плюс (G4S) ₁ -линкер	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGGS
186	нуклеотидная последовательность конструкции человеческого антиген CD19-Fc-цепь с «выступом»-avi-метка	см. таблицу 43
187	полипептидная последовательность конструкции человеческого антиген CD19-Fc-цепь с «выступом»-avi-метка	см. таблицу 43
188	нуклеотидная последовательность конструкции антиген CD19 обезьян циномолгус-Fc-цепь с «выступом»-avi-метка	см. таблицу 43
189	полипептидная последовательность конструкции антиген CD19 обезьян циномолгус-Fc-цепь с «выступом»-avi-метка	см. таблицу 43
190	гуманизированное анти-CD19 (8B8), HVR-L1	NSNGNT
191	гуманизированное анти-CD19 (8B8) HVR-H2	KFNG
192	гуманизированное	TEKFQGRVTM

	анти-CD19 (8B8), варианты 1-9, HVR-H2	
193	гуманизированное анти-CD19 (8B8), вариант 5, HVR-L1	LENPNGNT
194	гуманизированное анти-CD19 (8B8), вариант 9, HVR-L1	LENPSGNT
195	анти-CD19 (8B8- 018), CDR-H1	DYIMH
196	анти-CD19 (8B8- 018), CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
197	анти-CD19 (8B8- 018), CDR-H3	GTYYYGSALFDY
198	анти-CD19 (8B8- 018), CDR-L1	KSSQSLENPNGNTYLN
199	анти-CD19 (8B8- 018), CDR-L2	RVSKRFS
200	анти-CD19 (8B8- 018), CDR-L3	LQLTHVPYT
201	анти-CD19 (8B8- 018), VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHW VRQAPGGGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTS DTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGTYYYGSALFD YWGQGTITVTVSS
202	анти-CD19 (8B8- 018), VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYLN WYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFGVDPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK
203	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8- 018), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 47
204	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти- CD19 (8B8-018)	см. таблицу 47
205	анти-CD19(8B8- 018), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 47
206	легкая цепь анти- CD19(8B8-018)	см. таблицу 47
207	нуклеотидная последовательность конструкции анти- CD19 (8B8-018)-Fc- цепь с «впадиной»- димерный лиганд	см. таблицу 49
208	нуклеотидная последовательность конструкции анти- CD19 (8B8-018)-Fc- цепь с «выступом»- мономерный лиганд	см. таблицу 49

209	анти-CD19 (8B8-018)- Fc-цепь с «впадиной»- димерный лиганд	см. таблицу 49
210	анти-CD19 (8B8-018)- Fc-цепь с «выступом» мономерный лиганд	см. таблицу 49
211	нуклеотидная последовательность конструкции анти-CD19 (8B8-018)- Fc-цепь с «впадиной»- димерный лиганд (71-248)	см. таблицу 52
212	Нуклеотидная последовательность конструкции анти-CD19 (8B8-018)- Fc-цепь с «выступом»- мономерный лиганд (71-248)	см. таблицу 52
213	анти-CD19 (8B8-018)-Fc-цепь с «впадиной»- димерный лиганд (71-248)	см. таблицу 52
214	анти-CD19 (8B8-018)- Fc-цепь с «выступом»- мономерный лиганд (71-248)	см. таблицу 52
215	нуклеотидная последовательность родительского клона CD19 (8B8), VH	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTA AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGGCCTGCAAGGCT TCTGGATACACATTCAGTGAAGTATATTATGCACTGG GTGAAGCAGAAGACTGGGCAGGGCCTTGAGTGGAT TGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTTCTAAGTA CACTGAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACACTGACTTC AGACAAATCTTCCATCACAGCCTACATGGAGCTCAG CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTG TGCAAGAGGGACCTATTATTATGGTAGCGCCCTCTT TGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTC CTCG
216	нуклеотидная последовательность родительского клона CD19 (8B8), VL	GATGCTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCT GTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGG TCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACC TATTTGAACTGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCT CCACAACCTCTGATCTACAGGGTTTCCAAACGATTT TCTGGGGTCCCTAGACAGGTTTCACTGGTAGTGGATCA GGGACAGATTTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGA GGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTTCTGCCTACAACCTT ACACATGTCCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAG

		CTGGAAATAAAA
217	CD19 L1, обратный случайный (праймер)	см. таблицу 53
218	CD19 L2, прямой случайный (праймер)	см. таблицу 53
219	CD19 H1, обратный случайный (праймер)	см. таблицу 53
220	CD19 H2, прямой случайный (праймер)	см. таблицу 53
221	CD19 H3, обратный константный (праймер)	см. таблицу 53
222	LMB3	см. таблицу 53
223	D19 L1, прямой константный (праймер)	см. таблицу 54
224	CD19 L3, обратный случайный (праймер)	см. таблицу 54
225	CD19 L3, прямой константный (праймер)	см. таблицу 54
226	CD19 H3, обратный случайный (праймер)	см. таблицу 54
227	нуклеотидная последовательность меченной SNAP конструкции ECD человеческого CD19-PDGFR	GGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACAAGGACGACG ATGACAAGGCCGCGCATCGATGCCATCATGGACAAA GACTGCGAAATGAAGCGCACCAACCCTGGATAGCCCT CTGGGCAAGCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGC CTGCACGAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGGAACATCT GCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGCC GTGCTGGGCGGACCAGAGCCACTGATGCAGGCCACC GCCTGGCTCAACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCC ATCGAGGAGTTCCCTGTGCCAGCCCTGCACCACCCA GTGTTCCAGCAGGAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCTG TGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAAGTTCGGAGAGGTC ATCAGCTACCAGCAGCTGGCCGCCCTGGCCGGCAAT CCCGCCGCCACCGCCGCGGTGAAAACCGCCCTGAGC GGAAATCCCGTGCCCATCTGATCCCCTGCCACCGG GTGGTGTCTAGCTCTGGCGCCGTGGGGGGCTACGAG GGCGGGCTCGCCGTGAAAGAGTGGCTGCTGGCCAC GAGGGCCACAGACTGGGCAAGCCTGGGCTGGGTGA TATCCCCGAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGA GGGCGACAATGCCGTGCTGCAGTGCCTGAAGGGCAC CTCCGATGGCCCTACCCAGCAGCTGACCTGGTCCAG AGAGAGCCCCCTGAAGCCCTTCCTGAAGCTGTCTCT GGCCTGCCTGGCCTGGGCATCCATATGAGGCCTCT GGCCATCTGGCTGTTTCATCTTCAACGTGTCCAGCA GATGGGCGGCTTCTACCTGTGTGACCTGGCCCCC ATCTGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGCTGGACCGTGAA CGTGGAAGGATCCGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGT

		GTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAGAA CAGATCTAGCGAGGGCCCCAGCAGCCCCAGCGGCA AACTGATGAGCCCCAAGCTGTACGTGTGGGCCAAGG ACAGACCCGAGATCTGGGAGGGCGAGCCTCCTTGCC TGCCCCCTAGAGACAGCCTGAACCAGAGCCTGAGCC AGGACCTGACAATGGCCCCCTGGCAGCACACTGTGGC TGAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGTGTCTAGAG GCCCTCTGAGCTGGACCCACGTGCACCCTAAGGGCC CTAAGAGCCTGCTGAGCCTGGAAGTGAAGGACGAC AGGCCCCGCCAGAGATATGTGGGTCATGGAAACCGG CCTGCTGCTGCCTAGAGCCACAGCCCAGGATGCCGG CAAGTACTACTGCCACAGAGGCAACCTGACCATGAG CTTCCACCTGGAAATCACCGCCAGACCCGTGCTGTG GCACTGGCTGCTGAGAACAGGCGGCTGGAAGGTCG ACGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT GCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTG CCACACTCCTTGCCCTTTAAGGTGGTGGTGATCTCA GCCATCCTGGCCCTGGTGGTGCTCACCATCATCTCCC TTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCAC GT
228	нуклеотидная последовательность меченной SNAP конструкции ECD CD19 обезьян циномолгус - PDGFR	CCGGCCCGCCTAGCGGCATCGACTACAAGGACGAC GATGACAAGGCCCGGCATCGATGCCATCATGGACAA AGACTGCGAAATGAAGCGCACCAACCTGGATAGCCC TCTGGGCAAGCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGG CCTGCACGAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGGAACATC TGCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGC CGTGCTGGGCGGACCAGAGCCACTGATGCAGGCCAC CGCCTGGCTCAACGCCTACTTTACCAGCCTGAGGC CATCGAGGAGTTCCCTGTGCCAGCCCTGCACCACCC AGTGTTCCAGCAGGAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCT GTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAAGTTCGGAGAGG TCATCAGCTACCAGCAGCTGGCCGCCCTGGCCGGCA ATCCCGCCGCCACCGCCGCCGTGAAAACCGCCCTGA GCGGAAATCCCGTGCCATTCTGATCCCCTGCCACC GGGTGGTGTCTAGCTCTGGCGCCGTGGGGGGCTACG AGGGCGGGCTCGCCGTGAAAGAGTGGCTGCTGGCCC ACGAGGGCCACAGACTGGGCAAGCCTGGGCTGGGT GATATCCCCCAGGAACCCCTGGTCTGTAAGGTGGA GAGGGCGACAATGCCGTGCTCCAGTGCTCTCGAGGGC ACCTCCGATGGCCCTACACAGCAGCTCGTGTGGTGC AGAGACAGCCCCTTCGAGCCCTTCCTGAACCTGTCT CTGGGCCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATGGGCCCT CTGGGCATCTGGCTGCTGATCTTCAACGTGTCCAAC CAGACCGGCGGCTTCTACCTGTGTGAGCCTGGCCTG CCAAGCGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGT GTCCGTGGAAGGATCTGGCGAGCTGTTCCGGTGGA CGTGTCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAA GAACAGAAGCAGCGAGGGCCCTAGCAGCCCCAGCG GCAAGCTGAATAGCAGCCAGCTGTACGTGTGGGCCA AGGACAGACCCGAGATGTGGGAGGGCGAGCCTGTG TGTGGCCCCCTAGAGATAGCCTGAACCAGAGCCTG AGCCAGGACCTGACAATGGCCCCCTGGCAGCACACTG TGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGTGTCC AGAGGCCCTCTGAGCTGGACACACGTGCGGCCTAAG GGCCCTAAGAGCAGCCTGCTGAGCCTGGAAGTGAAG GACGACCGGCCCGACCGGGATATGTGGGTGGTGGAT

		ACAGGCCTGCTGCTGACCAGAGCCACAGCCCAGGAT GCCGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCAACTGGACC AAGAGCTTTTACCTGGAAATCACCGCCAGACCCGCC CTGTGGCACTGGCTGCTGAGAATCGGAGGCTGGAAG GTCGACGAGCAGAAGCTGATCTCCGAAGAGGACCT GAACGCCGTGGGCCAGGATACCCAGGAAGTGATCG TGGTGCCCCACAGCCTGCCCTTCAAGGTGGTCGTGA TCAGCGCCATTCTGGCCCTGGTGGTGTGACCATCA TCAGCCTGATCATCCTGATTATGCTGTGGCAGAAAA AGCCCCGC
229	полипептидная последовательность меченной SNAP конструкции ECD человеческого CD19 - PDGFR	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCCEMKRTTLDSP GKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVL GGPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFVVPALHHPVFQ QESFTRQVLWKLLKVVKFGEVISYQQLAALAGNPAAT AAVKTALSGNPVPILIPCHRVVSSSGAVGGYEGGLAV KEWLLAHEGHRLGKPLGDIPEEPLVVKVEEGDNAVL QCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLSLGLPLGLIH MRPLAIWLFIFNVSSQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGW TVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPS GKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSLS QDLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP KSLLSLELKDDRPARDMWVMMETGLLLPRATAQDAGK YYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVDE QKLISEEDLNAVQDQTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILAL VVLTIISLIILIMLWQKKPR
230	полипептидная последовательность меченной SNAP конструкции ECD человеческого CD19 - PDGFR	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCCEMKRTTLDSP GKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVL GGPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFVVPALHHPVFQ QESFTRQVLWKLLKVVKFGEVISYQQLAALAGNPAAT AAVKTALSGNPVPILIPCHRVVSSSGAVGGYEGGLAV KEWLLAHEGHRLGKPLGDIPEEPLVVKVEEGDNAVL QCLEGTSDGPTQQLVWCRDSPFEPFLNLSLGLPGMGIR MGPLGIWLLIFNVSNQTGGGFYLCQPGLPSEKAWQPGW TVSVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSG KLNSSQLYVWAKDRPEMWEGEPPVCGPPRDSLNSLS QDLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVRPKGP KSSLLSLELKDDRDPDRDMWVVDTGILLTRATAQDAG KYYCHRGNTKSFYLEITARPALWHWLLRIGGWKVD EKLISEEDLNAVQDQTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILA LVVLTIIISLIILIMLWQKKPR
231	анти-CD19 (8B8- 5H09), CDR-L1	см. таблицу 56
232	анти-CD19 (8B8- 5H09), CDR-L2	см. таблицу 56
233	анти-CD19 (8B8- 5H09), CDR-L3	см. таблицу 56
234	анти-CD19 (8B8- 5H09), CDR-H1	см. таблицу 57
235	анти-CD19 (8B8- 5H09), CDR-H2	см. таблицу 57
236	анти-CD19 (8B8- 5H09), CDR-H3	см. таблицу 57
237	анти-CD19 (8B8- 7H07), CDR-L1	см. таблицу 56
238	анти-CD19 (8B8-	см. таблицу 56

	7H07), CDR-L2	
239	анти-CD19 (8B8-7H07), CDR-L3	см. таблицу 56
240	анти-CD19 (8B8-7H07), CDR-H1	см. таблицу 57
241	анти-CD19 (8B8-7H07), CDR-H2	см. таблицу 57
242	анти-CD19 (8B8-7H07), CDR-H3	см. таблицу 57
243	анти-CD19 (8B8-2B03), CDR-L1	см. таблицу 56
244	анти-CD19 (8B8-2B03), CDR-L2	см. таблицу 56
245	анти-CD19 (8B8-2B03), CDR-L3	см. таблицу 56
246	анти-CD19 (8B8-2B03), CDR-H1	см. таблицу 57
247	анти-CD19 (8B8-2B03), CDR-H2	см. таблицу 57
248	анти-CD19 (8B8-2B03), CDR-H3	см. таблицу 57
249	анти-CD19 (8B8-2B11), CDR-L1	см. таблицу 56
250	анти-CD19 (8B8-2B11), CDR-L2	см. таблицу 56
251	анти-CD19 (8B8-2B11), CDR-L3	см. таблицу 56
252	анти-CD19 (8B8-2B11), CDR-H1	см. таблицу 57
253	анти-CD19 (8B8-2B11), CDR-H2	см. таблицу 57
254	анти-CD19 (8B8-2B11), CDR-H3	см. таблицу 57
255	анти-CD19 (8B8-5A07), CDR-L1	см. таблицу 56
256	анти-CD19 (8B8-5A07), CDR-L2	см. таблицу 56
257	анти-CD19 (8B8-5A07), CDR-L3	см. таблицу 56
258	анти-CD19 (8B8-5A07), CDR-H1	см. таблицу 57
259	анти-CD19 (8B8-5A07), CDR-H2	см. таблицу 57
260	анти-CD19 (8B8-5A07), CDR-H3	см. таблицу 57
261	анти-CD19 (8B8-5B08), CDR-L1	см. таблицу 56
262	анти-CD19 (8B8-5B08), CDR-L2	см. таблицу 56
263	анти-CD19 (8B8-5B08), CDR-L3	см. таблицу 56
264	анти-CD19 (8B8-5B08), CDR-H1	см. таблицу 57
265	анти-CD19 (8B8-5B08), CDR-H2	см. таблицу 57

266	анти-CD19 (8B8-5B08), CDR-H3	см. таблицу 57
267	анти-CD19 (8B8-5D08), CDR-L1	см. таблицу 56
268	анти-CD19 (8B8-5D08), CDR-L2	см. таблицу 56
269	анти-CD19 (8B8-5D08), CDR-L3	см. таблицу 56
270	анти-CD19 (8B8-5D08), CDR-H1	см. таблицу 57
271	анти-CD19 (8B8-5D08), CDR-H2	см. таблицу 57
272	анти-CD19 (8B8-5D08), CDR-H3	см. таблицу 57
273	нуклеотидная последовательность легкой цепи родительского антитела к CD19 (8B8)	см. таблицу 58
274	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи родительского антитела к CD19 (8B8)	см. таблицу 58
275	легкая цепь родительского антитела к CD19 (8B8)	см. таблицу 58
276	тяжелая цепь родительского антитела к CD19 (8B8)	см. таблицу 58
277	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-2B11)	см. таблицу 59
278	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи анти-CD19 (8B8-2B11)	см. таблицу 59
279	анти-CD19 (8B8-2B11), легкая цепь	см. таблицу 59
280	анти-CD19 (8B8-2B11) тяжелая цепь	см. таблицу 59
281	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8-7H07)	см. таблицу 59
282	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи анти-CD19 (8B8-7H07)	см. таблицу 59
283	анти-CD19 (8B8-	см. таблицу 59

	7H07), легкая цепь	
284	анти-CD19 (8B8-7H07), тяжелая цепь	см. таблицу 59
285	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-2B03)	см. таблицу 59
286	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи анти-CD19 (8B8-2B03)	см. таблицу 59
287	анти-CD19 (8B8-2B03), легкая цепь	см. таблицу 59
288	анти-CD19 (8B8-2B03), тяжелая цепь	см. таблицу 59
289	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-5A07)	см. таблицу 59
290	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи анти-CD19 (8B8-5A07)	см. таблицу 59
291	анти-CD19 (8B8-5A07), легкая цепь	см. таблицу 59
292	анти-CD19 (8B8-5A07), тяжелая цепь	см. таблицу 59
293	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-5D08)	см. таблицу 59
294	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи анти-CD19 (8B8-5D08)	см. таблицу 59
295	анти-CD19 (8B8-5D08), легкая цепь	см. таблицу 59
296	анти-CD19 (8B8-5D08), тяжелая цепь	см. таблицу 59
297	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-5B08)	см. таблицу 59
298	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи анти-CD19 (8B8-5B08)	см. таблицу 59
299	анти-CD19 (8B8-5B08), легкая цепь	см. таблицу 59
300	анти-CD19 (8B8-5B08), тяжелая цепь	см. таблицу 59

	цепь	
301	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-5H09)	см. таблицу 59
302	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи анти-CD19 (8B8-5H09)	см. таблицу 59
303	легкая цепь анти-CD19 (8B8-5H09)	см. таблицу 59
304	тяжелая цепь анти-CD19 (8B8-5H09)	см. таблицу 59
305	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8-2B11), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 62
306	анти-CD19 (8B8-2B11), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 62
307	нуклеотидная последовательность конструкции анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «впадиной»-димерный лиганд	см. таблицу 64
308	нуклеотидная последовательность конструкции анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «выступом»-мономерный лиганд	см. таблицу 64
309	анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «впадиной»-димерный лиганд	см. таблицу 64
310	анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «выступом»-мономерный лиганд	см. таблицу 64
311	нуклеотидная последовательность конструкции анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «впадиной»-димерный лиганд (71-248)	см. таблицу 67
312	нуклеотидная последовательность	см. таблицу 67

	конструкции анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «выступом»-мономерный лиганд (71-248)	
313	анти-CD19 (8B8-2B11)- Fc-цепь с «впадиной»-димерный лиганд (71-248)	см. таблицу 67
314	анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc с «выступом»-мономерный лиганд (71-248)	см. таблицу 67
315	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи анти-CD19 (8B8-018) (huIgG1 PGLALA)	см. таблицу 72
316	тяжелая цепь анти-CD19 (8B8-018) (huIgG1 PGLALA)	см. таблицу 72
317	анти-му CEA T84.66, VH	MKCSWVIFFL MAVVTGVNSE VQLQQSGAEL VEPGASVKLS CTASGFNIKD TYMHWVKQRP EQGLEWIGRI DPANGNSKYV PKFQGKATIT ADTSSNTAYL QLTSLTSEDV AVYYCAPFGY YVSDYAMAYW GQGTSVTVSS
318	анти-му CEA T84.66, VL	METDTLLLVV LLLWVPGSTG DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT MSCRAGESVD IFGVGFLHWY QKPGQPPKL LIYRASNLGS GIPVRFSGTG SRDFTLIID PVEADDVATY YCQQTNEIDPY TFGGGTKLEI K
319	IGHV1-69*08, IMGT код доступа Z14309	TAAGGGGCTT CCTAGTCCTA AGGCTGAGGA AGGGATCCTG GTTAGTTAA AGAGGATTTT ATTCACCCCT GTGTCCTCTC CACAGGTGTC CAGTCCCAGG TCCAGCTGGT GCAATCTGGG GCTGAGGTGA AGAAGCCTGG GTCCTCGGTG AAGGTCTCCT GCAAGGCTTC TGGAGGCACC TTCAGCAGCT ATACTATCAG CTGGGTGCGA CAGGCCCTG GACAAGGGCT TGAGTGGATG GGAAGGATCA TCCCTATCCT TGGTACAGCA AACTACGCAC AGAAGTTCCA GGGCAGAGTC ACGATTACCG CGGACAAATC CACGAGCACA GCCTACATGG AGCTGAGCAG CCTGAGATCT GAGGACACGG CCGTGTATTA CTGTGCGAGA GA
320	IGKV3-11*01, IMGT код доступа	CTGCAGCTGG AAGCTCAGCT CCCACCCAGC TGCTTTGCAT GTCCCTCCCA GCTGCCCTAC CTTCCAGAGC CCATATCAAT GCCTGTGTCA GAGCCCTGGG GAGGAACTGC TCAGTTAGGA CCCAGAGGGA ACCATGGAAG CCCCAGCTCA GCTTCTCTTC CTCCTGCTAC TCTGGCTCCC AGGTGAGGGG AACATGAGGT GGTTTTGCAC

		ATTAGTGA AAA ACTCTTGCCA CCTCTGCTCA GCAAGAAATA TAATTA AAAAT TCAAAGTATA TCAACAATTT TGGCTCTACT CAAAGACAGT TGGTTTGATC TTGATTACAT GAGTGCATTT CTGTTTTATT TCCAATTTCA GATACCACCG GAGAAATTGT GTTGACACAG TCTCCAGCCA CCCTGTCTTT GTCTCCAGGG GAAAGAGCCA CCCTCTCCTG CAGGGCCAGT CAGAGTGTTA GCAGCTACTT AGCCTGGTAC CAACAGAAAC CTGGCCAGGC TCCCAGGCTC CTCATCTATG ATGCATCCAA CAGGGCCACT GGCATCCCAG CCAGGTTT CAG TGGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCACTCT CACCATCAGC AGCCTAGAGC CTGAAGATTT TGCAGTTTAT TACTGTCAGC AGCGTAGCAA CTGGCCTCCC ACAGTGATTC CACATGAAAC AAAAACCCCA ACAAGACCAT CAGTGTTTAC TAGATTATTA TACCAGCTGC TTCCTTTACA GACAGCTAGT GGGGTGGCCA CTCAGTGTTA GCATCTCAGC TCTATTTGGC CATTTTGGAG TTCAAGT
321	анти-CEA, CDR-H1	см. таблицу 81
322	анти-CEA, CDR-H2	см. таблицу 81
323	анти-CEA, CDR-H3	см. таблицу 81
324	анти-CEA, CDR-L1	см. таблицу 81
325	анти-CEA, CDR-L2	см. таблицу 81
326	анти-CEA, CDR-L3	см. таблицу 81
327	родительский CEA- связывающий агент, VH	см. таблицу 81
328	родительский CEA- связывающий агент, VL	см. таблицу 81
329	гуманизированный CEA-связывающий агент, VH	см. таблицу 81
330	гуманизированный CEA-связывающий агент, VL	см. таблицу 81
331	нуклеотидная последовательность анти-CEA (T84.66- LCHA), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 82
332	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти- CEA (T84.66- LCHA)	см. таблицу 82
333	анти-CEA (T84.66- LCHA), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 82
334	анти-CEA (T84.66- LCHA), легкая цепь	см. таблицу 82
335	нуклеотидная последовательность	см. таблицу 84

	конструкции анти-СЕА (Т84.66-LSНА)- Fc-цепь с «впадиной»- димерный лиганд	
336	нуклеотидная последовательность конструкции анти-СЕА (Т84.66-LSНА)- Fc-цепь с «выступом»- мономерный лиганд	см. таблицу 84
337	анти-СЕА (Т84.66-LSНА)- Fc-цепь с «впадиной»- димерный лиганд	см. таблицу 84
338	анти-СЕА (Т84.66-LSНА)- Fc-цепь с «выступом»- мономерный лиганд	см. таблицу 84
339	нуклеотидная последовательность конструкции анти-СЕА (Т84.66-LSНА)- Fc-цепь с «впадиной»- димерный лиганд (71-248)	см. таблицу 87
340	нуклеотидная последовательность конструкции анти-СЕА (Т84.66-LSНА),-Fc-цепь с «выступом»- мономерный лиганд (71-248)	см. таблицу 87
341	анти-СЕА (Т84.66-LSНА)- Fc-цепь с «впадиной»- димерный лиганд (71-248)	см. таблицу 87
342	анти-СЕА (Т84.66-LSНА)- Fc-цепь с «выступом»- мономерный лиганд (71-248)	см. таблицу 87
343	нуклеотидная последовательность анти-СЕА (Т84.66), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 88
344	нуклеотидная последовательность	см. таблицу 88

	легкой цепи анти-СЕА (Т84.66)	
345	анти-СЕА (Т84.66), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 88
346	анти-СЕА (Т84.66), легкая цепь	см. таблицу 88
347	нуклеотидная последовательность конструкции анти- СЕА(Т84.66)-Fc- цепь с «впадиной»- димерный лиганд	см. таблицу 89
348	нуклеотидная последовательность конструкции анти- СЕА (Т84.66)-Fc- цепь с «выступом»- мономерный лиганд	см. таблицу 89
349	анти-СЕА (Т84.66)- Fc-цепь с «впадиной»- димерный лиганд	см. таблицу 89
350	анти-СЕА (Т84.66)- Fc-цепь с «выступом»- мономерный лиганд	см. таблицу 89
351	нуклеотидная последовательность hu NA3B3A2-avi His	см. таблицу 92
352	человеческий NA3B3A2-avi-His	см. таблицу 92
353	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu OX40L (51-183) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 97
354	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu OX40L (51-183) – CH1*	см. таблицу 97
355	димерный hu OX40L (51-183) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 97
356	мономерный hu OX40L (51-183) – CH1*	см. таблицу 97

357	анти-CD19 (8B8-2B11), VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHW VRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTS DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFD YWGQGTITVTVSS
358	анти-CD19 (8B8-2B11), VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLN WYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCLQLLEDPTFGQGTKLEIK
359	анти-CD19 (8B8-7H07), VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHW VRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTS DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSELF YWGQGTITVTVSS
360	анти-CD19 (8B8-7H07), VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLN WYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCLQATHIPYTFGQGTKLEIK
361	анти-CD19 (8B8-2B03), VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHW VRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTS DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPDLFD YWGQGTITVTVSS
362	анти-CD19 (8B8-2B03), VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLN WYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGXKLEIK
363	анти-CD19 (8B8-5A07), VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHW VRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTS DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFD YWGQGTITVTVSS
364	анти-CD19 (8B8-5A07), VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLN WYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCLQPGHYPGTFGQGTKLEIK
365	анти-CD19 (8B8-5D08), VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHW VRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTS DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSELF YWGQGTITVTVSS
366	анти-CD19 (8B8-5D08), VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLN WYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCLQLTHEPYTFGQGTKLEIK
367	анти-CD19 (8B8-5B08), VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHW VRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTS DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFD YWGQGTITVTVSS
368	анти-CD19 (8B8-5B08), VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLN WYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCLQLDSYPNTFGQGTKLEIK
369	анти-CD19 (8B8-5H09), VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHW VRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTS DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFD YWGQGTITVTVSS
370	анти-CD19 (8B8-5H09), VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLESSTGNTYLN WYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCLQLIDYPVTFGQGTKLEIK
371	димерный huOX40L (51-183), соединенный с помощью (G4S)2- линкера	QVSHRYPRIQSIKVFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKV QNNSVIINCDFYLIISLKGYSQEVNISLHYQKDEEPLF QLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDF HVNNGELILIHQNPGEFCVLGGGGSGGGGSQVSHRYP RIQSIKVFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVIIN CDFYLIISLKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRS

		VNSLMVASLTYKDKVYLVNTTDDNTSLDDFHVNGGELI LIHQNPGEFCVL
372	димерный huOX40L (52-183), соединенный с помощью (G4S)2- линкера	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQ NNSVIIINCDGFYLISLKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQ LKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNTTDDNTSLDDFHV VNGGELILIHQNPGEFCVLGGGGSGGGSVSHRYPRIQ SIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDG FYLISLKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNS LMVASLTYKDKVYLVNTTDDNTSLDDFHVNGGELILIH QNPGEFCVL
373	hu 4-1BBL (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRRVVAGEG SGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGL
374	hu 4-1BBL (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRRVV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
375	hu 4-1BBL (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGL

Общую информацию, касающуюся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов, см. у Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Аминокислоты цепей антител нумеровали и обозначали в соответствии с системой EU-нумерации согласно Кэботу (Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991), которая описана выше.

Примеры

Ниже представлены примеры способов и композиций, предлагаемых в изобретении. Как должно быть очевидно, можно воплощать на практике различные другие варианты осуществления изобретения в целом с учетом представленного выше описания изобретения.

Методы рекомбинантной ДНК.

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., Molecular cloning: A laboratory manual; изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии применяли согласно инструкциям производителей. Общую информацию, касающуюся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов, см. у Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во NIH, публикация N91-3242, 1991.

Секвенирование ДНК.

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования двух цепей.

Синтез генов.

Требуемые сегменты генов либо создавали с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц, либо синтезировали на фирме Genearth AG (Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-продуктов посредством автоматического синтеза генов. В тех случаях, когда точная генная последовательность не была доступна, создавали олигонуклеотидные праймеры на основе последовательностей ближайших гомологов и гены выделяли с помощью ОТ-ПЦР из РНК, полученной из соответствующей ткани. Сегменты генов, фланкированные единичными сайтами, распознаваемыми рестрикционными эндонуклеазами, клонировали в стандартных клонирующих/секвенирующих векторах. Плазмидную ДНК очищали из трансформированных бактерий и определяли концентрацию с помощью УФ-спектроскопии. Последовательность ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали ДНК-секвенированием. Создавали сегменты генов с требуемыми сайтами рестрикции, позволяющими субклонировать их в соответствующих экспрессионных векторах. Все конструкции создавали с 5'-концевой последовательностью ДНК, кодирующей лидерный пептид, который направляет секрецию белков в эукариотических клетках.

Методики культивирования клеток.

Применяли стандартные методики культивирования клеток, описанные в Current Protocols in Cell Biology, под ред. Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. и Yamada K.M., изд-во John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Очистка белков.

Белки очищали из профильтрованных супернатантов клеточных культур согласно стандартному протоколу. В целом, метод состоял в следующем: белки вносили в колонку с белок А-Сефарозой (фирма GE Healthcare, Швеция) и промывали с помощью ЗФР. Элюцию белков осуществляли при значении pH 2,8, после чего немедленно проводили нейтрализацию образца. Агрегированные белки отделяли от мономерных антител с помощью гель-фильтрации (Супердекс 200, фирма GE Healthcare) в ЗФР или в 20 mM гистидине, 150 mM NaCl, pH 6,0. Фракции мономерных антител объединяли, концентрировали (при необходимости), используя, например, центрифужный концентратор MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), замораживали и хранили при температуре -20 или -80°C. Часть образцов использовали для последующего аналитического анализа белков и аналитической характеристики, например, с помощью ДСН-ПААГ, гель-фильтрации (SEC) или масс-спектрометрии.

ДСН-ПААГ.

Гелевую систему NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen) применяли согласно инструкции производителя. В частности, применяли 10% или 4-12% гели NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) и подвижный буфер NuPAGE® MES (восстановленные гели с антиоксидантной добавкой для подвижного буфера NuPAGE®) или MOPS (невосстановленные гели).

Аналитическая гель-фильтрация.

Гель-фильтрацию (SEC) для определения агрегированного и олигомерного состояния антител осуществляли с помощью ЖХВР-хроматографии. В целом, метод состоял в следующем: очищенные на белке А антитела вносили в колонку Tosoh TSKgel G3000SW в 300 mM NaCl, 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5 в системе Agilent HPLC 1100 или в колонку Супердекс 200 (фирма GE Healthcare) в 2 × ЗФР в системе Dionex HPLC. Элюированные белки оценивали количественно с помощью УФ-абсорбции и интегрирования площадей пиков. В качестве стандарта служил BioRad Gel Filtration Standard 151-1901.

Масс-спектрометрия.

В этом разделе описана характеристика мультиспецифических антител с VH/VL-обменом (VH/VL CrossMab) в отношении их правильной сборки. Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с использованием ионизация электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных расщепленных плазмином или в альтернативном варианте дегликозилированных/ограничено расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч с использованием белка в концентрации 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли с использованием 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали посредством ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием системы maXis 4G UHR-QTOF MS (фирма Bruker Daltonik), снабженной источником TriVersa NanoMate (фирма Advion).

Определение связывания и аффинности связывания мультиспецифических антител с соответствующими антигенами с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (BIAcore).

Связывание созданных антител с соответствующими антигенами исследовали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство BIAcore (фирма GE Healthcare Biosciences AB, Уппсала, Швеция). В целом, метод состоял в следующем: для измерения аффинности антитела в виде козьих античеловеческих IgG, JIR 109-005-098 иммобилизовали на CM5-чипе с помощью аминного сочетания для презентации антител против соответствующего антигена. Связывание измеряли в HBS-буфере (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Твин 20, pH 7,4) при 25°C (или альтернативно этому при 37°C). Добавляли антиген (фирма R&D Systems или очищенный в лаборатории заявителей) в различных концентрациях в растворе. Ассоциацию измеряли путем инъекции антигена в течение промежутка времени, составляющего от 80 с до 3 мин; диссоциацию измеряли путем промывки поверхности чипа HBS-буфером в течение 3-10 мин и величину KD определяли с использованием модели связывания 1:1 Ленгмюра. Данные, полученные для отрицательного контроля (например, кривые для буфера) вычитали из кривых для образцов для коррекции на присущий системе сдвиг основного уровня и для снижения шумового сигнала. Использовали соответствующую программу BIAcore Evaluation для анализа сенсограмм и для расчета данных, касающихся аффинности.

Пример 1.

1.1. Получение нацеленных содержащих лиганд для человеческого 4-1BB в слиянии с Fc антиген-связывающих молекул.

Различные фрагменты последовательности ДНК, кодирующей часть эктодомена (аминокислоты 71-254, 52-254 и 80-254) человеческого лиганда для 4-1BB, синтезировали на основе последовательности P41273 из базы данных Uniprot (SEQ ID NO: 42).

В качестве компонентов для сборки антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд TNF, полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB, разделенных (G4S)₂-линкерами,

и слитый с CH1- или CL-доменом человеческого IgG1, клонировали, согласно схеме, представленной на фиг. 1А (человеческий лиганд для 4-1BB, (G₄S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G₄S)₂-коннектор, человеческий CH1 или CL), или представленной на фиг. 1В (человеческий CH3, (G₄S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G₄S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB).

Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB и слитый с CL- или CH1-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 1Б (человеческий лиганд для 4-1BB, (G₄S)₂-коннектор, человеческий CL или CH1), или представленной на фиг. 1Г (человеческий CH3, (G₄S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB).

Полинуклеотиды субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи человеческого IgG1 с необязательными пептидными линкерами, например в случае конструкции 1 полипептид, представляющий собой димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CH1-доменом, субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998), используя линкер (GSPGSSSSGS), имеющий SEQ ID NO: 57.

Последовательности ДНК вариативной области тяжелой и легкой цепи, кодирующие связывающий агент, специфический для фибробласт-активирующего белка (FAP), т.е. 28Н1, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной" (Carter, J. Immunol. Methods 248, 2001, сс. 7-15), либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Конструирование и получение связывающих FAP агентов описано в WO 2012/020006 А2, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

В табл. 1 обобщены характеристики полученных конструкций. Конструкции 1-10 отличались их геометрией, валентностью в отношении FAP, эктодоменом лиганда для 4-1BB, наличием кроссовера CH1- и CL-доменов (CrossMab-технология), мутациями в CH1- и CL-доменах и различными пептидными линкерами в полипептиде, содержащем один эктодомен лиганда для 4-1BB (мономерная цепь 4-1BBL).

Таблица 1. Характеризация полученных содержащих тримерный лиганд TNF антигенсвязывающих молекул (FAP разделенные тримеры 4-1BBL)

Конструкция	Валентность в отношении FAP	Связывающий FAP агент	Эктодомен 4-1BBL	«Скрещенные» CH1-CL-домены	Заряженные остатки	Линкер с 4-1BBL в легкой цепи
1.1	одновалентная	28Н1	71-254	нет	нет	(G ₄ S) ₂
1.2	одновалентная	28Н1	71-254	да (лиганд)	да (лиганд)	(G ₄ S) ₂
1.3	одновалентная	28Н1	71-254	да (FAP Fab)	да (лиганд)	(G ₄ S) ₂
1.4	одновалентная	28Н1	71-254	нет	да (лиганд)	(G ₄ S) ₂
1.5	двухвалентная	28Н1	71-254	нет	нет	(G ₄ S) ₂
1.6	одновалентная	28Н1	71-254	нет	да (лиганд)	(G ₄ S) ₁
1.7	двухвалентная	28Н1	71-254	да (лиганд)	да (лиганд)	(G ₄ S) ₂
1.8	двухвалентная	28Н1	71-254	да (FAP Fab, слитый с лигандом)	да (лиганд)	(G ₄ S) ₂
1.9	одновалентная	28Н1	52-254	нет	да (лиганд)	(G ₄ S) ₂
1.10	одновалентная	28Н1	80-254	нет	да (лиганд)	(G ₄ S) ₂

Во избежание ошибочного спаривания в большинстве конструкций одну пару CH1- и CL-доменов заменяли соответствующей другой (кроссовер доменов) согласно методу, описанному в WO 2009/080253 А1.

Для дополнительного повышения правильного спаривания интродуцировали различные заряженные аминокислоты в "скрещенные" или "нескрещенные" CH1- и CL-домены в виде заряженных остатков в конструкциях 2-4 и 6-10. В человеческий CL-домен интродуцировали мутации E123R Q124K, а мутации K147E и K213E клонировали в человеческом CH1-домене.

Для всех конструкций применяли технологию гетеродимеризации "knobs-into-holes" с мутациями S354C/T366W в CH3-домене цепи с "выступом" и соответствующими мутациями Y349C/T366S/L368A/Y407V в CH3-домене цепи с "впадиной" (Carter, J. Immunol. Methods 248, 2001, сс. 7-15).

Мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala интродуцировали в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами согласно методу, описанному в публикации Международной заявки на патент WO 2012/130831 А1.

Например, в конструкции 1 комбинация лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W в первом CH3-домене, с нацеленной конструкцией анти-FAP-Fc-цепь с "впадиной", содержащей мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V во втором CH3-домене, позволяла получать гетеродимер, который включал собранную конструкцию тримерного лиганда для 4-1BB и FAP-связывающего Fab (фиг. 2, график 1.1).

В табл. 2 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 1.1).

Таблица 2. Последовательности нацеленной на FAP содержащей тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.1)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
66	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1-Fc-цепь с «выступом»	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCC AGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGCTCTGGTACAG CGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCAGTGACAGGCGGCCTG AGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAG GCCGGCGTGTAACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGG GAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGC CCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCA GCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCG AGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCT GCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCAC ACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAG GGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGA TTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGG CGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAAGT GTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAG GGAATGTTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGA TTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGC AGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGA TACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTAT GTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGGCGGTGGTGGCTGGGG AGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCC ACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACT GTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGC GCCTTCGGGTTCGAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCG

		GACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAG CCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCT GGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG CCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGAAGCGGAGGG GGAGGAAGTGCTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTC TGGCCCTAGCAGCAAGAGCACAAAGTGGAGGAACAGCCG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACCGTGTCTTGGGAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTG CACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACT CTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCAGC AACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAA CTGCTGGTGGCCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCC AAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACC TGCGTGGTGGTCGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAATGC CAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTGCTGCACCAAGGAGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGT GGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAG
67	мономерный hu 4-1BBL (71-254)-CL	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGCGGCG CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAGAAGTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCT GCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGAGTGAACCCCG AGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGG AGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCACTTCCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC TACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
68	анти-FAР, Fc-цепь с «впадиной»	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTGCGCCGCCTCCGGCT

		TCACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGC TCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGGC TCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGT TCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCTGTACCT GCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGG GGACAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCA AGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCG GAGCCCTGACCTCCGCGCTGCACACCTTCCCCGCCGTGCT GCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACC GTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCC CACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGACGCTCTCGTGCGAGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCTCCCGTGC TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
69	анти-FAP, легкая цепь	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTGTCTCTGA GCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCTGCAGAGCCTCCCA GTCCGTGTCCCGGTCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCCAGGCCCCCTCGGTGCTGATCATCGGCGCCTCTA CCAGAGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGG CTCCGGCACCGACTTACCCTGACCATCTCCCGGTGGAA CCCGAGGACTTCGCCGTGTAATACTGCCAGCAGGGCCAGG TCATCCCTCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAAT CAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT
14	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1-Fc-цепь с «выступом»	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPAIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG

		LSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGSGGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
15	мономерный hu 4-1BBL (71-254) –CL1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGSGGGGSRVAAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNREGC
18	анти-FAP(28H1), Fc- цепь с «впадиной»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLR AEDTAVYYCAKGWLGNFYWGQGTTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
19	анти-FAP (28H1), легкая цепь	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPG QAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN REGC

В табл. 3 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 1.2) с CH1-CL-криссовером и заряженными остатками.

Таблица 3. Последовательности нацеленной на FAP содержащей тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 1.2)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
129	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGCTACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTA CTACTGCTGTTCTTTT CAGCTGGA ACTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCT GCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGG AGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGA ACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGA CAGGGAATGTTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGC TGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCT GGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGA AGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTA CTATGTGTTTTTTT CAGCTGGA ACTGAGGCGGGTGGTGGCT GGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGC AGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCT GACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAA CAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGC GCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCC AGAGCCC GG CATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCG GACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCG GAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT TATCTTCCACCCAGCGACCGGAAGCTGAAGTCTGGCACA GCCAGCGTCGTGTGCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGA GCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCA AGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCCA AGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGC TTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTC CATGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTT CCTGTTCCCCC CAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGC CGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC ACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCAC CGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA

		TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCCTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
130	мономерный hu 4-1BBL (71-254) –CH1*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCT GCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCCGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGTGGGCTGTTCAAGTGTGACCCCCG AGATTCTGCCGGCCTGCCTAGCCCTAGATCTGAAGGCGG CGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAGCACAAAGGG CCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTAGCAGCAAGAGCACA TCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGGGAAGATT ACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGC CCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCAGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGC CCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGT GGAACCCAAGTCTCTGC
68	анти-FAP, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 2
69	анти-FAP, легкая цепь	См. таблицу 2
115	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL* -Fc-цепь с «выступом»	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGSGGGGSGREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSRSEGGGSGGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASV VCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC DKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
116	мономерный hu 4-1BBL (71-254) –CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGSGGGGSGASTKGPSVFPLA
		PSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDE KVEPKSC
18	анти-FAP(28H1), Fc- цепь с «впадиной»	См. таблицу 2
19	анти-FAP (28H1), легкая цепь	См. таблицу 2

В табл. 4 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.3) (FAP разделенный тример с CH1-CL-кроссовером в анти-FAP Fab и заряженными остатками в содержащих 4-1BBL цепях).

Таблица 4. Последовательности нацеленной на FAP содержащей тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.3)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
131	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTAACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCT GCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTACAGAGTGACCCCG AGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGG AGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGA ACTGTCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGA CAGGGAATGTTGCCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGC TGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCT GGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGA AGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTA CTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCT GGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGC AGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCT GACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAA CAGCGCCTTCGGGTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGC GCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCC AGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCG GACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGAAGCG GAGGGGGAGGAAGTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGT TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGCA

		CAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCGA GCCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCC TGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTACCGTGCCTTCTAGCAG CCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAAACCTACACATGCCCACCGTGCCAGCAC CTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCCTACCGTCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTG AGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
132	мономерный hu 4-1BBL (71-254) –CL *	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAGAAGTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCT GCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGG AGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATCGGAAGTTGA AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
133	анти-FAР (VHCL) (28H1), Fc-цепь с «впадиной»	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTGCGCCGCCTCCGGCT TCACCTTCTCTCCACGCCATGTCTGGGTCCGACAGGC TCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCC TCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGT TCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCT GCAGATGAACCTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGG

		GGACAGGGCACCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCGTGG CCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAGCGACGAGCA GCTGAAGTCCGGCACAGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAATCCGTG ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC AAGGTGTACGCCTGCCAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACA AGACCCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGC TGGTGGCCCTTCCGTGTTCTGTTCACCCCAAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCCGACCCCGAAGTGACCTGCC TGGTGGTTCGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAATGCCAA GACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACGCTCTCGTG CGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
134	анти-FAР (VLCH1) (28H1), легкая цепь	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGAGCCTGA GCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAGCC AGAGCGTGAGCCGGAGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGA AGCCCCGGCCAGGCCCCAGACTGCTGATCATCGGCGCCAG CACCCGGGCCACCGGCATCCCCGATAGATTACGCGGCAGC GGCTCCGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCCGGCTGG AACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGGGCCA GGTGATCCCCCCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAA ATCAAGAGCAGCGCTTCCACCAAAGGCCCTCCGTGTTTC CTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAGGCACCGC TGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATTTTCCTGAGCCT GTGACAGTGTCTTGAATAGCGGAGCACTGACCTCTGGAG TGCATACTTTCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGAAGTAC AGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCT TGT
108	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSRSEGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

		VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
109	мономерный hu 4-1BBL (71-254) –CL*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFP PSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
135	анти-FAP (VHCL) (28H1), Fc-цепь с «впадиной»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYWGQGLTVTVSSASVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHCPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
136	анти-FAP (VLCH1) (28H1), легкая цепь	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPG QAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKS C

В табл. 5 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.4) (FAP разделенный тример с анти-FAP Fab, мономерный лиганд для 4-1BB, слитый с CH1-цепью с "выступом", и с заряженными остатками в содержащих 4-1BBL цепях).

Таблица 5. Последовательности нацеленной на FAP содержащей тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.4)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
137	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	AGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTG CTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCC AGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAG CGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCCTGACAGCGCGCTG

		AGCTACAAAGAGGACACCAAAAGAACTGGTGGTGGCCAAG GCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTCAGCTGGA ACTGCGGA GAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGC CCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGTCA GCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCG AGGCCCGGAATAGCGATTTGGGTTTCAAGGCCGGCTGCT GCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACTGGGAGTGCATCTGCAC ACAGAGGCCAGAGCCAGGCACGCCTGGCAGCTGACACAG GGCGCTACAGTGTCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGA TTCCTGCCGGCCTGCCTAGCCCTAGATCTGAAGCGCGCGG AGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAGCACCAAGGGCCC CTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGC GGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACT TCCCCGAGCCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCT GACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGT TCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTT CTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGA GCCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTG CCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGACCGTCAGTCTTCCCTC TTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTAACCCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTACGCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
138	димерный hu 4-1BBL (71-254) –CL*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGCTCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAAGAACTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGA ACTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCT GCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGG AGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGA ACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGA CAGGGAATGTTGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGC TGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCT GGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCTACAAAGA

		AGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGCTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCCTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAAAGAGCGCTTCGGGTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCCGCCATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
68	анти-FAP (28H1), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
69	анти-FAP (28H1), легкая цепь	См. таблицу 2
139	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
140	димерный hu 4-1BBL (71-254) –CL*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
18	анти-FAP (28H1), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
19	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 2

В табл. 6 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.5) (FAP разделенный тример с 2 анти-FAP Fab, димерный и мономерный лиганд для 4-1BB, слитый на C-конце каждой тяжелой цепи соответственно).

Таблица 6. Последовательности нацеленной на FAP содержащей тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.5)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
141	анти-FAP (28H1) - Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-254)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTGCGCCGCCTCCGGCT TCACCTTCTCCTCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGC TCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCC TCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGT TCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCT GCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGTGCAAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGG GGACAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCA AGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCG GAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCT GCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCAAC GTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCC CACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTACGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGC TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGTCAAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGA AGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGC CCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCA

		TGTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGA TGGCCCCCTGCTGCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGC GTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACC AAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG TTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCGGCGAAG GATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTG AGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATT TGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAG AGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGA CACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGC CTGTTCAGAGTGACCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTT CTCCAAGAAGCGAAGGCCGAGGGCGGATCTGGCGGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAAGTGTCCCTGACGATCCAGC CGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCAGCTG GTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCT GGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGG GGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAGAAGTGGTGGT GGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAA CTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTG TCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTG GCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAAGC CTTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCGAAGG ACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGACAGCGCCTGGGAGTG CATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGC TGAATCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGAC ACCTGAGATCCCTGCCGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
142	анти-FAP (28H1) - Fc- цепь с «выступом» слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTGCGCCGCTCCGGCT TCACCTTCTCCTCCACGCCATGTCTGGGTCCGACAGGC TCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCC TCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGT TCACCATCTCCCGGACAACTCCAAGAACACCTGTACCT GCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGA CTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGG GGACAGGGCACCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG GCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTCT ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGAGACAAAACCTCACACATGCC ACCGTGCCCAAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGT CTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCT CACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCTGCCCCCTGCAGAGATGAGCTGA

		CCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTT CTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTG GACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCG TGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCT GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAA GCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCC CCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCAT GTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGAT GGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCG TGTCACCTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCA AAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTT CTTTCAGCTGGAACCTGCGGAGAGTGGTGGCCGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGA GAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGA TCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTT GGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGA GGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGAC ACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCCCT GTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAA
69	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 2
121	анти-FAP (28H1) - Fc- цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4- 1BBL (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWLG NFDYWQGGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFVLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGGGGGS GGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGSGGGSGREGPE LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPPEIPAGLPSRSE
122	анти-FAP (28H1) Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWLG NFDYWQGGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFVLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGGGGGS GGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
		VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGGGGGS GGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
19	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 2

В табл. 7 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.6) (FAP разделенный тример с анти-FAP Fab, мономерный лиганд для 4-1BB, слитый с CL* через (G4S)-линкер).

Таблица 7. Последовательности нацеленной на FAP содержащей тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.6)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
131	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 4
143	мономерный hu 4-1BBL (71-254) –(G4S) ₁ -CL*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGCTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCGAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCT GCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCCGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGG AGGCGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT CTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGT
68	анти-FAP (28H1), Fc- цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
69	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 2
108	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 4
110	мономерный hu 4-1BBL (71-254) –(G4S) ₁ - CL*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGSRVTAAPSVFIFPPSDRK LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
18	анти-FAP (28H1), Fc- цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
19	анти-FAP (28H1) легкая цепь	см. таблицу 2

В табл. 8 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.7) (FAP разделенный тример с двойным анти-FAP Fab на N-конце Fc-цепи с "впадиной" и заряженными остатками в "скрещенных" CH1 и CL, слитых с лигандами для 4-1BB).

Таблица 8. Последовательности нацеленной на FAP содержащей тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.7)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
129	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 3
130	мономерный hu 4-1BBL (71-254) –CH1*	см. таблицу 3
144	[анти-FAP (28H1)] ₂ -Fc-цепь с «впадиной»	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTGCGCCGCCTCCGGCT TCACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGC TCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCC TCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGT TCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCT GCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGG GGACAGGGCACCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACA AAGGGACCTAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGT CTACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAA GGACTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACCTCT GGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACACCTTTCCAGCCGTGC TGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGAC AGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAACCAACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACGGCGGAGGGGGATCT GGCGGCGGAGGATCCGAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGC

		GGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCT GCGCCGCCTCCGGCTTCACTTCTCCTCCCACGCCATGTCC TGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCCTGGAATGGGTGT CCGCCATCTGGGCTCCGGCGAGCACTACTACGCCGACTC TGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAG AACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAA CTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCC AGCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACAGCGGGCGCACAGCCGCTCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGA GCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAA AACTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGGTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACGCTCTCGTG CGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGAACAACATAAGACC ACGCTCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
69	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 2
115	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 3
116	мономерный hu 4-1BBL (71-254) –CH1*	см. таблицу 3
145	[анти-FAP (28H1)] ₂ - Fc- цепь с «впадиной»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGE QYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KGWLGNFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR
		EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
19	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 2

В табл. 9 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 1.8) (FAP разделенный тример, лиганды для 4-1BB, слитые с анти-FAP CrossFab, с заряженными остатками, на цепи с "выступом").

Таблица 9. Последовательности нацеленной на FAP молекулы, содержащей тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) (конструкция 1.8)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
146	димерный hu 4-1BBL (71-254) – FAP (VHCL*)- Fc-цепь с «выступом»	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCAGTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTAACGTGTTCTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGTGCTGGCGCT GCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGG AGGCGGATCTGGCGGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGA ACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGA CAGGGAATGTTGCGCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGTCTGC TGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCT GGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGA AGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTA CTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCT GGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGC AGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCT GACTGTGGACCTGCCACCAGCCTTAGCGAGGCCAGAAA CAGCGCCTTCGGGTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGC GCCGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCC AGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCG GACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCG GAGGCGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCG GAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTG

		CGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCT GGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGT CCGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTC TGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAA CTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCC AGCGCTAGCGTGGCTGCACCATCTGTCTTTATCTTCCCACC CAGCGACCGGAAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGTCGT GTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGC CAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT ACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACC AGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGG CGAGTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCATGCCCTGCC CCTGAAGCTGTGGCGGCCCTAGCGTGTCTCTGTTCCCCC CAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTG AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCC TGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT GCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAGCGCT CCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAA
147	мономерный hu 4-1BBL (71-254) –FAP (VLCH1*)	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGTGTCTGGCGCT GCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCCGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGTGACCCCCG AGATTCTGCCGGCCTGCCTAGCCCTAGATCTGAAGGCGG CGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGAGATCGTGTGAC CCAGTCTCCCGCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGA GCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTGAGCCGG AGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCC CCAGACTGCTGATCATCGGCGCCAGCACCCGGGCCACCGG CATCCCCGATAGATTACGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGAC TTCACCCTGACCATCAGCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCG

		CCGTGTACTACTGCCAGCAGGGCCAGGTGATCCCCCCCAC CTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGTCCTTGCT AGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCTAGCA GCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCC TGGTGGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTG GAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGACACACCTTTCCA GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCG TCGTGACAGTGCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGC
68	анти-FAР (28Н1), Fc- цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
69	анти-FAР (28Н1), легкая цепь	см. таблицу 2
148	димерный hu 4-1BBL (71-254) – FAР (VHCL*)- Fc-цепь с «выступом»	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGSGREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSRSEGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSHAMSWMVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFY WGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNN FYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYCKCKVSNKALGAPIEKTKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
149	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – FAР (VLCH1*)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTL LSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRLLIIGAST RATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPP TFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC
18	анти-FAР (28Н1), Fc- цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
19	анти-FAР (28Н1), легкая цепь	см. таблицу 2

В табл. 10 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAР молекулы, содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (52-254) в слиянии с Fc (kih) (конструкция 1.9) (FAР разделенный тример с аминокислотами 52-254 эктодомена 4-1BBL и заряженными остатками в содержащих лиганд цепях).

Таблица 10. Последовательности нацеленной на FAP молекулы, содержащей тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) (конструкция 1.9)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
150	димерный hu 4-1BBL (52-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	CCTTGGGCTGTGTCTGGCGCTAGAGCCTCTCCTGGATCTG CCGCCAGCCCCAGACTGAGAGAGGGACCTGAGCTGAGCC CCGATGATCCTGCCGACTGCTGGATCTGAGACAGGGCAT GTTCCGCCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGAT GGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCG TGTCAGTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCA AAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTT CTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCGGCGAGGG ATCTGGATCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCCCCTG AGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATT TGGGTTTCAAGGCAGACTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAG AGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGA CACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGC CTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTGCCCA GCCCTAGATCTGAAGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAG GATCCCCCTGGGCTGTGTCTGGCGCTAGAGCCTCTCCTGG ATCTGCCGCCAGCCCCAGACTGAGAGAGGGACCTGAGCT GAGCCCCGATGATCCTGCCGGAAGTGTGGACCTGCGGCAG GGAATGTTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGA TTGACGGACCTCTGTCTGGTACTCCGACCCTGGCCTGGC AGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCTACAAAGAAGA TACAAAAGAAGTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTAT GTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGGCGGGTGGTGGCTGGGG AGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCC TCTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACT GTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGC GCCTTCGGGTTCGAAGGACGGCTGCTGCATCTGAGCGCCG GACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAG CCCGGCATGCTTGGCAGCTGACCCAGGGGGCAACTGTGCT GGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCCGCTGGCCTG CCTAGCCCAAGAAGTGAAGGGGGAGGCGGATCTGGCGGA GGGGGATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCC TGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG CTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATA GCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGC GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA

		GCTGCAGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAC CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA
151	мономерный hu 4-1BBL (52-254) –CL*	CCTTGGGCTGTGTCTGGCGCTAGAGCCTCTCCTGGATCTG CCGCCAGCCCCAGACTGAGAGAGGGACCTGAGCTGAGCC CCGATGATCCTGCCGACTGCTGGATCTGAGACAGGGCAT GTTCGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGAT GGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCG TGTAAGTACAGGCGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCA AAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTT CTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCGGCGAGGG ATCTGGATCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCCCTG AGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATT TGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAG AGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGA CACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGC CTGTTCAAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTT CTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCC CCATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCC TACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT
68	анти-FAР (28Н1), Fc- цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
69	анти-FAР (28Н1), легкая цепь	см. таблицу 2
111	димерный hu 4-1BBL (52-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	PWAVSGARASPGSAASPRREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGG GSGGGGSPWAVSGARASPGSAASPRREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL

		QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKISKAKGQPREPQVYTL PPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
112	мономерный hu 4-1BBL (52-254) –CL*	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGG SGGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	анти-FAP (28H1), Fc- цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
19	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 2

В табл. 11 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP молекулы, содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (80-254) в слиянии с Fc (kih) (конструкция 1.10) (FAP разделенный тример с аминокислотами 80-254 эктодомена 4-1BBL и заряженными остатками в содержащих лиганд цепях).

Таблица 11. Последовательности нацеленной на FAP молекулы, содержащей тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) (конструкция 1.10)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
152	димерный hu 4-1BBL (80-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	GATCCTGCCGGCCTGCTGGATCTGCGGCAGGGAATGTTTG CCCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCC CCTGAGCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCA CTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAA CTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTCTTTC AGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTG GCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCCTGAGAAG CGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTG CCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGT TTCAAGGCAGACTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGC CTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC

		AGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTGCCAGCCCTA GATCTGAAGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCCG ACCCAGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTCG TCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCT CTGTCTTGGTACTCCGACCCTGGCCTGGCAGGGGTGTCCC TGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAAC TGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTCA GCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGG ATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCTCTGCGCTCTG CTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCC ACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTC CAAGGACGGCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTG GGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTT GGCAGCTGACCCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCG CGTGACACCTGAGATCCCCGCTGGCCTGCCTAGCCCAAGA AGTGAAGGGGGAGGCGGATCTGGCGGAGGGGGATCTGCT AGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCA GCAAGAGCACCAGCGGGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCC TGGTCGAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCG TGGTCACCGTGCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACGAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCA CACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGG ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG CGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATGCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGTGTGCTG GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
153	мономерный hu 4-1BBL (80-254) – CL*	GATCCTGCCGGCCTGCTGGATCTGCGGCAGGGAATGTTTG CCCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCC CCTGAGCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCA CTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAA CTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTC AGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTG GCTCTGTGTCTTGGCCCTGCATCTGCAGCCCCTGAGAAG CGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTG CCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGT TTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGC CTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAA

		GAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTC GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCCATCT GATCGGAAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
68	анти-FAP (28H1), Fc- цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
69	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 2
113	димерный hu 4-1BBL (80-254) – CH1*-Fc-цепь с «выступом»	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSRSEGGGSGGGSDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA GAVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGSGG GGSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
114	мономерный hu 4-1BBL (80-254) –CL *	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSRSEGGGSGGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDRKLKS GTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
18	анти-FAP (28H1), Fc- цепь с «впадиной»	см. таблицу 2
19	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 2

1.2. Получение нацеленных на FAP (28H1) конструкций, содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc.

Кодирующие последовательности нацеленных содержащих тримерный лиганд TNF в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул клонировали в плазмидном векторе, в котором экспрессия вставки контролируется промотором MPSV и который содержит синтетическую полиА-последовательность, локализованную на 3'-конце CDS. Кроме того, вектор содержал последовательность OriP EBV для поддержки эписомальной формы плазмиды.

Нацеленную содержащую тримерный лиганд TNF в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающую молекулу получали путем котрансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессионными векторами для клеток млекопитающих с использованием полиэтиленimina (ПЭИ). Клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами в соотношении 1:1:1:1 (например, "вектор для конструкции димерный лиганд-(CH1 или CL)-цепь с "выступом": "вектор для слияния мономерный лиганд-(CL или CH1)": "вектор для тяжелой цепи с "впадиной" анти-FAP Fab": "вектор для легкой цепи анти-FAP") для получения конструкций 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10. Для двухвалентной конструкции 5 применяли соотношение 1:1:1 ("вектор для тяжелой цепи с "впадиной": "вектор для тяжелой цепи с "выступом": "вектор для легкой цепи анти-FAP").

Для производства в 500-миллилитровые встряхиваемые колбы засевали 300 млн клеток HEK293 EBNA за 24 ч до трансфекции. Для трансфекции клетки центрифугировали в течение 10 мин при 210×g и супернатант заменяли 20 мл предварительно нагретой среды CD CHO. Экспрессионные векторы (200 мкг общей ДНК) смешивали в 20 мл среды CD CHO. После добавления 540 мкл ПЭИ раствор интенсивно перемешивали в течение 15 с и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки смешивали с раствором ДНК/ПЭИ, переносили в 500-миллилитровую встряхиваемую колбу и инку-

бирова в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂. После инкубации добавляли 160 мл среды Excell, дополненной 6 mM L-глутамином, 5 г/л соевого пептида (PEPSOY) и 1,2 mM вальпроевой кислоты, и клетки культивировали в течение 24 ч. Через 1 день после трансфекции добавляли 12% Feed 7 и глюкозу (конечная концентрация 3 г/л). После культивирования в течение 7 дней супернатант собирали центрифугированием в течение 30-40 мин при 400×g. Раствор стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм-фильтр), дополняли азмидом натрия до конечной концентрации 0,01% (мас./об.) и выдерживали при 4°C.

Нацеленную содержащую тримерный лиганд TNF в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающую молекулу очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии с использованием белка A с последующей гель-фильтрацией. Для осуществления аффинной хроматографии супернатант вносили в колонку MabSelect Sure (CV = 5-15 мл, смола фирмы GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим 20мM фосфат натрия, 20 мM цитрат натрия (pH 7,5). Несвязанный белок удаляли путем промывки таким же буфером, используя его в объеме, кратном по меньшей 6 объемам колонки. Связанный белок элюировали, используя линейный градиент (20 CV) или ступенчатую элюцию (8 CV), буфером, содержащим 20 мM цитрат натрия, 100 мM хлорид натрия, 100 мM глицин (pH 3,0). При осуществлении элюции с использованием линейного градиента осуществляли дополнительную ступенчатую элюцию с применением объема, кратного 4 объемам колонки.

Значение pH собранных фракций регулировали, добавляя 1/10 (об./об.) 0,5M фосфата натрия, pH 8,0. Белок концентрировали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную раствором, содержащим 20 мM гистидин, 140 мM хлорид натрия, 0,01 об.% Твин 20, pH 6,0.

Концентрацию белка определяли путем измерения оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу нацеленной содержащей тримерный лиганд TNF в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя (5 мM 1,4-дителиотреитол) и без него и осуществляли окрашивание кумасси SimpleBlue™ SafeStain, (фирма Invitrogen, США) или с помощью КЭ-ДСН, используя устройство Caliper LabChip GXII (фирма Perkin Elmer). Содержание агрегатов в образцах анализировали, используя колонку для аналитической гель-фильтрации TSKgel G3000 SW XL (фирма Tosoh), уравновешенную подвижным буфером, содержащим 25 мM K₂HPO₄, 125 мM NaCl, 200 мM моногидрохлорид L-аргинина, 0,02% (мас./об.) NaN₃, pH 6,7 при 25°C.

В табл. 12 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономеров нацеленных на FAP содержащих тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул.

Таблица 12. Данные биохимического анализа нацеленных на FAP содержащих тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул

Конструкция	Выход [мг/л]	Мономер [%] (SEC)
конструкция 1.1	12,7	95
конструкция 1.2	25,2	97
конструкция 1.3	22	92
конструкция 1.4	14,2	99
конструкция 1.5	14	99
конструкция 1.6	12	98
конструкция 1.7	3,4	99
конструкция 1.8	5,4	98
конструкция 1.9	11,2	98
конструкция 1.10	19,8	99

1.3. Получение нацеленных содержащих тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

Аналогично нацеленным содержащим тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающим молекулам получали нацеленные на мышинный FAP содержащие тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы.

Последовательность ДНК, кодирующую часть эктодомена (аминокислоты 104-309) мышинного лиганда для 4-1BB, синтезировали на основе последовательности Q3U1Z9-1 из базы данных Uniprot (SEQ ID NO: 70). Для создания конструкции M.1 цистеины в положениях 137, 160 и 246 заменяли в результате мутации на серин с помощью стандартной ПЦР, в то время как для создания конструкции M.2 цистеин в положении 160 и 246 заменяли в результате мутации на серин (C160S).

Сборку мышинного лиганда осуществляли аналогично методу, описанному для человеческого 4-1BBL и представленному на фиг. 3А и 3Б. Димерный 4-1BBL, разделенный (G4S)₂-линкерами, сливали с CL-доменом мышинного IgG1 (фиг. 3А) и мономерный 4-1BBL сливали с CH-доменом мышинного IgG1 (фиг. 3Б). Полинуклеотид, который содержал димерный лиганд для 4-1BB, слитый с мышинным CL-доменом, субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи мышинного IgG1,

создавая конструкции, представленные на фиг. 3В.

Для мышиных конструкций интродуцировали мутации Lys392Asp и Lys409Asp (DD) в тяжелую цепь, содержащую мышиный 4-1BBL, и мутации Glu356Lys и Asp399Lys (KK) интродуцировали в тяжелую цепь, содержащую анти-FAP Fab, с получением асимметричных молекул (Gunasekaran K. и др., J. Biol. Chem., 285(25), 18 июня 2010 г., сс. 19637-19646).

Мутации Asp265Ala и Pro329Gly (DAPG) интродуцировали в константную область тяжелых цепей для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами.

В табл. 13 представлены соответственно кДНК и аминокислотные последовательности нацеленной на FAP содержащей тримерный мышиный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающей молекулы (конструкция М.1).

Таблица 13. Последовательности нацеленной на FAP мышиной конструкции М.1

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
71	димерный мышиный 4-1BBL (104-309, C137,160,246S) – CL-Fc-цепь с мутацией DD	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCACCACCAGC CCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACAACGCCGACCAAGTG ACCCCGTGTCCACATCGGCAGCCCCAATACCACACAGC AGGGCAGCCCTGTGTTCCGCAAGCTGCTGGCCAAGAACCA GGCCAGCCTGAGCAACACCACCCTGAACTGGCACAGCCA GGATGGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGCCAGGGCCTGAG ATACGAAGAGGACAAGAAAGAACTGGTGGTGACAGCCC TGGCCTGTACTACGTGTTCTGGAAGCTGAGCCCC ACCTTCACCAACACCGGCCACAAGGTGCAGGGCTGGGTGT CACTGGTGCTGCAGGCCAAACCCAGGTGGACGACTTCGA CAACCTGGCCCTGACCGTGGAAGTGTCCCCAGCAGCATG GAAAACAAGCTGGTGGATCGGAGCTGGTCCCAGCTTCTGC TGCTGAAGGCCGGACACAGACTGAGCGTGGGCCTGAGGG CTTATCTGCACGGCGCCCAGGACGCCTACAGAGACTGGGA GCTGAGCTACCCCAACACAACCAGCTTCGGCCTGTTCTC GTGAAGCCCCGACAACCCTTGGGAAGGCGGCGGAGGATCT GGCGGAGGCGGATCTAGAACAGAGCCTCGGCCTGCCCTG ACAATTACCACATCCCCCAATCTGGGCACCCGGGAAAAACA ATGCAGATCAAGTGACACCTGTGTCTCATATTGGCTCCCC AAACACTACCCAGCAGGGCTCCCCCGTGTGCTAAACTG CTGGCTAAAAATCAGGCCTCCCTGTCTAACACAACACTGA ACTGGCACTCCCAGGACGGCGCTGGCAGCTCTTACCTGAG TCAGGGACTGCGCTATGAGGAAGATAAGAAAGAACTGGT GGTGGATTCCCCCGACTGTACTATGTGTTTCTGGAACCTG AAACTGTCCCTACCTTTACAAATACCGGGCACAAAGTGC AGGGATGGGTGTCCCTGGTGCTGCAGGCTAAGCCTCAGGT GGACGATTTTGATAATCTGGCTCTGACAGTGGAAGTGT

		CCTAGCAGCATGGAAAACAAGCTGGTGGACAGAAGCTGG TCCCAGCTCCTGCTGCTGAAGGCCGGACACAGACTGAGCG TGGGCCTGAGAGCCTATCTGCACGGCGCCCAGGACGCCTA CAGAGACTGGGAGCTGAGCTACCCCAACACAACCAGCTT CGGCCTGTTCTCGTGAAGCCCCGACAACCCTTGGGAAGGC GGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGATCCAGAGCTGATGCT GCCCCCTACCGTGTCATCTTCCCACCCAGCAGCGAGCAGC TGACATCTGGGGGAGCTAGCGTCGTGTGCTTCTGAACAA CTTCTACCCCAAGGACATCAACGTGAAGTGGAAGATCGAC GGCAGCGAGCGGACAGAACGGCGTGCTGAATAGCTGGACC GACCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCATGAGCAGC ACCCTGACCCTGACCAAGGACGAGTACGAGCGGCACAAC AGCTACACATGCGAGGCCACCCACAAGACCAGCACCAGC CCCATCGTGAAGTCCTTCAACCGGAACGAGTGCGTGCCCA GAGACTGCGGCTGCAAGCCTTGCACTCTGCACCGTGCCTGA GGTGTCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAAGCCCAAGGAC GTGCTGACCATCACCTGACACCCAAAGTGACCTGCGTG TGGTGGCCATCAGCAAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCA GTTGGTTCGTGGACGACGTGGAAGTGCACACCGCTCAGAC CAAGCCCAGAGAGGAACAGATCAACAGCACCTTCAGAAG CGTGTCCGAGCTGCCCATCATGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAAGAATTCAAGTGCAGAGTGAACAGCGCCGCCTTT GGCGCCCCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGACCAAGGGC AGACCCAAGGCCCCCCAGGTGTACACAATCCCCCACCCA AAGAACAGATGGCCAAGGACAAGGTGTCCCTGACCTGCA TGATCACCAATTTCTTCCCAGAGGATATCACCGTGGAATG GCAGTGGAACGGCCAGCCCCGCCGAGAACTACGACAACAC CCAGCCTATCATGGACACCGACGGCTCCTACTTCGTGTAC AGCGACCTGAACGTGCAGAAGTCCAACCTGGGAGGCCGGC AACACCTTACCTGTAGCGTGCTGCACGAGGGCCTGCACA ACCACCACACCGAGAAGTCCCTGTCCCACAGCCCTGGCAA G
72	мономерный мышинный 4- IBBL (104-309, C137,160,246S) – CL	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCACCACCAGC CCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACAACGCCGACCAAGTG ACCCCGTGTCCACATCGGCAGCCCCAATACCACACAGC AGGGCAGCCCTGTGTTGCGCAAGCTGCTGGCCAAGAACCA GGCCAGCCTGAGCAACACCACCCTGAACCTGGCACAGCCA GGATGGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGCCAGGGCCTGAG ATACGAAGAGGACAAGAAAGAACTGGTGGTGGACAGCCC TGGCCTGTACTACGTGTTCTGGAAGTGAAGCTGAGCCCC ACCTTCACCAACACCGGCCACAAGGTGCAGGGCTGGGTGT CACTGGTGCTGCAGGCCAAACCCAGGTGGACGACTTCGA CAACCTGGCCCTGACCGTGGAAGTGTTCCTCCAGCAGCATG GAAAACAAGCTGGTGGATCGGAGCTGGTCCAGCTTCTGC TGCTGAAGGCCGGACACAGACTGAGCGTGGGCCTGAGGG CCTATCTGCATGGCGCCCAGGACGCCTACAGAGACTGGGA GCTGAGCTACCCCAACACAACCAGCTTCGGCCTGTTCTC GTGAAGCCCCGACAACCCTTGGGAAGGCGGCGGAGGCTCC GGAGGAGGCGGAAGCGCTAAGACCACCCCCCAGCGTG TACCCTCTGGCCCCCTGGATCTGCCGCCAGACCAACAGCA TGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGGCTACTTCCCCGA GCCTGTGACCGTGACCTGGAACAGCGGCAGCCTGAGCAG CGGCGTGACACCTTTCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTG TACACCTGAGCAGCTCCGTGACCGTGCTAGCAGCACCT GGCCAGCCAGACAGTGACCTGCAACGTGGCCACCCCTGC

		CAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATCGTGCCCCGGGACTGC
73	анти-FAP (28H1), Fc-цепь с мутацией КК в тяжелой цепи	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTGCGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCGGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCCTGGTCAACGTGTCCAGCGCTAAGACCACCCCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCCCCTGGATCTGCCGCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTGAAAGGGTACTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGACCTGGAACAGCGGAGCCTGAGCAGCGGCTGCACACCTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCTGAGCAGCTCCGTGACCGTGCCTAGCAGCACCTGGCCCAGCCAGACAGTGACCTGCAAAGTGGCCCCACCTGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAATCGTGCCCCGGGACTGCGGCTGCAAGCCCTGCATCTGCACCGTGCCCCGAGGTGTCCAGCGTGTTCATCTTCCACCCAAGCCCAAGGACGTGCTGACCATCACCTGACCCCAAAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCATCAGCAAGGACGACCCCGAGGTGCAGTTCTTGGTTTGTGGACGACGTGGAGGTGCACACAGCCCAGACAAAGCCCCGGGAGGAACAGATCAACAGCACCTTCAGAAGCGTGTCCGAGCTGCCCCATCATGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATTCAAGTGCAGAGTGAACAGCGCCGCCTTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCAGACCAAGGGCCCCCAGGTGTACACCATCCCCCACCAAAAAACAGATGGCCAAGGACAAGGTGTCCTGACCTGCATGATCACCAACTTTTTCCCCGAGGACATCACCGTGGAGTGGCAGTGGGAATGGCCAGCCCGCCGAGAATACAAGAACACCCAGCCCATCATGAAGACCGACGGCAGCTACTTCGTGTACAGCAAGCTGAACGTGCAGAAGTCCAAGTGGGAGGCCGGCAACACCTTACCTGTAGCGTGTGCACGAGGGCTGCACAACCACACACCGAGAAGTCCCTGAGCCACTCCCCCGGCAAG
74	анти-FAP (28H1), легкая цепь	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCTGCAGAGCCTCCCATCCTGTCTCCGGTCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCGGGCCAGGCCCCTCGGCTGCTGATCATCGGCGCCTCTACAGAGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTACCCCTGACCATCTCCCGGCTGGAAACCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGGGCCAGGTCATCCCTCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTGCCGATGCTGCACCAACTGTATCGATTTTCCCAACATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
75	димерный мышиный 4-1BBL (104-309,	RTEPRPALTITSPNLGTRENNADQVTPVSHIGSPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEED

	C137,160,246S) – CL-Fc- цепь с мутацией DD	KKELVVDSPGLYYVFLELKLSPFTNTGHKVQGWVSLVLQA KPQVDDFDNLALTVELFPSSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHR LSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTSFGLFLVKPDNPW EGGGGSGGGGSRTPEPRPALTITSPNLGTRENNADQVTPVSH IGSPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWSQDGAGSS YLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPFTNTGHK VQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPSSMENKLVDRS WSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTS FGLFLVKPDNPWEGGGGSGGGGSRAAAPTVSIFPPSSEQLT SGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQ DSKDYSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNECVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPK VTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTF RSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAGAPIEKTISKTKGR PKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQW NGQPAENYDNTQPMIDTDGSYFVYSDLVNQKSNWEAGNTF TCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK
76	мономерный мышинный 4- 1BBL (104-309, C137,160,246S) –CL	RTEPRPALTITSPNLGTRENNADQVTPVSHIGSPNTTQQGSP VFAKLLAKNQASLSNTTLNWSQDGAGSSYLSQGLRYEED KKELVVDSPGLYYVFLELKLSPFTNTGHKVQGWVSLVLQA KPQVDDFDNLALTVELFPSSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHR LSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTSFGLFLVKPDNPW EGGGGSGGGGSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVK GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS STWPSQTVTCNVAHPASSTKVDDKIVPRDC
77	анти-FAP (28H1), Fc-цепь с мутацией KK	EVQLESGLGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYWGQGLTVTVSSAKTT PPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHP ASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLIT LTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQ INSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAGAPIEKTISK TKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVE WQWNGQPAENYKNTQPMKTDGSYFVYSKLVNQKSNWEA GNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK
78	анти-FAP (28H1), легкая цепь	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDS KDYSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNEC

В табл. 14 представлены соответственно кДНК и аминокислотные последовательности "ненацеленной" (DP47) содержащей тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающей молекулы (контроль М.1).

Таблица 14. Последовательности "ненацеленной" мышинной конструкции контроль М.1

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
71	димерный мышинный 4-1BBL (104-309, C137,160,246S) – CL-Fc-цепь с мутацией DD	См. таблицу 13
72	мономерный мышинный 4-1BBL (104-309, C137,160,246S) – CH1	См. таблицу 13
154	DP47, Fc-цепь с мутацией KK	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT CACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGT AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGG CCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAAGACCAC CCCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCCCCTGGATCTGCCGCC AGACCAACAGCATGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTGAAGG GCTACTTCCCGAGCCTGTGACCGTGACCTGGAACAGCGG CAGCCTGAGCAGCGGCGTGACACCTTTCCAGCCGTGCTG CAGAGCGACCTGTACACCCTGAGCAGCTCCGTGACCGTGC CTAGCAGCACCTGGCCCAGCCAGACAGTGACCTGCAACGT GGCCCACCCTGCCAGCAGCACCAGGTGGACAAGAAAAT CGTGCCCCGGGACTGCGGCTGCAAGCCCTGCATCTGCACC GTGCCCCAGGTGTCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAAGC CCAAGGACGTGCTGACCATCACCTGACCCCCAAAGTGAC CTGCGTGGTGGTGGCCATCAGCAAGGACGACCCGAGGT GCAGTTCTCTTGGTTTGTGGACGACGTGGAGGTGCACACA GCCCAGACAAAGCCCCGGGAGGAACAGATCAACAGCACC TTCAGAAGCGTGTCCGAGCTGCCCATCATGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAAGAATTCAAGTGCAGAGTGAACAGCG CCGCCTTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGAC CAAGGGCAGACCCAAGGCCCCCAGGTGTACACCATCCC CCCACCAAAAAACAGATGGCCAAGGACAAGGTGTCCCT GACCTGCATGATCACCACCTTTTCCCCGAGGACATCACC GTGGAGTGGCAGTGGAATGGCCAGCCCGCCGAGAACTAC AAGAACACCCAGCCCATCATGAAGACCGACGGCAGCTAC TTCGTGTACAGCAAGCTGAACGTGCAGAAGTCCAACCTGGG AGGCCGGCAACACCTTACCTGTAGCGTGTGACGAGGG CCTGCACAACCACACACCGAGAAGTCCCTGAGCCACTCC CCCGGCAAG
155	DP47, легкая цепь	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTG GATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGT AGCTCACCGCTGACGTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAA ATCAAACGTGCCGATGCTGCACCAACTGTATCGATTTTCC

		CACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGT CGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAAT GTCAAGTGGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGC GTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGC ACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGAC GAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTC ACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAG GAATGAGTGT
75	димерный мышинный 4- 1BBL (104-309, C137,160,246S) – CL-Fc- цепь с мутацией DD	см. таблицу 13
76	мономерный мышинный 4- 1BBL (104-309, C137,160,246S) – CH1	См. таблицу 13
156	DP47, Fc-цепь с мутацией KK	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSGSFDYWGQGT LVT VSSAKTTPPS VYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQTVTCNV AHPASS TKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTP KVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTA QTKPREEQINS TFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFGAPIEKISKTK GRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQ WNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNT FTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK
157	DP47, легкая цепь	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQYQGSSPLTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNEC

В табл. 15 представлены кДНК и аминокислотные последовательности нацеленной на FAP содержащей тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающей молекулы (конструкция M2).

Таблица 15. Последовательности нацеленной на FAP мышинной конструкции M.2

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
158	димерный мышинный 4- 1BBL (104-309, C160S) – CL-Fc-цепь с мутацией DD	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCACCACCAGC CCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACAACGCCGACCAAGTG ACCCCGTGTCACATCGGCTGCCCCAATACCACACAGC AGGGCAGCCCTGTGTTCCGCAAGCTGCTGGCCAAGAACCA GGCCAGCCTGAGCAACACCACCCTGAACTGGCACAGCCA GGATGGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGCCAGGGCCTGAG ATACGAAGAGGACAAGAAAGAACTGGTGGTGACAGCCC

		TGGCCTGTACTACGTGTTCTCTGGAAGCTGAAGCTGAGCCCC ACCTTCACCAACACCGGCCACAAGGTGCAGGGCTGGGTGT CACTGGTGCTGCAGGCCAAACCCAGGTGGACGACTTCGA CAACCTGGCCCTGACCGTGGAAGTGTCCCCTGCAGCATG GAAAACAAGCTGGTGGATCGGAGCTGGTCCCAGCTTCTGC TGCTGAAGGCCGGACACAGACTGAGCGTGGGCCTGAGGG CTTATCTGCACGGCGCCAGGACGCCTACAGAGACTGGGA GCTGAGCTACCCCAACACAACCAGCTTCGGCCTGTTCTC GTGAAGCCCGACAACCCTTGGGAAGGCGGCGGAGGCTCC GGAGGAGGCGGATCTAGAACAGAGCCTCGGCCTGCCCTG ACAATTACCACATCCCCCAATCTGGGCACCCGGGAAAAACA ATGCAGATCAAGTGACACCTGTGTCTCATATTGGGTGCCC CAACTACTACCCAGCAGGGGTCCCCAGTGTGCTAAACTG CTGGCTAAAAATCAGGCCTCCCTGTCTAACACAACACTGA ATTGGCATAGTCAGGACGGGGCTGGCAGCAGCTACCTGTC TCAGGGACTGCGCTATGAGGAAGATAAGAAAGAACTGGT GGTGGATTCCCCCGGACTGTACTATGTGTTTCTGGAAGTG AAACTGTCCCCTACCTTTACAAATACCGGGCACAAGGTGC AGGGATGGGTGTCCCTGGTGCTGCAGGCTAAGCCTCAGGT GGACGATTTTGATAATCTGGCTCTGACAGTGGAAGTGT CCTTGCTCTATGGAAAAACAACTGGTGGACCGCTCTTGGA GCCAGTTGCTGCTGCTGAAAGCTGGCCACCGCTGTCTGT GGGACTGAGAGCATACCTGCATGGGGCACAGGATGCCTA CCGGGATTGGGAAGTGTCTACCTAACACTACTTCTTC GGACTGTTCTCGTGAAACCTGATAATCCCTGGGAGGGCG GAGGCGGAAGTGGCGGAGGGGGATCCAGAGCTGATGCTG CCCCTACCGTGTCCATCTTCCCACCCAGCAGCGAGCAGCT GACATCTGGGGGAGCTAGCGTCTGTGCTTCTGAACAAC TTCTACCCCAAGGACATCAACGTGAAGTGGAAGATCGAC GGCAGCGAGCGGCAGAACCGCGTGCTGAATAGCTGGACC GACCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCATGAGCAGC ACCCTGACCCTGACCAAGGACGAGTACGAGCGGCACAAC AGCTACACATGCGAGGCCACCCACAAGACCAGCACCAGC CCCATCGTGAAGTCCTTCAACCGGAACGAGTGCGTGCCCA GAGACTGCGGCTGCAAGCCTTGCTGCTGACCGTGCTGGA GGTGTCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAAAGCCCAAGGAC GTGCTGACCATCACCTGACACCCAAAGTGACCTGCGTG TGGTGGCCATCAGCAAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCA GTTGGTTCGTGGACGACGTGGAAGTGCACACCGCTCAGAC CAAGCCCAGAGAGGAACAGATCAACAGCACCTTCAGAAG CGTGTCCGAGCTGCCCATCATGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAAGAATTCAAGTGCAAGTGAACAGCGCCGCCTTT GGCGCCCCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGACCAAGGGC AGACCCAAAGCCCCCAGGTGTACACAATCCCCCACC AAGAACAGATGGCCAAGGACAAGGTGTCCCTGACCTGCA TGATACCAATTTCTTCCCAGAGGATATCACCGTGGAATG GCAGTGGAACGGCCAGCCCGCCGAGAACTACGACAACAC CCAGCCTATCATGGACACCGACGGCTCCTACTTTCGTGTAC AGCGACCTGAACGTGCAGAAGTCCAAGTGGGAGGCGGC AACACCTTCACCTGTAGCGTGCTGCACGAGGGCTGCACA ACCACCACACCGAGAAGTCCCTGTCCCACAGCCCTGGCAA G
159	мономерный мышиный 4-1BBL (104-309, C160S)	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCACCACCAGC CCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACAACGCCGACCAAGTG

	– CH1	ACCCCGTGTCCACATCGGCTGCCCCAATACCACACAGC AGGGCAGCCCTGTGTTCCGCCAAGCTGCTGGCCAAGAACCA GGCCAGCCTGAGCAACACCACCCTGAACTGGCACAGCCA GGATGGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGCCAGGGCCTGAG ATACGAAGAGGACAAGAAAGAACTGGTGGTGACAGCCC TGGCCTGTACTACGTGTTCCCTGGAAGCTGAAGCTGAGCCCC ACCTTCACCAACACCGGCCACAAGGTGCAGGGCTGGGTGT CACTGGTGTCTGCAGGCCAAACCCAGGTGGACGACTTCGA CAACCTGGCCCTGACCGTGGAAGCTGTTCCCTGCAGCATG GAAAACAAGCTGGTGGATCGGAGCTGGTCCCAGCTTCTGC TGCTGAAGGCCGGACACAGACTGAGCGTGGGCCTGAGGG CTTATCTGCACGGCGCCCAGGACGCCTACAGAGACTGGGA GCTGAGCTACCCCAACACAACCAGCTTCGGCCTGTTCTCT GTGAAGCCCGACAACCCTTGGGAAGGCGGCGGAGGCTCC GGAGGAGGCGGAAGCGCTAAGACCACCCCCCAGCGTG TACCCTCTGGCCCTGGATCTGCCGCCAGACCAACAGCA TGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGGCTACTTCCCCGA GCCTGTGACCGTGACCTGGAACAGCGGCAGCCTGAGCAG CGGCGTGCACACCTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTG TACACCCTGAGCAGCTCCGTGACCGTGCCTAGCAGCACCT GGCCCAGCCAGACAGTGACCTGCAACGTGGCCCCACCCTGC CAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATCGTGCCCCGGGA CTGC
73	анти-FAP (28H1), Fc- цепь с мутацией KK	см. таблицу 13
74	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 13
160	димерный мышинный 4- 1BBL (104-309, C160S) – CL-Fc-цепь с мутацией DD	RTEPRPALTITTSPLNGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGSP VFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEED KKELVVDSPGLYYVFLELKLSPFTNTGHKVQGWVSLVLQA KPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLKAGHR LSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTSFGLFLVKPDNPW EGGGGSGGGSRTEPRPALTITTSPLNGTRENNADQVTPVSH IGCPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDGAGSS YLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPFTNTGHK VQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRS WSQLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTS FGLFLVKPDNPWEGGGGSGGGSRADAAPTVSIFPPSSEQLT SGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQ DSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNECVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPK VTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTF RSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAFAFGAPIEKTISKTKGR PKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQW NGQPAENYDNTQPMIDTDGSYFVYSDLVNQKSNWEAGNTF TCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK
161	мономерный мышинный 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1	RTEPRPALTITTSPLNGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGSP VFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEED KKELVVDSPGLYYVFLELKLSPFTNTGHKVQGWVSLVLQA KPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLKAGHR LSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTSFGLFLVKPDNPW EGGGGSGGGSAKTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVK GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS
		STWPSQTVTCNVAPASSTKVDKKIVPRDC
77	анти-FAP (28H1), Fc- цепь с мутацией KK	см. таблицу 13
78	анти-FAP (28H1), легкая цепь	см. таблицу 13

В табл. 16 представлены кДНК и аминокислотные последовательности "ненацеленной" (DP47) со-
держашей тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающей молекулы (кон-
троль M.2).

Таблица 16. Последовательности "ненацеленной" мышиной конструкции (контроль М.2)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
158	димерный ми 4-1BBL (104-309, C160S) – CL-Fc-цепь с мутацией DD	См. таблицу 15
159	мономерный ми 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1	См. таблицу 15
154	DP47, Fc-цепь с мутацией KK	См. таблицу 14
155	легкая цепь DP47	См. таблицу 14
160	димерный ми 4-1BBL (104-309, C160S) – CL-Fc-цепь с мутацией DD	См. таблицу 15
161	мономерный ми 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1	См. таблицу 15
156	DP47, Fc-цепь с мутацией KK	См. таблицу 14
157	легкая цепь DP47	См. таблицу 14

Содержание мышиный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы получали и очищали согласно методу, описанному выше для содержащих человеческий 4-1BBL конструкций.

В табл. 17 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономеров нацеленных на FAP и "ненацеленных" содержащих тримерный мышиный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

Таблица 17. Обобщение характеристик полученных нацеленных на FAP и "ненацеленных" содержащих мышиный тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул

Конструкция	Выход [mg/l]	Мономер [%] (SEC)
конструкция М.1	2,6	95
контроль М.2	2,3	96
конструкция М.2	8,5	98
контроль М.2	8,1	97

1.4. Получение и очистка "ненацеленных" содержащих тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул (контрольные молекулы).

Контрольные молекулы получали согласно методу, описанному выше для нацеленных на FAP конструкций 1 и 2, с единственным различием, состоящим в том, что анти-FAP связывающий агент (VH-VL) заменяли на антитело зародышевой линии, обозначенное DP47, не связывающееся с антигеном. Контроль представлял собой "ненацеленную" одновалентную конструкцию разделенного тримерного человеческого лиганда для 4-1BB-Fc (kih) (контроль А, фиг. 5А), а в случае контроля Б конструкция содержала также CH-CL-кроссовер с заряженными остатками (фиг. 5Б). Последовательности ДНК переменных областей тяжелой и легкой цепей FAP-связывающего агента заменяли на ДНК контрольной зародышевой линии (DP47) и субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "выступом", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

"Ненацеленные" содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязанные молекулы получали согласно методу, описанному выше для нацеленных на FAP конструкций. Клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами в соотношении 1:1:1:1 ("вектор для конструкции димерный лиганд-CH1 или -CL*-цепь с "выступом": "вектор для слияния мономерный лиганд-CL или -CH1*": "вектор для тяжелой цепи с "впадиной" DP47 Fab": "вектор для легкой цепи DP47").

В табл. 18 представлены соответственно кДНК и аминокислотные последовательности "ненацеленной" (DP47) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) антигенсвязывающей молекулы (контроль А).

Таблица 18. Последовательности "ненацеленной" (DP47) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) антигенсвязывающей молекулы (DP47 разделенный тример 4-1BBL) (контроль А)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
66	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1-Fc – цепь с «выступом»	См. таблицу 2
67	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CL	См. таблицу 2
79	DP47, Fc-цепь с «впадиной»	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT CACCTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGT AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC CGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGG CCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGCTGGAAGCTCAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGCTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAAGCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

80	легкая цепь DP47	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGACAGGGCCAGTCA GAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAA CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGT AGCTCACCGCTGACGTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAA ATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGAGGCCAAA GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAG GGGAGAGTGT
14	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 2
15	мономерный hu 4-1BBL (71-254) -CL	См. таблицу 2
81	DP47, Fc-цепь с «впадиной»	EVQLLESGLVLPQGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGSFGDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	легкая цепь DP47	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNFPYPREAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEK

В табл. 19 представлены кДНК и аминокислотные последовательности "ненацеленной" (DP47) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы с CH1-CL-кроссовером и заряженными остатками в плечах, содержащих лиганд для 4-1BB (контроль Б).

Таблица 19. Последовательности "ненацеленной" (DP47) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (DP47 разделенный тример 4-1BBL) (контроль Б)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
96	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 3
97	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	См. таблицу 3
79	DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
80	легкая цепь DP47	См. таблицу 18
98	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 3
99	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	См. таблицу 3
81	DP47-Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
82	легкая цепь DP47	См. таблицу 18

В табл. 20 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономеров "ненацеленных" (DP47) содержащих тримерный лиганд для 4-1BBL в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул.

Таблица 20. Обобщение характеристик полученных "ненацеленных" (DP47) содержащих тример 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул (контрольные молекулы)

Конструкция	Мономер [%] (SEC)	Выход [мг/л]	ЖХ/МС (без восстановл.)
контроль А	97	3,7	теоретическое значение*: 179069,7 Да экспериментальное значение: 179116,2 Да * без концевых лизинов
контроль Б	99	15,4	

Пример 2.

2.1. Получение нацеленных на FAP (4B9) содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

Различные фрагменты последовательности ДНК, кодирующей часть эктодомена (аминокислоты 71-254 и 71-248) человеческого лиганда для 4-1BB, синтезировали на основе последовательности P41273 из базы данных Uniprot (SEQ ID NO: 42).

2.1.1. Получение одновалентной нацеленной на FAP (4B9) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 2.1).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных (G4S)₂-линкерами, и слитый с CL-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 1А: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL.

Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254) и слитый с CH1-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 1Б: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH.

Полипептид, кодирующий димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL-домером, субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998), используя линкер (G4S)₂ или в альтернативном варианте (GSPGSSSSGS).

Для повышения правильного спаривания интродуцировали следующие мутации в "скрещенные" CH-CL-домены. В димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL, интродуцировали мутации E123R и Q124K. В мономерном лиганде для 4-1BB, слитым с человеческим CH1, мутации K147E и K213E клонировали в человеческом CH1-домене.

Последовательности ДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для фибробласт-активирующего белка (FAP), клон 4B9, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Конструирование и получение связывающих FAP агентов описано в WO 2012/020006 A2, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala интродуцировали в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами согласно методу, описанному в публикации Международной заявки на патент WO 2012/130831.

Для всех конструкций использовали технологию гетеродимеризации "knobs-into-hole" с мутациями S354C/T366W в цепи с "выступом" и соответствующими мутациями Y349C/T366S/L368A/Y407V в цепи с "впадиной".

Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-FAP-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-FAP, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и FAP-связывающий Fab (фиг. 4, конструкция 2.1).

В табл. 21 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP (4B9) содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы, содержащей CH1-CL-кроссовер и заряженные остатки (конструкция 2.1).

Таблица 21. Последовательности одновалентной нацеленной на FAP (4B9) молекулы, содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) (конструкция 2.1)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
129	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 3
130	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	См. таблицу 3
162	анти-FAP (4B9), Fc-цепь с «впадиной»	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAG CCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCT TCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC CCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGC TCTGGCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGT ACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCG TGTAATACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTA CTGGGGACAGGGCACCCCTGGTCAAGTGTCCAGCGCTAGC ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCA AGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTCTGAA CAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCC GTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGG TCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACAC ATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACC GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA

		GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTCTCGTGCGCAGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
163	легкая цепь анти-FAP (4B9)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTGTCTCTGA CCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCTCTGCAGAGCCTCCAG TCCGTGACCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGC CCGGCCAGGCCCCCTCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCG GAGAGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGC TCCGGCACCGACTTACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAAC CCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGGGCATCAT GCTGCCCCCACCTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATC AAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT GTGCCGTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT
115	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 3
116	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	См. таблицу 3
164	анти-FAP (4B9), Fc-цепь с «впадиной»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
125	легкая цепь анти-FAP (4B9)	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPG QAPRLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF NRGEC

2.1.2. Получение одновалентной нацеленной на FAP (4B9) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 2.2).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных (G4S)₂-линкерами, и слитый с CL-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 1А: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL.

Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254) и слитый с CH1-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 1Б: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH1.

Полинуклеотид, кодирующий димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL-доменом, субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998), используя линкер (G4S)₂ или в альтернативном варианте (GSPGSSSSGS).

Последовательности ДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для фибробласт-активирующего белка (FAP), клон 4B9, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala интродуцировали в константную область тяжелых це-

пей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами (WO 2012/130831).

Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-FAP-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-FAP, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и FAP-связывающий Fab (фиг. 4, конструкция 2.2).

В табл. 22 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP (4B9) содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы, содержащей CH1-CL-кроссовер без заряженных остатков (конструкция 2.2).

Таблица 22. Последовательности одновалентной нацеленной на FAP (4B9) молекулы, содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih), (конструкция 2.2)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
165	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL-Fc-цепь с «выступом»	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGCTACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCT GCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGTCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGG AGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGA ACTGTCCCCGTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGA CAGGGAATGTTGCGCCAGCTGGTGGCTCAGAAATGTGCTGC TGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCT GGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCTACAAAGA AGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGT CTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCT GGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGC AGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCT GACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAA CAGCGCCTTCGGGTTCGAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGC GCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCC AGAGCCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCG GACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCG GAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCCGCTCCCTCCGTGTT TATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACC GCCTCCGTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTACCCTAGGG AAGCTAAAGTGCAGTGGAAGTGGATAACGCACTGCACT CCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCA AGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTGTC TAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTGTCTCTGCCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTT CTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCC GGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCA CGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGG CGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA

		AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAACCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACT CCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
166	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGTGGCGCT GCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCCGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCTCTGCCGGCCTGCCTAGCCCTAGATCTGAAGGCGG CGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAGCACCAAAGG CCCTTCCGTGTTTCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCT CTGGAGGCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTA TTTTCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGAATAGCGGAGCA CTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCGCTGTGCTGCAGT CCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTG GAACCCAAGTCTTGT
162	анти-FAP (4B9), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 21
163	легкая цепь анти- FAP (4B9)	См. таблицу 21
117	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL-Fc-цепь с «выступом»	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC KTHTCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
118	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC
164	анти-FAP (4B9), F-цепь с «впадиной»	См. таблицу 21
125	легкая цепь анти-FAP (4B9)	См. таблицу 21

2.1.3. Получение двухвалентной нацеленной на FAP (4B9) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы, в которой димерный и мономерный лиганды для 4-1BB слиты на C-конце каждой тяжелой цепи (конструкция 2.3).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных $(G_4S)_2$ -линкерами, сливали с С-концом Fc-цепи с "впадиной" человеческого IgG1, получая согласно схеме, представленной на фиг. 1B: Fc-цепь с "впадиной" человеческого IgG1, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254) и слитый с С-концом Fc-цепи с "выступом" человеческого IgG1, получали согласно схеме, представленной на фиг. 1Г: Fc с "выступом" человеческого IgG1, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB.

Полинуклеотид, кодирующий димерный лиганд для 4-1BB, субклонировали в рамке считывания на С-конце CH2- и CH3-доменов тяжелой цепи с "впадиной" 4 человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998), используя $(G_4S)_2$ -коннектор. Полинуклеотид, кодирующий мономерный лиганд для 4-1BB, субклонировали в рамке считывания на С-конце CH2- и CH3-доменов тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998), используя $(G_4S)_2$ -коннектор.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для фибробласт-активирующего белка (FAP), клон 4B9, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", с "выступом", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala интродуцировали в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами (WO 2012/130831).

Комбинация: анти-FAP huIgG1, содержащая димерный лиганд цепь с "впадиной" с мутациями Y349C/T366S/L368A/Y407V, анти-FAP huIgG1, содержащая мономерный лиганд цепь с "выступом" с мутациями S354C/T366W, и легкая цепь анти-FAP, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и два FAP-связывающих Fab (фиг. 4, конструкция 2.3).

В табл. 23 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на FAP (4B9) молекулы, содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) (конструкция 2.3) (FAP разделенный тример с 2 анти-FAP Fab, димерный и мономерный лиганды для 4-1BB, слитые на С-конце каждой тяжелой цепи соответственно).

Таблица 23. Последовательности двухвалентной нацеленной на FAP (4B9) молекулы, содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) (конструкция 2.3)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
167	анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-254)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCG GCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC ATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGC GGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCCTGGTCACAGT GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCGAGCGGCGGCACAGCCG CTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCCG TGACCGTGTCTTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTG TATAGCCTGAGCAGCGTGGTCAACCGTGCCTTCTAGCAGC CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCA AGAGCTGCGACAAAACACACATGCCCCACCGTGCCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC CCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA

		AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGG CTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGG CGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCT GAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTG CGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAAGCGTG CTGCTGATCGATGGCCCCCTGCTCTGGTACAGCGATCCT GGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTA CAAAGAGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCG GCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAG TGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAG CTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCG AGGCCCCGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGAC ACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGG ACCCGAAGTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGA TCTGAGACAGGGAATGTTGCGCCAGCTGGTGGCTCAGA ATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCG ACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTG TCCTACAAAGAAGATACAAAGAAGTGGTGGTGGCTAA AGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGA GCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCT GGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGC AGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTC TAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCGAAGGAC GCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTG CATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCA GCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGT GACACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATC AGAA
168	анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCG GCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC ATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTAATACTGCGCCAAGGGATGGTTCCGC GGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCCTGGTCACAGT

		GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCTGACCAGCGGG GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAG CACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGC TTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA CGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTG TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAAAC TGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTG TTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGCGGAG GCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCC TGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCT GCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGT GCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTA CAAAGAGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCG GCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAG TGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTCAG CTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCG AGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGAC ACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
163	Легкая цепь анти-FAP (4B9)	см. табл. 21
123	анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNYWGQTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVCTLPISRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS

		LSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGV YYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
124	анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BB (71-254)	EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
125	легкая цепь анти-FAP (4B9)	См. таблицу 21

2.1.4. Получение одновалентной нацеленной на FAP (4B9) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 2.4).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-248), разделенных $(G_4S)_2$ -линкерами, в слиянии с CL-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 1А: человеческий лиганд для 4-1BB, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-248), в слиянии с CH-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 1Б: человеческий лиганд для 4-1BB, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий CH1.

Полинуклеотид, кодирующий димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL-доменом, субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998), используя линкер $(G_4S)_2$ или в альтернативном варианте (GSPGSSSSGS). Для улучшения правильного спаривания интродуцировали указанные ниже мутации в "скрещенные" CH-CL: в димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL, мутации E123R и Q124K; в мономерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CH1, мутации K147E и K213E.

Последовательности ДНК, кодирующие вариabельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для фибробласт-активирующего белка (FAP), клон 4B9, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala интродуцировали в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами (WO 2012/130831).

Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-FAP-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-FAP, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и FAP-связывающий Fab (фиг. 4, конструкция 2.4).

В табл. 24 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP (4B9) содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы, содержащей CH1-CL-кроссовер с заряженными остатками (конструкция 2.4).

Таблица 24. Последовательности одновалентной нацеленной на FAP (4B9) молекулы, содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih), (конструкция 2.4)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
169	димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL* - Fc-цепь с «выступом»	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCC
		AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCC GCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCA GCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGGAAGTGGGAGGCGGCGATCTGGCGGCG GAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCCTGACGATC CAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTTCGCCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTG AGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGA CTGGGGGACTGTCTACAAAGAAGATACAAAGAACTGG TGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTCAGCT GGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGGGAGGGCTCAGGATC TGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCA GCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCC CAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCA AGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCCCTGGG AGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGCATGCTTGG CAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCG TGACACCTGAGATCCCCGCTGGACTGGGCGGAGGCGGTTT CGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTC TTTATCTTCCACCCAGCGACCCGGAAGCTGAAGTCTGGCA CAGCCAGCGTCTGTGCTGCTGAATAACTTCTACCCCG CGAGGCCAAGGTGCAAGTGGAAAGGTGGACAATGCCCTGCA GAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAG CAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGC GAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAG AGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCACTGCTG CCTCCATGCCCTGCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCG TGTTCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG TCCCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGG ACGGCGTGGAAGTGACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCT CACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
170	мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCC

		AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCC GCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCA GCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGGGTTTCAAGGCGAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCAGCCGGACTGGGAGGCGGAGGTTCCGGAGGCG GAGGATCTGCTAGCACAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCT GGCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGC CCTGGGCTGCCTGGTGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCTTGAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGC ACACCTTTCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACTC TCTGAGCAGCGTCTGACAGTGGCCAGCAGCTCTCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCCAGC AACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGC
162	анти-FAP (4B9), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 21
163	анти-FAP (4B9), легкая цепь	см. таблицу 21
119	димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDL RQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGG SGGGGSRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
120	мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSASTKGPSVFLAPSSKST SGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDEKVEPK SC
164	анти-FAP (4B9), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 21
125	анти-FAP (4B9), легкая цепь	см. таблицу 21

2.1.5. Получение одновалентной нацеленной на FAP (4B9) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 2.5).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-248), разделенных $(G_4S)_2$ -линкерами, в слиянии с CL-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 1А: человеческий лиганд для 4-1BB, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-248), в слиянии с CH-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 1Б: человеческий лиганд для 4-1BB, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий CH.

Полинуклеотид, кодирующий димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL-доменом, субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998), используя линкер $(G_4S)_2$ или в альтернативном варианте (GSPGSSSSGS).

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для фибробласт-активирующего белка (FAP), клон 4B9, субклонировали в

рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala интродуцировали в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами (WO 2012/130831).

Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-FAP-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-FAP, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и FAP-связывающий Fab (фиг. 4, конструкция 2.5).

В табл. 25 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP (4B9) содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы, содержащей CH1-CL-кроссовер без заряженных остатков (конструкция 2.5).

Таблица 25. Последовательности одновалентной нацеленной на FAP (4B9) молекулы, содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih), (конструкция 2.5)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
171	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCC GCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCA GCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGGAAGTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCG GAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCTGACGATC CAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTTCGCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTG AGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGA CTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAAGTGG TGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCT GGAAGTGAAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATC TGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCA GCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCC CAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTC AGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGG AGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCCGGCATGCTTGG CAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCG TGACACCTGAGATCCCCGCTGGACTGGGCGGAGGCTGCTC CGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCCGCTCCCTCCGTG TTTATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCA CCGCTCCGTCTGTGTCTGCTGAACAATTTTACCTAGG GAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAG TCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCA AGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTGTC TAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTTGTCTCTGCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTT CTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCC GGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCA CGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGG CGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACC GTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC

		AGGTGTACACCCTGCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGAGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
172	мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGCTCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCC GCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCA GCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACA CAGGGCGCTACAGTGTCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGACTGGGAGGCGGAGGTTCCGGAGGCG GAGGATCTGCTAGCACCAAAGGCCCTTCCGTGTTTCTCT GGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAGGCACCGCTGCT CTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATTTCTCTGAGCCTGTGA CAGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACCTCTGGAGTGA TACTTTCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGACTGTACAGCC TGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCAAGCAGCAGCCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT
162	анти-FAP (4B9), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 21
163	анти-FAP (4B9), легкая цепь	см. таблицу 21
173	димерный hu 4-1BBL (71- 248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGREGPELSPDDPAGLLDL RQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAAGVYVFFQLELRRVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGG SGGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
174	мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SC
164	анти-FAP (4B9), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 21
125	анти-FAP (4B9), легкая цепь	см. таблицу 21

2.1.6. Получение двухвалентной нацеленной на FAP (4B9) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы, в которой димерный и мономерный

лиганды для 4-1BB слиты на С-конце каждой тяжелой цепи (конструкция 2.6).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-248), разделенных $(G_4S)_2$ -линкерами, сливали с С-концом Fc-цепи с "впадиной" человеческого IgG1, получая согласно схеме, представленной на фиг. 1B: Fc-цепь с "впадиной" человеческого IgG1, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254) и слитый с С-концом Fc-цепи с "выступом" человеческого IgG1, получали согласно схеме, представленной на фиг. 1Г: Fc с "выступом" человеческого IgG1, $(G_4S)_2$ -коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB.

Полинуклеотид, кодирующий димерный лиганд для 4-1BB, субклонировали в рамке считывания на С-конце CH2- и CH3- доменов тяжелой цепи человеческого IgG1 на цепи с "впадиной" (Merchant, Zhu и др. 1998), используя $(G_4S)_2$ -коннектор. Полипептид, кодирующий мономерный лиганд для 4-1BB, субклонировали в рамке считывания на С-конце CH2- и CH3-доменов тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998), используя $(G_4S)_2$ -коннектор.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для фибробласт-активирующего белка (FAP), клон 4B9, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", с "выступом", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala интродуцировали в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами (WO 2012/130831).

Комбинация: анти-FAP huIgG1, содержащая димерный лиганд цепь с "впадиной" с мутациями Y349C/T366S/L368A/Y407V, анти-FAP huIgG1, содержащая мономерный лиганд цепь с "выступом" с мутациями S354C/T366W, и легкая цепь анти-FAP, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и два FAP-связывающих Fab (фиг. 4, конструкция 2.6).

В табл. 26 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на FAP (4B9) молекулы, содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) (конструкция 2.6) (FAP разделенный тример с 2 анти-FAP Fab, димерный и мономерный лиганды для 4-1BB, слитые на С-конце каждой тяжелой цепи соответственно).

Таблица 26. Последовательности двухвалентной нацеленной на FAP (4B9) молекулы, содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) (конструкция 2.6)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
175	нуклеотидная последовательность конструкции анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-248)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCCTGGTCACAGTGTCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTCTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGAACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT

		ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGCTCTCGTGCGCAGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCGTGAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCG GCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGC TGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCA GGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGAACCTGTGCTGT ATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGG CTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGG ACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACT ACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAG CCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGA CAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAG CGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCC GGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGG GCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTG CTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCC TGGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGG GACCCGAAGTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGA TCTGAGACAGGGAATGTTGCCCCAGCTGGTGGCTCAGAAT GTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACC CAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTA CAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGG GGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTG GTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGC ATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACT GGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCC AGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATC TGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGA AGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGC AACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCT GCCGACTG
176	нуклеотидная последовательность анти- FAP (4B9)-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-248)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAG CCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCT TCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC CCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGC TCTGGCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGT ACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCG TGTAATACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTA CTGGGGACAGGGCACCCCTGGTCACAGTGTCCAGCGTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAC

		TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAG GGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGACGA ACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGT GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAACTG ACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGC GGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTG AGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGG GCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCT GGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGAC ACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTAC GTGTTCTTTCAGCTGGAACCTGCGGAGAGTGGTGGCCGCG AAGGATCTGGCTCTGTGTCTTGGCCCTGCATCTGCAGCC TCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACA GTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCG CATTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGG CCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCT GGGCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTG
163	анти-FAP (4B9), легкая цепь	см. таблицу 21
126	анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71- 248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDP

		AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIP AGL
127	анти-FAP (4B9)-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKAGWFGGFNYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
125	анти-FAP (4B9), легкая цепь	см. таблицу 21

2.2. Получение "ненацеленных" содержащих тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул (контрольные молекулы).

Дополнительные контрольные молекулы в случае контроля А и Б получали согласно методу, описанному выше в примере 1.4. Двухвалентный вариант (контроль В) получали аналогично двухвалентным конструкциям 2.3 и 2.6, а одновалентный вариант (контроль Д) получали аналогично конструкции 2.5 (содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248)), с единственным различием, состоящем в том, что анти-FAP связывающий агент (VH-VL) заменяли на антитело зародышевой линии, обозначенное DP47, не связывающееся с антигеном.

В табл. 27 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной "ненацеленной" (DP47) молекулы, содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) (контроль В). В табл. 28 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной "ненацеленной" (DP47) молекулы, содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) (контроль Д).

Таблица 27. Последовательности двухвалентной ненацеленной на FAP (DP47) молекулы, содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) (контроль B)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
177	нуклеотидная последовательность конструкции DP47-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-254)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT CACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGT AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGG CCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAG GGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCA CCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAACAGCGG AGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTG CAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCAACCG TGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCC ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGT CTTCCTTCCCCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCT CACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCGCGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTACGCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCCTCGTGAGCAAGCTCAC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAA GCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCC CCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCAT GTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGAT GGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCG TGCTACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCA AAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTT CTTTCAGCTGGAACCTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGA GAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGA TCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTT GGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGA GGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGAC

		ACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCT GTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGA TCTAGAGAGGGACCCGAAGTGTCCCTGACGATCCAGCCG GGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCAGCTGGT GGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGG TACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGG GACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGG CTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTCAGCTGGAAGT GAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTC CCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGC GCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCT CTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCAGAGAC GCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCA TCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTG ACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACAC CTGAGATCCCTGCCGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
178	нуклеотидная последовательность конструкции DP47-Fc- цепь с «выступом», считая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT CACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGT AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTAAGTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGG CCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCAC CGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTA CCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA GCCTGAGAACAACATAAGACCAACCCCCCTGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAAACTGACCGTGG ACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGAGGCGGCGGAAGCG GAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCG ATGATCCTGTGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGC

		CCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGT CACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAG AACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTT TCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCGGCAGGATC TGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGA AGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATC TGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACAC GCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGT TCAGAGTGACCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCC AAGAAGCGAA
80	нуклеотидная последовательность DP47 легкая цепь	см. таблицу 18
179	DP47-Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71- 254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSREGPE LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSRSE
180	DP47-Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
82	DP47, легкая цепь	см. таблицу 18

Таблица 28. Последовательности одновалентной "ненацеленной" (DP47) молекулы, содержащей человеческий лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih), (контроль Д)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
171	димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 25
172	мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1	См. таблицу 25
79	DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
80	легкая цепь DP47	См. таблицу 18
173	димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 25
174	мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1	См. таблицу 25
81	DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
82	легкая цепь DP47	См. таблицу 18

2.3. Получение "ненацеленного" человеческого IgG1 в качестве контроля Е.

Дополнительная контрольная молекула, которую применяли в анализах, представляла собой "ненацеленную" молекулу DP47, контрольная зародышевая линия, человеческий IgG1 с мутациями Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами, которую получали согласно методу, описанному в публикации Международной заявки на патент WO 2012/130831.

В табл. 29 представлены кДНК и аминокислотные последовательности "ненацеленной" (DP47) молекулы huIgG1 PGLALA (контроль Е).

Таблица 29. Последовательности "ненацеленной" молекулы DP47 huIgG1 (контроль Е)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
181	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи DP47 (hu IgG1 PGLALA)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT CACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGT AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC CGGTTCAACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGG

		CCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACACAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCC CGTGCCCAAGCAGCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGG CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAGCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAG
80	легкая цепь DP47	См. таблицу 18
182	тяжелая цепь DP47 (hu IgG1 PGLALA)	EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGSDFYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	легкая цепь DP47	См. таблицу 18

2.4. Получение одновалентных и двухвалентных нацеленных на FAP (4B9) конструкций, содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc, и контрольных молекул.

Кодирующие последовательности нацеленных и "ненацеленных" конструкций, содержащих разделенных тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih), клонировали в плазмидном векторе, в котором экспрессия вставки контролировалась промотором MPSV и который содержал синтетическую полиА-последовательность, локализованную на 3'-конце CDS. Кроме того, вектор содержал последовательность OriP EBV для поддержки эпизомальной формы плазмиды.

Содержащую разделенный тримерный лиганд к 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулу получали путем котрансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессионными векторами для клеток млекопитающих с использованием полиэтиленимина. Клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами. Для конструкций 2.1, 2.2, 2.4 и 2.5 и соответствующих контрольных молекул использовали соотношение 1:1:1 (например, "вектор для конструкции димерный лиганд-CL-цепь с "выступом": "вектор для слияния мономерный лиганд -CH1": "вектор для анти-FAP Fab-цепи с "впадиной": "вектор для легкой цепи анти-FAP"). Для конструкций 2.3 и 2.6 и их контрольных молекул использовали соотношение 1:1:1 ("вектор для huIgG1-Fc-цепь с "впадиной"-димерный лиганд": "вектор для huIgG1-Fc-цепь с "выступом"-мономерный лиганд": "вектор для легкой цепи анти-FAP").

Для двухвалентной конструкции 5 применяли соотношение 1:1:1 ("вектор для тяжелой цепи с "впадиной": "вектор для тяжелой цепи с "выступом": "вектор для легкой цепи анти-FAP"). Человеческие IgG, которые применяли в качестве контроля в анализах, получали аналогично методу, описанному для получения биспецифических конструкций (для трансфекции применяли только вектор для легкой цепи и вектор для тяжелой цепи).

Для производства в 500-миллилитровые встряхиваемые колбы засевали 300 млн клеток HEK293 EBNA за 24 ч до трансфекции. Для трансфекции клетки центрифугировали в течение 10 мин при $210 \times g$ и супернатант заменяли 20 мл предварительно нагретой среды CD CHO. Экспрессионные векторы (200 мкг общей ДНК) смешивали в 20 мл среды CD CHO. После добавления 540 мкл ПЭИ раствор интенсив-

но перемешивали в течение 15 с и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки смешивали с раствором ДНК/ПЭИ, переносили в 500-миллилитровую встряхиваемую колбу и инкубировали в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂. После инкубации добавляли 160 мл среды Excell, дополненной 6 мМ L-глутамином, 5 г/л соевого пептида (PEPSOY) и 1,2 мМ вальпроевой кислоты, и клетки культивировали в течение 24 ч. Через 1 день после трансфекции добавляли 12% Feed 7 и глюкозу (конечная концентрация 3 г/л). После культивирования в течение 7 дней супернатант собирали центрифугированием в течение 30-40 мин при по меньшей мере 400 × g. Раствор стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм-фильтр), дополняли азидом натрия до конечной концентрации 0,01% (мас./об.) и выдерживали при 4°C.

Нацеленные и "ненацеленные" содержащие тримерный лиганд TNF в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающие молекулы и человеческий IgG1 очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии с использованием белка А с последующей гель-фильтрацией. Для осуществления аффинной хроматографии супернатант вносили в колонку MabSelect Sure (CV = 5-15 мл, смола фирмы GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим фосфат натрия (20 мМ), цитрат натрия (20 мМ) (pH 7,5). Несвязанный белок удаляли путем промывки таким же буфером, используя его в объеме, кратном по меньшей мере 6 объемам колонки. Связанный белок элюировали, применяя линейный градиент (20 CV) или ступенчатую элюцию (8 CV), с использованием буфера, содержащего 20 мМ цитрат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин (pH 3,0). При осуществлении элюции с использованием линейного градиента осуществляли дополнительную ступенчатую элюцию с применением объема, кратного 4 объемам колонки.

Значение pH собранных фракций регулировали, добавляя 1/10 (об./об.) 0,5М фосфата натрия, pH 8,0. Белок концентрировали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную раствором, содержащим 20 мМ гистидин, 140 мМ хлорид натрия, 0,01 об.% Твин20, pH 6,0.

Концентрацию белка определяли путем измерения оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу нацеленной содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя (5 мМ 1,4-дитиотреитол) и без него и осуществляли окрашивание кумасси SimpleBlue™ SafeStain, (фирма Invitrogen, США) или с помощью КЭ-ДСН, используя устройство Caliper LabChip GXII (фирма Perkin Elmer). Содержание агрегатов в образцах анализировали, используя колонку для аналитической гель-фильтрации TSKgel G3000 SW XL (фирма Tosoh), уравновешенную подвижным буфером, содержащим 25 мМ K₂HPO₄, 125 мМ NaCl, 200 мМ моногидрохлорид L-аргинина, 0,02% (мас./об.) NaN₃, pH 6,7, при 25°C.

В табл. 30 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономеров нацеленных на Fc (4B9) и "ненацеленных" содержащих тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул и контрольных молекул.

Таблица 30. Данные биохимического анализа нацеленных на Fc (4B9) и "ненацеленных" содержащих тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул и контрольных молекул

Конструкция	Мономер [%] (SEC)	Выход [мг/л]
конструкция 2.1	95	15,8
конструкция 2.3	97	11,5
конструкция 2.4	97	14,1
конструкция 2.5	100	16,5
контроль В (двухвалентный)	98	12,6
контроль Д (одновалентный)	93	4,1
контроль Е (зародышевая линия DP47 человеческого IgG1 PGLALA)	100	50

Пример 3.

Получение, очистка и характеристика 4-1BB.

Последовательности ДНК, кодирующие эктодомены 4-1BB человека, мышей или обезьян циномогус (табл. 31), субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant и др., 1998). Интродуцировали сайт расщепления протеазой AcTEV между эктодоменом антигена и Fc человеческого IgG1. Avi-метку для направленного биотинилирования интродуцировали на С-конец конструкции антигена-Fc с "выступом". Комбинация конструкции антиген-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, с Fc-цепью с "впадиной", содержащей мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, позволяла создавать гетеродимер, включающий единичную копию цепи, содержащей эктодомен 4-1BB, с получением мономерной формы сцепленного с Fc антигена (фиг. 5B). В табл. 32 представлены кДНК и аминокислотные последовательности слитых конструкций антиген-Fc.

Таблица 31. Нумерация аминокислот эктодоменов (ECD) антигена и их происхождение

SEQ ID NO:	Конструкция	Источник	ECD
83	ECD человеческого 4-1BB	синтезирован на основе Q07011	Ак 24-186
84	ECD 4-1BB обезьян циномолгус	выделен из крови обезьян циномолгус	Ак 24-186
85	ECD мышиноного 4-1BB	синтезирован на основе P20334	Ак 24-187

Таблица 32. кДНК и аминокислотные последовательности молекул, содержащих мономерный антиген в слиянии с Fc(kih)

SEQ ID NO:	Антиген	Последовательность
86	нуклеотидная последовательность Fc-цепи с «впадиной»	GACAAAACCTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTC TCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
87	нуклеотидная последовательность конструкции человеческого антиген 4-1BB-Fc-цепь с «выступом»	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTCT GCGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTGCCCCC CAACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGACAGCGGACCTGCGAC ATCTGCAGACAGTGCAAGGGCGTGTTCAGAACCCGGAAA GAGTGCAGCAGCACCAGCAACGCCGAGTGCGACTGCACC CCCGGCTTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCAGCATGTGCG AGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAAGTACCAAGAAGG GCTGCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGACCAGAA GCGGGGCATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGGAC GGCAAGAGCGTGCTGGTCAACGGCACCAAGAAGCGGGAC GTCGTGTGCGGCCCCAGCCCTGCTGATCTGTCTCCTGGGG CCAGCAGCGTGACCCCTCCTGCCCTGCCAGAGAGCCTGG CCTCTCCTCAGGTGACGAACAGTTATATTTTCAGGGC GGCTCACCCAAATCTGCAGACAAAACCTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG

		AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAA CGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
88	нуклеотидная последовательность конструкции антиген 4- 1ВВ обезьян циномолгус- Fc-цепь с «выступом»	TTGCAGGATCTGTGTAGTAACTGCCAGCTGGTACATTCT GTGATAATAACAGGAGTCAGATTTGCAGTCCCTGTCTCC AAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTGTGAC ATATGCAGGCAGTGTAAGGTGTTTTCAAGACCAGGAAG GAGTGTTCCCTCCACCAGCAATGCAGAGTGTGACTGCATT CAGGGTATCACTGCCTGGGGGCAGAGTGCAGCATGTGTG AACAGGATTGTAAACAAGGTCAAGAATTGACAAAAAAG GTTGTAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAATGACCAGAA ACGTGGCATCTGTGCCCCCTGGACAAACTGTTCTTTGGAT GGAAAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAAGGAGAGGGAC GTGGTCTGCGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCCAGGAG CATCCTCTGCGACCCCGCCTGCCCTGCGAGAGAGCCAGG ACACTCTCCGCAGGTGACGAACAGTTATATTTTCAGGGC GGCTCACCCAAATCTGCAGACAAACTCACACATGCCAC CGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTAC CGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGTGCACCA AGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAA CGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
89	конструкция мышиный антиген 4-1ВВ-Fc-цепь с «выступом»	GTGCAGAACAGCTGCGACAACCTGCCAGCCCGGCACCTTCT GCCGGAAGTACAACCCCGTGTGCAAGAGCTGCCCCCCCCA GCACCTTCAGCAGCATCGGCGGCCAGCCCACTGCAACAT CTGCAGAGTGTGCGCCGGCTACTTCCGGTTCAAGAAGTTC TGCAGCAGCACCCACAACGCCGAGTGCAGTGCATCGAG GGCTTCCACTGCCTGGGCCCCCAGTGCACCAGATGCGAGA AGGACTGCAGACCCGGCCAGGAAGTACCAAGCAGGGCT GTAAGACCTGCAGCCTGGGCACCTTCAACGACCAGAACG GGACCGGCGTGTGCCGGCCTTGGACCAATTGCAGCCTGGA CGGGAGAAGCGTGCTGAAAACCGGCACCACCGAGAAGGA

		CGTCGTGTGCGGCCCTCCCGTGGTGTCTTCAGCCCTAGC ACCACCATCAGCGTGACCCCTGAAGGCGGCCCTGGCGGA CACTCTCTGCAGGTCCTGGTCGACGAACAGTTATATTTTC AGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGACAAAACACACAT GCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACG TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTACGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGC CTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCAC GAG
90	Fc-цепь с «впадиной»	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	конструкция человеческий антиген 4- 1BB-Fc-цепь с «выступом»	LQDPCSNCPAGTFCDNRRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICR QCKGVFRTRKECSSTNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCK QGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLV NGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSPQVDEQ LYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFE AQKIEWHE
92	конструкция обезьяний (циномолгус) антиген 4- 1BB-Fc-цепь с «выступом»	LQDLCSNCPAGTFCDNRRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICR QCKGVFKTRKECSSTNAECDISGYHCLGAECISMCEQDCK QGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLV NGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQVDEQ LYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFE AQKIEWHE
93	конструкция мышиный антиген 4-1BB-Fc-цепь с «выступом»	VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNICR VCAGYFRFKFCSSTHNAECECIEGFHCLGPQCTRCEKDCRP GQELTKQGCKTCSLGTFTNDQNGTGVCPRPWTNCSLDGRSVL KTGTTEKDVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSQVLVD EQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDI FEAQKIEWHE

Все последовательности, кодирующие слияния 4-1BB-Fc, клонировали в плазмидном векторе, в котором экспрессия вставки контролировалась промотором MPSV и который содержал синтетическую полиА-последовательность, локализованную на 3'-конце CDS. Кроме того, вектор содержал последова-

тельность OgiP EBV для поддержки эписомальной формы плазмиды.

Для получения биотинилированных слитых молекул антиген/Fc клетки HEK293 EBNA на экспоненциальной фазе роста совместно трансфектировали тремя векторами, кодирующими два компонента слитого белка (цепи с "выступом" и "впадиной"), а также BirA, фермент, необходимый для реакции биотинилирования. Использовали соответствующие векторы в соотношении 2:1:0,05 ("ECD антигена-АсTEV-Fc с "выступом": "Fc с "впадиной": "BirA").

Для получения белка в 500-миллилитровые встряхиваемые колбы засеивали 400 млн клеток HEK293 EBNA за 24 ч до трансфекции. Для трансфекции клетки центрифугировали в течение 5 мин при $210 \times g$ и супернатант заменяли предварительно нагретой средой CD CHO. Экспрессионные векторы ресуспендировали в 20 мл среды CD CHO, содержащей 200 мкг векторной ДНК. После добавления 540 мкл полиэтиленимина (ПЭИ) раствор интенсивно перемешивали в течение 15 с и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки смешивали с раствором ДНК/ПЭИ, переносили в 500-миллилитровую встряхиваемую колбу и инкубировали в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере с 5% CO_2 . После инкубации добавляли 160 мл среды F17 и клетки культивировали в течение 24 ч. Среду для производства дополняли 5 мкМ кифунензином. Через 1 день после трансфекции в культуру добавляли 1 мМ вальпроовую кислоту и 7% Feed 1 с добавками, и клетки культивировали в течение 24 ч. После культивирования в течение 7 дней супернатант собирали центрифугированием клеток в течение 15 мин при $210 \times g$. Раствор стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм-фильтр), дополняли азидом натрия до конечной концентрации 0,01% (мас./об.) и выдерживали при 4°C .

Секретированные белки очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии с использованием белка А с последующей гель-фильтрацией. Для осуществления аффинной хроматографии супернатант вносили в колонку HiTrap ProteinA HP (CV = 5 мл, фирма GE Healthcare), уравновешенную 40 мл буфера, содержащего 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, pH 7,5. Несвязанный белок удаляли путем промывки буфером, содержащим 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 0,5М хлорид натрия (pH 7,5), используя его в объеме, кратном по меньшей 10 объемам колонки. Связанный белок элюировали, используя линейный pH-градиент хлорида натрия (от 0 до 500 мМ), созданного с помощью взятого в объеме, кратном более 20 объемам колонки, буфера, содержащего 20 мМ цитрат натрия, 0,01 об.% Твин-20, pH 3,0. Затем колонку промывали, используя в объеме, кратном 10 объемам колонки, буфер, содержащий 20 мМ цитрат натрия, 500 мМ хлорид натрия, 0,01 об.% Твин-20, pH 3,0.

Значение pH собранных фракций регулировали, добавляя 1/40 (об./об.) 2М Трис, pH 8,0. Белок концентрировали и фильтровали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную раствором, содержащим 2 мМ MOPS, 150 мМ хлорид натрия, 0,02% (мас./об.) азид натрия, pH 7,4.

Для определения аффинности к человеческому рецептору субклонировали также эктодомен человеческого 4-1BB в рамке считывания с avi-меткой (GLNDIFEAAQKIEWHE) и гексагистидиновой меткой.

Очистку белка осуществляли согласно методу, описанному выше для содержащего Fc слитого белка. Секретированные белки очищали из супернатантов клеточных культур с помощью хелатирующей хроматографии с последующей гель-фильтрацией. Первую хроматографическую стадию осуществляли в картридже NiNTA Superflow (5 мл, фирма Qiagen), уравновешенном буфером, содержащим 20 мМ фосфат натрия, 500 нМ хлорид натрия, pH 7,4. Элюцию осуществляли с использованием градиента от 5 до 45% буфера для элюции, взятого в объеме, кратном более 12 объемам колонки (20 мМ фосфат натрия, 500 нМ хлорид натрия, 500 мМ имидазол, pH 7,4). Белок концентрировали и фильтровали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную раствором, содержащим 2 мМ MOPS, 150 мМ хлорид натрия, 0,02% (мас./об.) азид натрия, pH 7,4 (табл. 33).

Таблица 33. Последовательности мономерной молекулы человеческого 4-1BB-His

SEQ ID NO:	Антиген	Последовательность
94	нуклеотидная последовательность человеческого 4-1BB-His	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTCTGCGACA ACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCCTGCCCCCAACAGCTTCAG CTCTGCCGGCGGACAGCGGACCTGCGACATCTGCAGACAGTGAAG GGCGTGTTTCAGAACCCGGAAAGAGTGCAGCAGCACCAGCAACGCC GAGTGCGACTGCACCCCCGGCTTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCA GCATGTGCGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAACGTGACCAAGA AGGGCTGCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGACCAGAAAGCG GGGCATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGGACGGCAAGAGC GTGCTGGTCAACGGCACCAAGAACGGGACGTCGTGTGCGGCCCA GCCCTGCTGATCTGTCTCCTGGGGCCAGCAGCGTGACCCCTCCTGCC CCTGCCAGAGAGCCTGGCCACTCTCCTCAGGTGACGAACAGTTAT ATTTTCAGGGCGGCTCAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAA GATCGAGTGGCACGAGGCTCGAGCTCACCACCATCACCATCAC
95	человеческий 4-1BB-His	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVF RTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGGELTKKGCKD CCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSP GASSVTPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSGLNDIFEAQKIEWHEARA NNNNNN

Пример 4.

Биохимическая характеристика нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающей молекулы с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Связывание нацеленных на FAP содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул с рекомбинантным 4-1BB оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Все эксперименты на основе SPR осуществляли с помощью устройства Biacore T100 при 25°C с использованием HBS-EP в качестве подвижного буфера (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% сурфактанта P20, фирма Biacore, Фрейбург/Германия).

Авидность взаимодействия между нацеленными на FAP или "ненацеленными" содержащими тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающими молекулами и рекомбинантным 4-1BB (человека, обезьян циномолгус (суно) и мышей) определяли согласно описанному ниже методу. Данные продемонстрировали, что как нацеленные содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающие молекулы, так и "ненацеленные" (DP47) содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающие молекулы связывались с сопоставимой авидностью с 4-1BB человека и обезьян циномолгус, но с очень низкой авидностью с мышинным гомологом.

Молекулы, содержащие рекомбинантный биотинилированный 4-1BB человека, обезьян циномолгус и мышей в слиянии с Fc(kih), непосредственно сшивали на SA-чипе, используя инструкцию по стандартному сочетанию (фирма Biacore, Фрейбург/Германия). Уровень иммобилизации соответствовал примерно 30 RU. Нацеленные на FAP содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающие молекулы или содержащие DP47 "ненацеленные" контрольные молекулы пропускали через проточные ячейки, используя диапазон концентраций от 0,39 до 200 нМ, со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 120 с. Мониторинг диссоциации осуществляли в течение 180 с. Различия всех показателей преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного в пустой проточной референс-ячейке.

Для измерения аффинности осуществляли непосредственное сочетание до достижения уровня, соответствующего примерно 7200 резонансных единиц (RU), античеловеческого Fc-специфического антитела на CM5-чипе при pH 5,0, используя стандартный набор для аминного сочетания (фирма GE Healthcare). "Захватывали" нацеленные на FAP или "ненацеленные" содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающие молекулы в концентрации 50 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в течение 60 с на проточной ячейке 2. Серийные разведения (1,95-1000 нМ) человеческого 4-1BB-avi-His пропускали через обе проточные ячейки со скоростью 30 мкл/мин в течение 180 с для регистрации фазы ассоциации. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение 180 с и для запуска заменяли раствор образца на HBS-EP. Поверхность чипа регенерировали после каждого цикла, используя две инъекции по 60 с 10 mM глицином-HCl, pH 2,1. Различия всех показателей преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного в проточной референс-ячейке 1. Для оценки взаимодействия между содержащими тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающими молекулами и hu4-1BB avi His, определяли константы аффинности на основе констант скорости путем подгонки кривых связывания к модели связывания 1:1 Ленгмюра, используя программу Biaeval (фирма GE Healthcare).

Таблица 34. Подгонка к модели связывания 1:1 Ленгмюра и константы аффинности

Лиганд	Аналит	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
«FAP разделенный тример 4-1BBL» (конструкция 1.1)	hu4-1BB	4,8E+04	2,6E-02	5,5E-07
«DP47 разделенный тример 4-1BBL» (контроль А)	hu4-1BB	6,2E+04	3,3E-02	5,2E-07

Пример 5.

Функциональная характеристика нацеленных содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

5.1. Связывание с наивными в сравнении с активированными человеческими PBMC нацеленных на FAP содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул.

Лейкоцитарные пленки получали из центра донорской крови Цюриха. Для выделения свежих моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) лейкоцитарную пленку разводили таким же объемом D-3ФР (фирма Gibco by Life Technologies, каталожный № 14190 326). В 50-миллилитровые полипропиленовые центрифужные пробирки (фирма TPP, каталожный № 91050) вносили 15 мл Histopaque 1077 (фирма SIGMA Life Science, каталожный № 10771, полисахароза (фиколл) и диатризоат натрия, плотность доведена до 1,077 г/мл) и наслаивали раствор разведенной лейкоцитарной пленки на Histopaque 1077. Пробирки центрифугировали в течение 30 мин при $400 \times g$. Затем PBMC собирали из интерфазы, промывали трижды D-3ФР и ресуспендировали в среде для Т-клеток, состоящей из среды RPMI 1640 (фирма Gibco by Life Technology, каталожный № 42401-042), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, фирма Gibco by Life Technology, каталожный № 16000-044, партия 941273, обработана гамма-лучами, свободная от микоплазм и инактивированная тепловой обработкой при 56°C в течение 35 мин), 1 об.% GlutaMAX-I (фирма GIBCO by Life Technologies, каталожный № 35050 038), 1 мМ пируватом натрия (фирма SIGMA, каталожный № S8636), 1 об.% содержащей заменимые аминокислоты среды MEM (фирма SIGMA, каталожный № M7145) и 50 мкМ β -меркаптоэтанолом (фирма SIGMA, M3148).

PBMC использовали непосредственно после выделения или стимулировали для индукции экспрессии 4-1BB на клеточной поверхности Т- и NK-клеток путем культивирования в течение 4 дней в среде для Т-клеток, дополненной 200 ед./мл пролейкина (фирма Novartis Pharma Schweiz AG, CHCLB-P-476-700-10340) и 2 мкг/мл PMA-L (фирма SIGMA, каталожный № L2769), в 6-луночной планшете для культуры ткани и затем в течение 1 дня в 6-луночной планшете для культуры ткани, сенсibilизированном 10 мкг/мл антитела к человеческому CD3 (клон OKT3, фирма BioLegend, каталожный № 317315) и 2 мкг/мл антитела к человеческому CD28 (клон CD28.2, фирма BioLegend, каталожный №: 302928), в среде для Т-клеток при 37°C и 5% CO₂.

Для определения связывания содержащих тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул с человеческими PBMC $0,1 \times 10^6$ наивных или активированных PBMC добавляли в каждую лунку круглодонных 96-луночных планшетов для суспензионных клеток (фирма Greiner bio-one, Cellstar, каталожный № 650185). Планшеты центрифугировали в течение 4 мин при $400 \times g$ и 4°C. Супернатант отбрасывали. Затем клетки окрашивали, используя 100 мкл/лунку D-3ФР, содержащего разведенный в соотношении 1:1000 краситель из набора LIVE/DEAD® с фиксирующим голубым красителем для мертвых клеток (Fixable Blue Dead Cell Stain) для УФ-возбуждения (фирма Life Technologies, Molecular Probes, L-23105) или фиксирующий краситель для определения жизнеспособности eF660 (фирма eBioscience 65-0864-18) или краситель из набора LIVE/DEAD® с фиксирующим зеленым красителем для мертвых клеток (Fixable Green Dead Cell Stain) (фирма Life Technologies, Molecular Probes, L-23101), в течение 30 мин при 4°C в темноте. Если в качестве красителя LIVE/DEAD® применяли DAPI, то эту стадию пропускали. Клетки однократно промывали 200 мкл холодного FACS-буфера (D-3ФР, дополненный 2 об.% FBS, 5 мМ ЭДТА, pH 8 (фирма Amresco, каталожный № E177) и 7,5 мМ азидом натрия (фирма Sigma-Aldrich, S2002).

Затем добавляли 50 мкл/лунку холодного (4°C) FACS-буфера, содержащего различные определенные титрованием концентрации содержащих тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул, и клетки инкубировали в течение 120 мин при 4°C, промывали 4 раза 200 мкл/лунку при 4°C FACS-буфером и ресуспендировали. Клетки дополнительно окрашивали, используя 50 мкл/лунку холодного (4°C) FACS-буфера, содержащего 0,67 мкг/мл антитела к человеческому CD3-PerCP-Cy5.5 (клон UCHT1, IgG1к мыши, фирма BioLegend, каталожный № 300430) или 0,16 мкл антитела к человеческому CD3-PE/Cy7 (клон SP34-2, IgG1к мыши, фирма BD Pharmingen, каталожный № 557749, партия 33324597), 0,67 мкг/мл антитела к человеческому CD45-AF488 (клон HI30, IgG1к, мыши, фирма BioLegend, каталожный № 304017), или 0,12 мкг/мл антитела к человеческому CD56-ФИТЦ (клон NCAM16.2, IgG2bk мыши, фирма BD Pharmingen, каталожный № 345811), или 1 мкл антитела к человеческому CD56-APC (клон B159, IgG1к мыши, фирма BD Pharmingen, каталожный № 555518, партия 3098894), 0,25 мкг/мл антитела к человеческому CD4-BV421 (клон RPA-T4, IgG1к мыши, фирма BioLegend, каталожный № 300532), или 0,23 мкг/мл антитела к человеческому CD4-BV421 (клон OKT4, IgG2bk мыши, фирма BioLegend, каталожный № 317434), 0,25 мкл антитела к человеческому CD8a-APC (клон RPA-T8, IgG1к мыши, фирма, BD Pharmingen, каталожный № 555369), или 0,67 мкл антитела к человеческому

CD8a-APC/Cy7 (клон RPA-T8, IgG1к мыши, фирма BioLegend, каталожный № 301016), или 0,83 нг/мл антитела к человеческому CD8a-BV711 (клон RPA-T8, IgG1к мыши, фирма BD Pharmingen, каталожный № 301044) и 5 мкг/мл конъюгированного с PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического AffiniPure (фирма Jackson ImmunoResearch, каталожный № 109116098 или 109116170). Клетки промывали дважды FACS-буфером. Если клетки окрашивали фиксирующим красителем для определения жизнеспособности, то их фиксировали с использованием 50 мкл/лунку D-3ФР, содержащего 1% формальдегида (фирма Sigma, HT501320-9.5L). Клетки ресуспендировали в FACS-буфере и получали данные на следующий день или в этот же день с использованием устройства с 5 лазерами LSR-Fortessa (фирма BD Bioscience, снабженного программой DIVA) или анализатора с 3 лазерами Miltenyi Quant Analyzer 10 (фирма Miltenyi Biotec) и программы Flow Jo (FlowJo X 10.0.7). Если применяли окрашивание DAPI для обнаружения мертвых клеток, то их ресуспендировали в 80 мкл/лунку FACS-буфера, содержащего 0,2 мкг/мл DAPI (фирма Santa Cruz Biotec, каталожный № Sc-3598), и данные получали в тот же день с помощью устройства с 5 лазерами LSR-Fortessa (фирма BD Bioscience, снабженного программой DIVA).

Как продемонстрировано на фиг. 6, как нацеленные на FAP, так и "ненацеленные" содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы не связывались с покоящимися человеческими CD4⁺-Т-клетками и не отличались поддающимся обнаружению связыванием с покоящимися CD8⁺-Т-клетками и NK-клетками. В противоположность этому, обе конструкции сильно связывались с активированными NK, CD8⁺- или CD4⁺-Т-клетками, хотя для последних обнаружена примерно в 10 раз более низкая интенсивность специфической флуоресценции по сравнению с NK-клетками и в 20 раз пониженная интенсивность специфической флуоресценции по сравнению с CD8⁺-Т-клетками.

На фиг. 7А и 7Б продемонстрировано связывание конструкций 1.1-1.10, полученных согласно методу, описанному в примере 1, с экспрессирующими 4-1BB активированными человеческими CD3⁺CD8⁺-Т-клетками и экспрессирующими 4-1BB активированными человеческими CD3⁺CD4⁺-Т-клетками соответственно. В табл. 35 представлены величины EC₅₀, полученные для конструкций 1.1-1.10.

Таблица 35. Связывание на активированных человеческих CD3⁺CD8⁺-Т-клетках и CD3⁺CD4⁺-Т-клетках

Конструкция	EC ₅₀ [нМ] 4-1BB ⁺ CD8 ⁺	EC ₅₀ [нМ] 4-1BB ⁺ CD4 ⁺
Контроль Б	0,11	16,21
1.1	0,43	4,99
1.2	0,18	20,79
1.3	0,07	2,82
1.4	0,19	0,34
1.5	0,17	2,67
1.6	0,19	0,95
1.7	0,26	16,47
1.8	0,14	2,77
1.9	0,18	12,92
1.10	0,12	0,3

На фиг. 8А и 8Б продемонстрировано связывание конструкций 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 и 2.6, полученных согласно методу, описанному в примере 2, на CD4⁺- и CD8⁺-клетках из свежей человеческой крови и на активированных экспрессирующих 4-1BB CD4⁺-Т-клетках и CD8⁺-Т-клетках соответственно. Дискриминационные окна устанавливали на живые CD45⁺CD3⁺CD4⁺- или CD45⁺CD3⁺CD8⁺-Т-клетки, и строили график зависимости MFI для конъюгированного с PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического AffiniPure от определенных титрованием концентраций вариантов нацеленных содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc конструкций. В табл. 36 представлены величины EC₅₀, полученные для конструкций 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 и 2.6.

Таблица 36. Связывание на активированных экспрессирующих 4-1BB CD4⁺-Т-клетках и CD8⁺-Т-клетках

Конструкция	EC ₅₀ [нМ] 4-1BB ⁺ CD8 ⁺	EC ₅₀ [нМ] 4-1BB ⁺ CD4 ⁺
контроль Б	0,36	0,42
контроль В	0,39	0,41
контроль Д	0,57	0,76
2.1	0,21	0,24
2.3	0,44	0,3
2.4	0,3	0,38
2.5	0,35	0,68
2.6	0,33	0,24

5.2. Связывание нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc анти-

генсвязывающей молекулы с активированными мышинными спленоцитами.

Мышинные селезенки собирали в 3 мл 3ФР и получали суспензию единичных клеток с использованием мягких пробирок MACS (фирма Miltenyi Biotec, каталожный № 130-096-334) и мягкого разрушителя MACS Octo (фирма Miltenyi Biotec). Затем спленоциты фильтровали через 30-мкметровые фильтры для предварительного разделения (фирма Miltenyi Biotec, каталожный № 130-041-407) и центрифугировали в течение 7 мин при $350 \times g$ и 4°C . Супернатант удаляли аспирацией и клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640, дополненной 10 об.% FBS, 1 об.% GlutaMAX-I, 1 мМ пируватом натрия, 1 об.% содержащей заменимые аминокислоты среды MEM, 50 мкМ β -меркаптоэтанолом и 10% пенициллина-стрептомицина (фирма SIGMA, каталожный № P4333). Культивировали 10^6 клеток/мл в течение 2 дней в 6-луночном планшете для культуры ткани, сенсibilизированном 10 мкг/мл IgG армянского хомяка к мышинному CD3 ϵ (клон 145-2C11, BioLegend, каталожный № 100331) и 2 мкг/мл IgG сирийского хомяка к мышинному CD28 (клон 37.51, фирма BioLegend, каталожный № 102102).

Активированные мышинные спленоциты собирали, промывали в D-3ФР, подсчитывали количество клеток и $0,1 \times 10^6$ клеток переносили в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном, не обработанного тканевой культурой. Супернатант удаляли и клетки окрашивали, используя 100 мкл/лунку D-3ФР, содержащего в разведении 1:5000 фиксирующий краситель для определения жизнеспособности eF660 (фирма Bioscience, каталожный № 65-0864-18) в течение 30 мин при 4°C . Клетки промывали 3ФР и окрашивали в 50 мкл FACS-буфера, содержащего в различных концентрациях нацеленных на FAP содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул (FAP разделенный тример 4-1BBL), "ненацеленных" содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул (DP47 разделенный тример 4-1BBL) или МАт к мышинному CD137 в виде человеческого IgG1 P329G LALA (клон Lob. 12.3, фирма BioXcell, каталожный № BE0169). Клетки инкубировали в течение 120 мин при 4°C . Клетки промывали 4 раза FACS-буфером и окрашивали, используя 50 мкл/лунку FACS-буфера, содержащего 10 мкг/мл очищенного антитела к мышинному CD16/CD32 в виде крысиного IgG-Fc-Block (фирма BD Pharmingen, каталожный № 553142, клон 2.4G2), 5 мкг/мл антитела к мышинному CD8b в виде крысиного IgG2bk-ФИТЦ (фирма BioLegend, каталожный № 126606, клон YTS156.7.7), 0,67 мкг/мл антитела к мышинному CD3 в виде крысиного IgG2bk-APC-Cy7 (фирма BioLegend, каталожный № 100222, клон 17A2), 0,67 мкг/мл антитела к мышинному CD4 в виде крысиного IgG2bk-PE-Cy7 (фирма BioLegend, каталожный № 100422, клон GK1.5), 2 мкг/мл антитела к мышинному NK1.1 (линия C3H $\times$ BALB/c) в виде IgG2ак-PerCp-Cy5.5 (фирма BioLegend, каталожный № 108728, клон PK136) и 10 мкг/мл конъюгированного с PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fc γ -специфического AffiniPure, обладающего минимальной перекрестной реактивностью к бычьим, мышинным и кроличьим сывороточным белкам (фирма Jackson ImmunoResearch, каталожный № 109-116-170), в течение 30 мин при 4°C . Клетки промывали дважды, используя 200 мкл/лунку холодного FACS-буфера. Клетки фиксировали, используя 50 мкл/лунку D-3ФР, содержащего 1% формальдегида. Клетки ресуспендировали в FACS-буфере и получали данные на следующий день с помощью устройства с 5 лазерами LSR-Fortessa (фирма BD Bioscience, снабженного программой DIVA).

Как продемонстрировано на фиг. 9, нацеленные на FAP содержащие тримерный лиганд для hu4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (FAP разделенный тример hu4-1BBL) и "ненацеленные" содержащие тримерный лиганд для hu4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (DP47 разделенный тример hu4-1BBL) не связывались с мышинным 4-1BB. Поэтому активность не удалось протестировать в иммунокомпетентных мышах. Для изучения механизма действия *in vivo* следует применять либо гуманизированные мышинные модели, созданные на иммунонекомпетентных мышах, либо суррогатные молекулы, содержащие тримеры мышинного 4-1BBL, показанные на фиг. 3.

5.3. Связывание с экспрессирующими FAP опухолевыми клетками.

Для анализов связывания на экспрессирующих FAP клетках применяли клеточную линию человеческой меланомы MV-3 (см. Ruiter и др., *Int. J. Cancer*, 48(1), 1991, сс. 85-91), WM-266-4 (ATTC CRL-1676) или клеточную линию NIH/3T3-huFAP, клон 39. Для создания последней клеточной линии клетки NIH/3T3 трансфектировали человеческим FAP (NIH/3T3-huFAP, клон 39). Клетки создавали путем трансфекции фибробластов мышинных эмбрионов NIH/3T3 (ATCC CRL-1658) экспрессирующей pETR4921 плазмидой, кодирующей человеческий FAP под контролем промотора CMV. Клетки поддерживали в присутствии 1,5 мкг/мл пуромицина (фирма InvivoGen, каталожный №: ant-pr-5). Добавляли $0,1 \times 10^6$ экспрессирующих FAP опухолевых клеток в каждую лунку круглодонных 96-луночных планшето-в для суспензионных клеток (фирма Greiner bio-one, cellstar, каталожный № 650185).

Клетки однократно промывали 200 мкл D-3ФР и дебрис ресуспендировали. Добавляли 100 мкл/лунку холодного (4°C) D-3ФР-буфера, содержащего в разведении 1:5000 фиксирующий краситель для определения жизнеспособности eFluor 450 (фирма eBioscience, каталожный № 65-0863-18) или фиксирующий краситель для определения жизнеспособности eFluor 660 (фирма eBioscience, каталожный № 65-0864-18), и планшеты инкубировали в течение 30 мин при 4°C . Клетки однократно промывали 200 мкл холодного (4°C) D-3ФР-буфера и ресуспендировали, используя 50 мкл/лунку холодного (4°C) FACS-буфера (D-3ФР, дополненный 2 об.% FBS, 5 мМ ЭДТА, pH 8 (фирма Amresco, каталожный № E177) и 7,5

мМ азидом натрия (фирма Sigma-Aldrich S2002), который содержал в различных полученных титровании концентрациях содержащих тример 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы, с последующей инкубацией в течение 1 ч при 4°C. После 4 промывок с использованием 200 мкл/лунку клетки окрашивали, применяя 50 мкл/лунку холодного (4°C) FACS-буфера, содержащего 30 мкг/мл конъюгированного с ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического AffiniPure (фирма Jackson ImmunoResearch, каталожный № 109-096-098) или 5 мкг/мл конъюгированного с PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического AffiniPure (фирма Jackson ImmunoResearch, каталожный № 109-116-098 или 109-116-170), в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали дважды 200 мкл (4°C) FACS-буфера и затем ресуспендировали в 50 мкл/лунку D-3ФР, содержащего 1% формальдегида. В этот же или на следующий день клетки ресуспендировали в 100 мкл FACS-буфера и данные получали с помощью устройства с 5 лазерами LSR-Fortessa (фирма BD Bioscience, снабженного программой DIVA) или анализатора с 3 лазерами Miltenyi Quant Analyzer 10 (фирма Miltenyi Biotec) и программы Flow Jo (FlowJo X 10.0.7). Как продемонстрировано на фиг. 10, нацеленная на FAP содержащая тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) антигенсвязывающая молекула (FAP разделенный тример 4-1BB) (конструкция 1.1), в отличие от "ненацеленной" содержащей DP47-Fab конструкции (DP47 разделенный тример 4-1BB), т.е. контроль А, эффективно связывалась с экспрессирующими человеческий фибробласт-активирующий белок (FAP) клетками меланомы MV-3 (10А) или клетками WM-266-4 (10Б).

На фиг. 11А показано связывание конструкций 1.1-1.10, полученных согласно методу, описанному в примере 1, с экспрессирующими человеческий FAP клетками человеческой меланомы MV-3, а на фиг. 11Б показано связывание конструкций 1.1., 1.2, 1.3 и 1.5 с экспрессирующими человеческий FAP трансфектированными клетками эмбриональных мышечных фибробластов клетками NIH/3T3-huFAP, клон 39. В табл. 37 представлены величины EC₅₀, полученные для конструкций 1.1-1.10.

Таблица 37. Связывание с экспрессирующими человеческий FAP опухолевыми клетками

Конструкция	EC ₅₀ [нМ] FAP ⁺ MV-3	EC ₅₀ [нМ] NIH/3T3-hu FAP
1.1	4,14	12,2
1.2	5,36	9,35
1.3	-	14,97
1.4	5,13	-
1.5	0,53	10,06
1.6	8,16	-
1.7	4,09	-
1.8	2,79	-
1.9	4,22	-
1.10	4,31	-

На фиг. 12 продемонстрировано связывание различных нацеленных на FAP (4B9) или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB-Fc (kih) конструкций с экспрессирующими человеческий FAP клетками человеческой меланомы MV-3 (фиг. 12А) и клетками WM-266-4 (фиг. 12Б). Конструкции 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 и 2.6 получали согласно методу, описанному в примере 2, а контроли получали согласно методу, указанному выше в настоящем описании. Дискриминационные окна устанавливали на живые опухолевые клетки и строили график зависимости MFI для конъюгированного с PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического AffiniPure от определенных титрованием концентраций нацеленных содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc конструкций. В табл. 38 представлены полученные величины EC₅₀.

Таблица 38. Связывание с экспрессирующими человеческий FAP опухолевыми клетками

Конструкция	EC ₅₀ [нМ] FAP ⁺ MV-3	EC ₅₀ [нМ] FAP ⁺ WM-266-4
2.1	1,66	0,99
2.3	0,53	0,42
2.4	0,83	0,59
2.5	1,66	1,2

5.4. Функциональная характеристика нацеленных содержащих тримерный мышечный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул.

5.4.1. Связывание с активированными мышечными спленоцитами.

Мышечные селезенки собирали в 3 мл 3ФР и получали суспензию единичных клеток с использованием пробирок gentleMACS (фирма Miltenyi Biotec, каталожный № 130-096-334) и диссоциатора gentleMACS Octo (фирма Miltenyi Biotec). Затем спленоциты фильтровали через 30-мкметровые фильтры для предварительного разделения (фирма Miltenyi Biotec, каталожный № 130-041-407) и центрифугировали в течение 7 мин при 350×g и 4°C. Супернатант удаляли аспирацией и клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640, дополненной 10 об.% FBS, 1 об.% GlutaMAX-I, 1 мМ пируватом натрия, 1 об.% содержащей заменимые аминокислоты среды MEM, 50 мкМ β-меркаптоэтанолом.

Для связывания использовали непосредственно свежевыделенные мышинные спленоциты. Для индукции экспрессии мышинового 4-1BB на Т-клетках мышинные спленоциты активировали следующим образом: 10^6 клеток/мл культивировали в течение 2 дней в 6-луночном планшете для культуры ткани, сенсibiliзированным 10 мкг/мл IgG армянского хомяка к мышинному CD3 ϵ (клон 145-2C11, BioLegend, каталожный № 100331) и 2 мкг/мл IgG сирийского хомяка к мышинному CD28 (клон 37.51, фирма BioLegend, каталожный № 102102).

Свежевыделенные мышинные спленоциты или активированные мышинные спленоциты собирали, промывали в D-3ФР (фирма Gibco life technologies, каталожный № 14190-136), подсчитывали количество клеток и $0,1 \times 10^6$ клеток переносили в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном, не обработанного тканевой культурой. Супернатант удаляли и клетки окрашивали, используя 100 мкл/лунку холодного (4°C) D-3ФР, содержащего в разведении 1:1000 краситель из набора LIVE/DEAD® с фиксирующим водным красителем для мертвых клеток (Fixable Aqua Dead Cell Stain) (фирма Life Technologies, L34957), в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали холодным D-3ФР и окрашивали, используя 50 мкл/лунку холодного FACS-буфера (D-3ФР, дополненный 2 об.% FBS, 5 мМ ЭДТА, pH 8 (фирма Amresco, каталожный № E177) и 7,5 мМ азидом натрия (фирма Sigma-Aldrich S2002)), который содержал в различных концентрациях молекулы, содержащие тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih), или IgG1к мыши, применяемый в качестве контроля изотипа (фирма BioLegend, каталожный № 400153, клон МОРС-21). Клетки инкубировали в течение 120 мин при 4°C, промывали 4 раза холодным D-3ФР и окрашивали, используя 50 мкл/лунку холодного FACS-буфера, содержащего 30 мкг/мл конъюгированного с ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против мышинового IgG, Fc γ -специфического (фирма Jackson Immunoresearch, каталожный № 115-096-071), в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали дважды холодным D-3ФР и окрашивали, используя 50 мкл/лунку FACS-буфера, дополненного 10 мкг/мл очищенного антитела к мышинному CD16/CD32 в виде крысиного IgG-Fc-Block (фирма BD Pharmingen, каталожный № 553142, клон 2.4G2), 0,67 мкг/мл антитела к мышинному CD8a-APC-Cy7 (фирма BioLegend, каталожный № 100714, клон 53-6.7), 0,67 мкг/мл антитела к мышинному CD3 ϵ -PerCP-Cy5.5 (фирма BioLegend, каталожный № 100328, клон 145-2C11), 0,67 мкг/мл антитела к мышинному CD4 в виде крысиного IgG2bк-PE-Cy7 (фирма BioLegend, каталожный № 100422, клон GK1.5), в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали дважды, используя 200 мкл/лунку холодного D-3ФР, фиксировали, применяя 50 мкл/лунку D-3ФР, содержащего 1% формальдегида, и ресуспендировали в FACS-буфере. Данные для клеток получали с помощью анализатора с 3 лазерами MACSQuant 10 (фирма Miltenyi Biotec) и программы Flow Jo v10.0.7 (фирма FlowJo LLC). Дискриминационные окна устанавливали на CD3⁺CD8⁺ или CD3⁺CD4⁺-Т-клетки и анализировали медианное значение интенсивности флуоресценции (MFI) для конъюгированного с ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против мышинового IgG, Fc γ -специфического AffiniPure и стандартизовали путем вычитания MFI для "пустого" контроля (без добавления содержащей тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) молекулы). Строили график зависимости значений MFI от концентрации применяемых содержащих тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) молекул для характеристики связывания с клеткой, с которой связана молекула мышинового 4-1BB.

Как продемонстрировано на фиг. 13, содержащие мышинный 4-1BBL конструкции М.1 и М.2, а также соответствующие контрольные молекулы (контроль М.1 и контроль М.2) связывались практически с одинаковой аффинностью с мышинным 4-1BB. В табл. 39 представлены полученные величины EC₅₀ для конструкций М.1 и М.2 и контрольных молекул.

Таблица 39. Связывание на активированных экспрессирующих 4-1BB CD4⁺-Т-клетках и CD8⁺-Т-клетках

Конструкция	EC ₅₀ [нМ] 4-1BB ⁺ CD8 ⁺	EC ₅₀ [нМ] 4-1BB ⁺ CD4 ⁺
контроль М.1	0,95	0,74
М.1	0,87	0,52
контроль М.2	0,78	0,6
М.2	0,54	0,42

5.4.2. Связывание на экспрессирующих FAP опухолевых клетках Для анализов связывания на экспрессирующих FAP клетках применяли клеточную линию человеческой меланомы MV-3 (см. Ruiter и др., Int. J. Cancer, 48(1), 1991, сс. 85-91), WM-266-4 (ATTC CRL-1676) (анти-FAP-специфический клон 28H1 обладает перекрестной реактивностью к мышинному/человеческому антигену). Добавляли $0,1 \times 10^6$ экспрессирующих FAP опухолевых клеток в каждую лунку круглодонных 96-луночных планшетов для суспензионных клеток (фирма Greiner bio-one, Cellstar, каталожный № 650185). Клетки однократно промывали 200 мкл D-3ФР и дебрис ресуспендировали в 100 мкл/лунку холодного (4°C) D-3ФР-буфера, содержащего в разведении 1:1000 краситель из набора LIVE/DEAD® с фиксирующим водным красителем для мертвых клеток (Fixable Aqua Dead Cell Stain) (фирма Life Technologies, L34957), и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Клетки однократно промывали 200 мкл холодного (4°C) D-3ФР-буфера и ресуспендировали, используя 50 мкл/лунку холодного (4°C) FACS-буфера (D-3ФР, дополненный 2 об.% FBS,

5 мМ ЭДТА, pH 8 (фирма Amresco, каталожный № E177) и 7,5 мМ азидом натрия (фирма Sigma-Aldrich S2002), который включал в полученных серийными разведениями концентрациях молекулы, содержащие тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih), с последующей инкубацией в течение 1 ч при 4°C. После 4 промывок с использованием 200 мкл/лунку клетки окрашивали, применяя 50 мкл/лунку холодного (4°C) FACS-буфера, содержащего 30 мкг/мл конъюгированного с ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против мышинового IgG, Fcγ-специфического (фирма Jackson ImmunoResearch, каталожный № 115-096-071), в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали дважды 200 мкл (4°C) FACS-буфера, фиксировали, используя 50 мкл/лунку D-3ФР, содержащего 1% формальдегида, и ресуспендировали в FACS-буфере. Данные для клеток получали с помощью анализатора с 3 лазерами MACSQuant 10 (фирма Mitenyi Biotec) и программы Flow Jo (FlowJo X 10.0.7). Дискриминационные окна устанавливали на живые клетки и анализировали медианное значение интенсивности флуоресценции (MFI) для конъюгированного с ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против мышинового IgG, Fcγ-специфического и стандартизовали путем вычитания MFI для "пустого" контроля (без добавления содержащей тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) молекулы). Строили график зависимости значений MFI от концентрации применяемых содержащих тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) молекул для характеристики связывания с клеткой, с которой связана молекула мышинового 4-1BB. Как и ожидалось, содержащие мышинный 4-1BBL конструкции M.1 и M.2, связывались практически с одинаковой аффинностью с FAP, в то время как контрольные молекулы не связывались с ним.

На фиг. 14 показано связывание нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный мышинный лиганд для 4-1BB-Fc(kih) конструкций M.1 и M.2 с экспрессирующими человеческий FAP клетками человеческой меланомы MV-3 (фиг. 14А) и клетками WM-266-4 (фиг. 14Б). В табл. 40 представлены полученные величины EC₅₀.

Таблица 40. Связывание с экспрессирующими человеческий FAP опухолевыми клетками

Конструкция	EC ₅₀ [нМ]	EC ₅₀ [нМ]
	FAP ⁺ MV-3	FAP ⁺ WM-266-4
M.1	7,26	5,14
M.2	6,9	5,63

Пример 6.

Биологическая активность нацеленных содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

6.1. Активация NF-κB в клетках HeLa, экспрессирующих человеческий 4-1BB.

Создание клеток HeLa, экспрессирующих человеческий 4-1BB и NF-κB-люциферазу.

Клеточную линию карциномы шейки матки HeLa (ATCC CCL-2) трансдуцировали плазмидой, основой которой является экспрессионный вектор pETR10829, содержащий последовательность человеческого 4-1BB (Uniprot, код доступа Q07011) под контролем промотора CMV, и ген, обуславливающий устойчивость к пурамицину. Клетки культивировали в среде DMEM, дополненной 10 об.% FBS, 1 об.% GlutaMAX-I и 3 мкг/мл пурамицина.

Трансдуцированные 4-1BB клетки HeLa тестировали в отношении экспрессии 4-1BB с помощью проточной цитометрии: 0,2×10⁶ живых клеток ресуспендировали в 100 мкл FACS-буфера, содержащего 0,1 мкг конъюгированного с PerCP/Cy5.5 мышинового IgG1κ, клон 4B4-1 к человеческому 4-1BB (BioLegend, каталожный № 309814) или контроль изотипа (конъюгированное с PerCP/Cy5.5 применяемое в качестве контроля изотипа мышинное антитело IgG1κ, клон MOPC-21, фирма BioLegend, каталожный № 400150), и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали дважды FACS-буфером, ресуспендировали в 300 мкл FACS-буфера, содержащего 0,06 мкг DAPI (фирма Santa Cruz Biotec, каталожный № Sc-3598), и данные получали с использованием устройства с 5 лазерами LSR-Fortessa (фирма BD Bioscience, программа DIVA). Осуществляли серийные разведения для создания единичных клонов с использованием следующего метода: трансдуцированные человеческим 4-1BB клетки HeLa ресуспендировали в среде до достижения плотности 10, 5 и 2,5 клеток/мл и 200 мкл клеточных суспензий переносили в обработанные круглодонные 96-луночные планшеты для культуры ткани (6 планшетов на каждую плотность клеток, фирма TPP, каталожный № 92697). Единичные клоны собирали, размножали и тестировали в отношении экспрессии 4-1BB согласно описанному выше методу. Клон с наиболее высоким уровнем экспрессии 4-1BB (клон 5) отбирали для последующей трансфекции экспрессионным вектором для NF-κB-люциферазы 5495p Tranlucent HygB. Вектор придавал трансфектированным клеткам как устойчивость к гигромицину В, так и способность экспрессировать люциферазу под контролем NF-κB-реагирующего элемента (каркасный вектор фирмы Panomics, каталожный № LR0051 с интродуцированной устойчивостью к HyB). Клон 5 клеток HeLa с человеческим 4-1BB культивировали до 70% конфлюэнтности. Вносили 50 мкг (40 мкл) линейаризованного (с помощью рестриктаз AseI и SalI) экспрессионного вектора 5495p Tranlucent HygB в кювету модульной системы для электропорации Gene Pulser/MicroPulser с 0,4-сантиметровой щелью (фирма Biorad, каталожный № 65-2081). Добавляли 2,5×10⁶ клеток клона 5 HeLa с человеческим 4-1BB в 400 мкл среды DMEM без добавок и осторожно перемешивали с раствором плазмиды. Трансфекцию клеток осуществляли с помощью общей системы Gene Pulser

Xcell (фирма Biograd, каталожный № 165-2660), применяя следующие установки: экспоненциальный импульс, емкость 500 мкФ, напряжение 160 В, сопротивление ∞ . Немедленно после импульсной обработки трансфектированные клетки переносили в 75 см²-колбу для культуры ткани (фирма TPP, каталожный № 90075) с 15 мл теплой (37°C) среды DMEM, дополненной 10 об.% FBS и 1 об.% GlutaMAX-I. На следующий день добавляли культуральную среду, содержащую 3 мкг/мл пуромицина и 200 мкг/мл гидромицина В (фирма Roche, каталожный № 10843555001). Выжившие клетки размножали и осуществляли их серийное разведение согласно описанному выше методу с получением единичных клонов.

Клоны тестировали в отношении экспрессии 4-1BB согласно описанному выше методу и в отношении NF-κB-люциферазной активности следующим образом: клоны собирали в селекционной среде и подсчитывали с помощью устройства Cell Counter Vi-cell xt 2.03 (фирма Beckman Coulter, каталожный № 731050). Плотность клеток доводили до $0,33 \times 10^6$ клеток/мл и 150 мкл указанной клеточной суспензии переносили в каждую лунку стерильного белого плоскодонного 96-луночного планшета для культуры ткани с крышкой (фирма Greiner bio-one, каталожный № 655083) и в качестве контроля - в обычный плоскодонный 96-луночный планшет для культуры ткани (фирма TPP, каталожный № 92096) для определения выживаемости и плотности клеток на следующий день. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день добавляли 50 мкл среды, содержащей в различных концентрациях рекомбинантный человеческий фактор некроза опухоли альфа (rhTNF-α, фирма PeproTech, каталожный № 300-01 A), в каждую лунку 96-луночного планшета, получая конечную концентрацию rhTNF-α 100, 50, 25, 12,5, 6,25 и 0 нг/лунку. Клетки инкубировали в течение 6 ч при 37°C и 5% CO₂ и затем промывали три раза, применяя 200 мкл/лунку D-3ФР. Добавляли репортерный буфер для лизиса (фирма Promega, каталожный № E3971) в каждую лунку (40 мкл) и планшеты выдерживали в течение ночи при -20°C. На следующий день планшеты с замороженными клетками и идентифицирующий буфер (система для анализа люциферазы 1000, фирма Promega, каталожный № E4550) подвергали оттаиванию, доводя до комнатной температуры. Добавляли 100 мкл идентифицирующего буфера в каждую лунку и планшеты анализировали максимально быстро с использованием ридера для микропланшетов SpectraMax M5/M5e и программы SoftMax Pro (фирма Molecular Devices). Измеренные единицы испускаемого света в течение 500 мс/лунку (URL), превышающие контроль (без добавления rhTNF-α), принимали за люциферазную активность. Для дальнейшего исследования был отобран клон 26 NF-κB-luc-4-1BB-HeLa, характеризующийся наиболее высокой люциферазной активностью и значительным уровнем экспрессии 4-1BB.

Активация NF-κB в клетках HeLa, экспрессирующих человеческий 4-1BB, при совместном культивировании с экспрессирующими FAP опухолевыми клетками.

Клетки HeLa, экспрессирующие NF-κB-люциферазу и человеческий 4-1BB, собирали и ресуспендировали в среде DMEM, дополненной 10 об.% FBS и 1 об.% GlutaMAX-I, до концентраций $0,2 \times 10^6$ клеток/мл. 100 мкл (2×10^4 клеток) указанной клеточной суспензии переносили в каждую лунку стерильного белого плоскодонного 96-луночного планшета для культуры ткани с крышкой (фирма Greiner bio-one, каталожный № 655083) и планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день добавляли 50 мкл среды, содержащей в концентрациях, определенных титрованием, нацеленные на FAP содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (FAP разделенный тример 4-1BBL) или "ненацеленные" (DP47) содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (DP47 разделенный тример 4-1BBL). Экспрессирующие FAP опухолевые клетки (MV3, WM-266-4 или NIH/3T3-huFAP, клон 39) ресуспендировали в среде DMEM, дополненной 10 об.% FBS и 1 об.% GlutaMAX-I, до концентрации 2×10^6 клеток/мл.

Суспензию экспрессирующих FAP опухолевых клеток (50 мкл, конечное соотношение 1:5) или только среду добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение 6 ч при 37°C и 5% CO₂. Клетки промывали два раза 200 мкл/лунку D-3ФР. Добавляли в каждую лунку 40 мкл свежеприготовленного репортерного буфера для лизиса (фирма Promega, каталожный № E3971) и планшеты выдерживали в течение ночи при -20°C. На следующий день планшеты с замороженными клетками и идентифицирующий буфер (система для анализа люциферазы 1000, фирма Promega, каталожный № E4550) подвергали оттаиванию, доводя до комнатной температуры. Добавляли 100 мкл идентифицирующего буфера в каждую лунку и максимально быстро измеряли люциферазную активность с помощью ридера для микропланшетов SpectraMax M5/M5e и программы SoftMax Pro (фирма Molecular Devices), подсчитывая испускание света в URL (единицы испускаемого света в течение 0,5 с/лунку), или с помощью планшет-ридера для считывания нескольких меток Victor3 1420 (multilabel counter plate reader) (фирма Perkin Elmer) и программы Perkin Elmer 2030 Manager, определяя испускание света в виде импульсов в секунду (CPS), и строили график зависимости от концентрации тестируемых конструкций.

Нацеленная на FAP содержащая тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающая молекула (FAP разделенный тример 4-1BBL) инициировала активацию пути передачи сигналов NFκB в репортерной клеточной линии в присутствии экспрессирующих FAP опухолевых клеток. В противоположность этому, "ненацеленный" вариант такой же молекулы не инициировал такое же действие при применении в любых тестируемых концентрациях (фиг. 16). Указанная активность нацеленного 4-1BBL строго зависела от экспрессии FAP на клеточной поверхности опухолевых клеток, поскольку никакой

активации NF-κB не удалось обнаружить при культивировании NF-κB-репортерной клеточной линии с FAP-негативными опухолевыми клетками даже в присутствии нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающей молекулы.

Данные об измеренной активности конструкций 1.1-1.10 представлены на 17, а данные, полученные для конструкций 2.1, 2.4 и 2.5, представлены на фиг. 18.

6.2. Активация NFκB в клетках HEK T293, экспрессирующих 4-1BB обезьян циномолгус.

Создание клеток HEK T293, экспрессирующих 4-1BB обезьян циномолгус и NFκB-люциферазу.

Для получения вирусоподобных частиц (VLP) клетки почки человеческого эмбриона (HEK) T293/17 (ATCC CRL-11268) трансфектировали с использованием реагента Lipofectamine® LTX с реагентом PLUS™ (фирма Life Technologies, каталожный № 15338100) в сочетании с вектором pETR14372, кодирующим кассету репортерного гена NFκB-люцифераза-IRIS-GFP (NFκB-luc-GFP) согласно протоколу производителя. Через 6 ч осуществляли замещение средой DMEM, дополненной 10% FBS, и VLP собирали через 4 дня. Свежие клетки HEK T293T трансдуцировали при конфлюэнтности 70-80% с помощью полученной конструкции pETR14372-VLP и 4 мкг/мл полибрена. Клетки культивировали в течение 24 ч и осуществляли замену среды. Трансдуцированные клетки HEK T293/17 собирали и серийно разводили до получения 1 клетки/лунку для скрининга в отношении стабильных единичных клонов. Единичные клоны стимулировали 25 нг/мл TNF-α (фирма PeproTech Inc., каталожный № 300-01A) в среде и подвергали скринингу в отношении положительного GFP-сигнала в течение времени с использованием системы для флуоресцентной микроскопии IncuCyte Zoom (фирма Essen Bioscience). После регистрации GFP-сигнала клетки тестировали в отношении люциферазной активности с помощью набора для оценки люциферазы Nano Glo (фирма Promega, N1120) согласно протоколу производителя. Люциферазную активность измеряли с помощью планшет-ридера для считывания нескольких меток Victor3 1420 (фирма Perkin Elmer) и программы Perkin Elmer 2030 Manager. Определяли испускание света в виде импульсов в секунду (CPS) в течение 0,5 с/лунку. Установлено, что клон 61 отличается наиболее высоким уровнем экспрессии GFP и люциферазы после активации TNF-α, и его также использовали для создания репортерной линии клеток.

С помощью описанного выше метода получали новые VLP с использованием вектора pETR14879, кодирующего 4-1BB обезьян циномолгус и ген устойчивости к пуромицину, и клеточную линию HEK T293T NFκB-luc-GFP, клон 61 трансдуцировали при конфлюэнтности 70-80% полученной конструкции pETR14879-VLP и 4 мкг/мл полибрена. Клетки культивировали в течение 24 ч и осуществляли обмен среды. Через 4 дня после трансдукции клетки окрашивали конъюгированным с PE античеловеческим, дающим перекрестную реакцию с 4-1BB обезьян циномогус антителом (мышинный IgG1κ, клон MOPC-21, фирма BioLegend, каталожный № 309804) в D-3ФР, содержащем 1% FBS, осуществляли сортировку с помощью FACS (ARIA, фирма BD) и высевали из расчета 5 клеток/лунку в среду DMEM, дополненную 10% FBS, которая содержала 1 мкг/мл пуромицина (фирма InvivoGen, каталожный № ant-pr). Выращенные клоны тестировали согласно методу, описанному для оценки GFP и люциферазной активности, после стимуляции TNF-α и в отношении высокого уровня экспрессии 4-1BB обезьян циномолгус с помощью проточной цитометрии. Дважды позитивные клоны отбирали и тестировали в отношении люциферазной активности в присутствии одновалентной нацеленной на FAP конструкции 2.1 или контроля Б и FAP-экспрессирующих клеток MV-3 или WM-266-4 клетки. Был отобран HEK T293/17-NF-κB-luc-GFP-су4-1BB-экспрессирующий клон 61-13 для применения во всех дополнительных экспериментах.

Активация NFκB в репортерных клетках HEK T293/17, экспрессирующих 4-1BB обезьян циномолгус, при совместном культивировании с экспрессирующими FAP опухолевыми клетками.

Клетки HEK T293/17-NFκB-luc-GFP-су4-1BB-экспрессирующего клона 61-13, собирали и ресуспендировали в среде DMEM, дополненной 10 об.% FBS и 1 об.% GlutaMAX-I, до достижения концентрации $0,2 \times 10^6$ клеток/мл. 100 мкл (2×10^4 клеток) указанной клеточной суспензии переносили в каждую лунку стерильного белого плоскостонного 96-луночного планшета для культуры ткани с крышкой (фирма Greiner bio-one, каталожный № 655083) и планшет инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день добавляли 50 мкл среды, содержащей в различных концентрациях, полученных титрованием, нацеленные на FAP или "ненацеленные" содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы. Экспрессирующие FAP опухолевые клетки (MV3 и WM-266-4) ресуспендировали в среде до достижения концентрации 2×10^6 клеток/мл. Суспензию экспрессирующих FAP опухолевых клеток (50 мкл) добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение 6 ч при 37°C и 5% CO₂. Принцип анализа проиллюстрирован на фиг. 19. После инкубации клетки промывали три раза 200 мкл/лунку D-3ФР. Добавляли в каждую лунку 40 мкл свежеприготовленного репортерного буфера для лизиса (фирма Promega, каталожный № E3971) и планшеты выдерживали в течение ночи при -20°C. На следующий день планшеты с замороженными клетками и идентифицирующий буфер (система для анализа люциферазы 1000, фирма Promega, каталожный № E4550) подвергали оттаиванию, доводя до комнатной температуры. Добавляли 100 мкл идентифицирующего буфера в каждую лунку и максимально быстро измеряли люциферазную активность с использованием ридера для микропланшетов Spectra-Max M5/M5e (время интегрирования 500 мс, без фильтра, учитывая все длины волн) (фирма Molecular

Devices). Определяли испускание света в единицах испускаемого света (URL) в течение 0,5 с/лунку и строили график зависимости от концентрации тестируемых конструкций, т.е. нацеленных на FAP или "ненацеленных" содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул. Результаты для конструкций, описанных в примере 2, представлены на фиг. 20.

6.3. Анализ на основе антигенспецифических CD8⁺-Т-клеток.

Выделение и культивирование антигенспецифических CD8-Т-клеток.

Образцы свежей крови получали из инфицированного HLA-A2+ CMV добровольца. PBMC выделяли согласно описанному выше методу. CD8-Т-клетки очищали из PBMC, применяя набор для выделения с использованием негативной селекции человеческих CD8-Т-клеток согласно рекомендациям производителя (фирма Miltenyi Biotec, каталожный № 130-094-156). 10 млн выделенных CD8-Т-клеток ресуспендировали в 1 мл стерильного D-3ФР, дополненного 1 об.% FBS, вместе с 50 мкл меченного PE HLA-A2-пентамера, содержащего полученный из CMV пептид NLVPMVATV (фирма ProImmune, каталожный № F008-2B), и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки промывали дважды 3 мл стерильного D-3ФР, дополненного 1 об.% FBS. Клетки ресуспендировали в 1 мл D-3ФР, дополненного 1 об.% FBS, содержащего 1 мкг/мл антитела к человеческому CD8-ФИТЦ (клон LT8, фирма Abcam, каталожный № Ab28010), и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали дважды, ресуспендировали до концентрации 5×10^6 клеток/мл в D-3ФР, дополненном 1 об.% FBS, и фильтровали через предназначенное для предварительного разделения 30-микрометровое клеточное сито в виде нейлоновой сети (фирма Miltenyi Biotec, каталожный № 130-041-407). Специфические для NLV-пептида CD8⁺-Т-клетки выделяли с помощью FACS-сортирования, используя клеточный сортер ARIA (фирма BD Bioscience с программой DIVA), согласно следующим установкам: 100-микрометровое сопло и маска чистоты сортировки. Отсортированные клетки собирали в 15-миллилитровую полипропиленовую центрифужную пробирку (фирма TPP, каталожный № 91015), содержащую 5 мл среды RPMI 1640, дополненной 10 об.% FBS, 1 об.% GlutaMAX-I и 400 ед./мл пролейкина. Отсортированные клетки центрифугировали в течение 7 мин при $350 \times g$ при комнатной температуре и ресуспендировали в такой же среде до концентрации $0,53 \times 10^6$ клеток/мл. Добавляли 100 мкл/лунку указанной клеточной суспензии в каждую лунку предварительно подготовленного фидер-планшета.

Активированные PNA-L облученные аллогенные фидерные клетки получали из PBMC согласно описанному ранее методу (Levitsky и др., 1998) и распределяли в 96-луночные культуральные планшеты из расчета 2×10^5 фидерных клеток на лунку.

После культивирования в течение 1 дня удаляли 100 мкл среды/лунку из лунки, содержащей отсортированные CD8⁺-Т-клетки, и заменяли свежей средой RPMI 1640, дополненной 10 об.% FBS и 1 об.% GlutaMAX-I и 400 ед./мл пролейкина, во время культивирования эту процедуру регулярно повторяли (каждые 2-4 дня). Сразу после того как начиналась пролиферация клеток, их переносили в 24-луночный плоскодонный планшет для культуры ткани (фирма TPP, 92024). Клетки регулярно размножали/расщепляли и реактивировали с использованием нового препарата фидерных клеток.

Анализ активации антигенспецифических CD8⁺-Т-клеток.

MV3-клетки собирали и промывали D-3ФР и 2×10^7 клеток ресуспендировали в 250 мкл разбавителя С из набора для оценки флуоресценции PKH-26 Red Fluorescence Cell linker (фирма Sigma, каталожный № PKH26GL). 1 мкл раствора PKH26-Red-stain разводили 250 мкл разбавителя С и добавляли к суспензии MV3-клеток, которую затем инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте. После этого добавляли 0,5 мл FBS и клетки инкубировали в течение 1 мин и промывали однократно средой для Т-клеток, состоящей из среды RPMI 1640, дополненной 10 об.% FBS, 1 об.% GlutaMAX-I, 1мМ пируватом натрия, 1 об.% содержащей заменимые аминокислоты среды MEM и 50мкМ β-меркаптоэтанолом. 1×10^6 MV3-клеток/мл ресуспендировали в среде для Т-клеток и разделяли на три пробирки. Синтетический пептид NLVPMVATV (полученный из библиотеки Thinkpeptides®) добавляли до конечной концентрации 1×10^{-9} М или 1×10^{-8} М и клетки инкубировали в течение 90 мин. MV3-клетки однократно промывали средой для Т-клеток и ресуспендировали до плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, вносили (100 мкл/лунку) в 96-луночный круглодонный планшет для клеточной суспензии (фирма Greiner bio-one, Cellstar, каталожный № 650185) и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Принцип анализа проиллюстрирован на фиг. 21.

На следующий день добавляли 50 мкл/лунку среды для Т-клеток, содержащей в различных определенных титрованиях нацеленные содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы. Собирали NLV-специфические CD8-Т-клетки, добавляли CFDA-SE (сложный N-сукцинимидиловый эфир 5(6)-карбоксифлуоресцеиндиацетата, фирма SIGMA-Aldrich, каталожный № 21888-25MG-F) до конечной концентрации 40 нМ и клетки инкубировали при вращении в течение 15 мин при 37°C. Мечение прекращали, добавляя FBS, клетки промывали и ресуспендировали в среде для Т-клеток до конечной концентрации $0,125 \times 10^6$ клеток/мл. 50 мкл суспензии указанных меченных CFSE CD8-Т-клеток добавляли в каждую лунку (конечное соотношение E:T = 1:8). Планшеты с клетками инкубировали в течение 24 ч, 50 мкл/лунку удаляли и добавляли в каждую лунку 50 мкл среды для Т-клеток, содержащей 2,64 мкл/мл стоп-реагента Гольджи (Golgi stop) (ингибитор белкового транс-

порта, содержащий монезин, фирма BD Bioscience, каталожный № 554724) (конечная концентрация 0,66 мкл/мл). Клетки инкубировали в течение 4 ч и затем планшеты промывали 200 мкл/лунку D-3ФР и окрашивали, используя по 100 мкл/лунку (4°C) D-3ФР, содержащего разведенный в соотношении 1:5000 фиксирующий краситель для определения жизнеспособности (Fixable Viability Dye) eF450 (фирма eBioscience, каталожный № 65-0864), в течение 30 мин при 4°C. Планшеты с клетками промывали 200 мкл/лунку D-3ФР, после чего окрашивали конъюгированными с флуоресцентным красителем антителами: антитело к человеческому CD 137-PerCP/Cy5.5 (клон 4B4-1, IgG1к мыши, фирма BioLegend, каталожный № 309814), антитело к человеческому CD8-BV605 (клон RPA-T8, IgG1к мыши, фирма BioLegend, каталожный № 301012) или 0,67 мкг/мл антитела к человеческому CD8a-APC/Cy7 (клон RPA-T8, IgG1к мыши, фирма BioLegend, каталожный № 301016) и антитело к человеческому CD25 PE/Cy7 (клон BC96, IgG1к мыши, фирма BioLegend, каталожный № 302612). После инкубации в течение 30 мин при 4°C клетки промывали дважды, используя 200 мкл/лунку FACS-буфера, ресуспендировали в 50 мкл/лунку свежеприготовленного FoxP3 Fix/Perm-буфера (фирма eBioscience каталожный № 00-5123 и 00-5223) и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Планшеты промывали дважды, используя 200 мкл/лунку Perm-буфера (D-3ФР, дополненный 2 об.% FBS, 1% (мас./об.) сапонины (фирма Sigma Life Science, S7900) и 1% (мас./об.) азида натрия (фирма Sigma-Aldrich, S2002), и окрашивали, используя 50 мкл/лунку Perm-буфера (фирма eBioscience, каталожный № 00-8333-56), содержащего 0,25 мкг/мл антитела к человеческому IFN γ -APC (клон B27, IgG1к мыши, фирма BioLegend, каталожный № 506510) или 0,33 мкг/мл антитела к человеческому IFN γ -BV510 (клон 4S.B3, IgG1к мыши, фирма BioLegend, каталожный № 502543). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 4°C и промывали дважды, используя 200 мкл/лунку Perm-буфера. Для фиксации добавляли 50 мкл/лунку D-3ФР, содержащего 1% формальдегида. В этот же или на следующий день клетки ресуспендировали в 100 мкл/лунку FACS-буфера и данные получали с использованием проточного цитометра с 5 лазерами LSR-Fortessa (фирма BD Bioscience, с программой DIVA) или анализатора с 3 лазерами Miltenyi Quant Analyzer 10 (фирма Miltenyi Biotec) и программы Flow Jo (FlowJo X 10.0.7).

Как продемонстрировано на фиг. 22 и 23 для конструкций 1.1-1.10 и на фиг. 24 и 25 для конструкций 2.1, 2.3 и 2.4, антигенспецифические CD8⁺-Т-клетки в отличие от нестимулированных контролей, характеризовались повышенными уровнями поверхностной экспрессии 4-1BB в присутствии нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающей молекулы (FAP разделенный тримерный 4-1BB). Указанное действие 4-1BBL зависело от дозы и для него требовался FAP-таргетинг, поскольку добавление "ненацеленной" контрольной молекулы не влияло на уровень экспрессии 4-1BB. Кроме того, у Т-клеток, активированных более высокой концентрацией пептида (1×10^{-8} М), обнаружена устойчивая секреция INF γ в присутствии нацеленной на FAP содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающей молекулы (FAP разделенный тримерный 4-1BBL). В совокупности эти данные демонстрируют, что нацеленная на антиген содержащая тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающая молекула модулирует поверхностный фенотип и реактивность антигенспецифических Т-клеток в зависимости от таргетинга.

6.4. Сравнение нацеленных на клетку и "ненацеленных" содержащих мышинный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

Получали нацеленные и "ненацеленные" содержащие мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (FAP разделенный тримерный мышинный 4-1BBL и DP47 разделенный тримерный мышинный 4-1BBL) согласно методу, описанному в примере 1.3.

Для сравнения биологической активности нацеленных на клетку и "ненацеленных" содержащих тримерный мышинный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекул, меченные красителем для оценки пролиферации (Proliferation Dye) eFlour670 (eBioscience, каталожный № 65-0840-90) или красителем фиолетовым для оценки пролиферации CellTrace™ (Violet Cell Proliferation) (фирма Cell trace, каталожный № C34557) свежевыделенные мышинные спленоциты совместно культивировали в течение 3-4 дней в 96-луночных планшетах для культуры ткани с U-образным дном (фирма TTP, каталожный № 92097) с прикрепленными облученными 50 Гр клетками NIH/3T3-huFAP, клон 39 (описание процедуры получения см. в 5.3) в среде RPMI 1640 (фирма Gibco, каталожный № 42401-042), дополненной 10 об.% FBS, 1 об.% GlutaMAX-I, 1 мМ пируватом натрия, 1 об.% содержащей заменимые аминокислоты среды MEM и 50мкМ β -меркаптоэтанолом, в присутствии 0,5 мкг/мл IgG сирийского хомяка к мышиному CD3 (клон 145-2C11, фирма BD, каталожный № 553057), и добавляли указанную перспективную (кандидат) молекулу лекарственного средства в указанном диапазоне концентраций (фиг. 26). Через 3 или 4 дня клетки промывали FACS-буфером и окрашивали в течение 30 мин при 4°C, используя по 25 мкл/лунку FACS-буфера, содержащего крысиное антитело IgG2a-BV711 к мышиному CD8 (фирма BioLegend, каталожный № 100747, клон 53-6.7) и крысиное антитело IgG2a-BV421 к мышиному CD4 (фирма BioLegend, каталожный № 100544, клон RM4-5) и 0,67 мкг/мл IgG-PE сирийского хомяка к мышиному CD137 (4-1BB) (фирма BioLegend, каталожный № 106106, клон 17B5) и крысиное антитело IgG2b к мышиному CD25-PErCP-Cy5.5 (фирма BioLegend, каталожный № 1019112). Клетки промывали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в приготовленном Fix/Perm-буфере (Foxp3/буфер из набо-

ра для окрашивания фактора транскрипции, фирма eBioscience, каталожный № 00-5523-00). Клетки промывали дважды свежеприготовленным Perm-буфером и совместно окрашивали, используя по 25 мкл/лунку Perm-буфера, содержащего флуоресцентно меченые антитела против цитотоксической линии фактора транскрипции Eomes, т.е. крысиное антитело IgG2a-AlexaFluor488 к мышшиному Eomes (фирма eBioscience, каталожный № 534875, клон Dan11mag) и, если CD137 не окрашивали, то применяли антитело против цитотоксической эффекторной молекулы гранзима B, т.е. крысиный IgG2a к мышшиному гранзиму B-PE (фирма eBioscience, каталожный № 128822, клон 16G6), в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки промывали дважды, ресуспендировали в FACS-буфере и данные получали с использованием проточного цитометра с 5 лазерами LSR-Fortessa (фирма BD Bioscience, снабженного программой DIVA) или анализатора с 3 лазерами MACSQuant Analyzer 10 (фирма Miltenyi Biotec) и программы Flow Jo v10.0.7 (FlowJo LLC). Дискриминационные окна устанавливали на живые CD8⁺-Т-клетки и CD4⁺-Т-клетки и определяли частоту (встречаемости) пролиферирующих клеток, а также уровни экспрессии CD25, Eomes и гранзима B или CD137. Строили график зависимости частоты пролиферации, а также частоты и MFI маркеров активации от концентрации применяемых содержащих тримерный мышшиный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) молекул, для выявления функциональной активности. Как продемонстрировано на 27, удалось обнаружить повышение пролиферации CD8⁺-Т-клеток при применении конструкций M.1 и M.2.

6.5. Изменения в печени мышей, обработанных антителом к мышшиному 4-1BB Lob 12 3 (muIgG1 Wt) или конструкцией M.2.

Мышей линии C57BL/6, несущих MC38-muFAP (модель мышшиного колоректального рака) обрабатывали с с один раз в неделю в течение 3 недель агонистическими антителами к мышшиному 4-1BB, нацеленными на FAP (опыт по оценке эффективности 020-GA1401 "Эксперимент по определению эффективности нацеленной на 4-1BB терапии в комбинации с a-PD-L1 на s.c.-модели MC38-muFAP, созданной на мышшах C57B6"). Применяемые антитела представляли собой Lob 12 3 muIgG1 Wt (с Fc "дикого типа", клон Lob 12 3 от фирмы BioXcell, каталожный № BE0169) или конструкцию M 2 с DAPG-мутацией (неактивный Fc) Два антитела вводили один раз в неделю в течение трех последовательных недель. По 4 животных на группу умерщвляли через 7 дней после последней обработки и печень оценивали с помощью микроскопа.

Изменения в печени, включающие локусы гепатоцеллюлярной дегенерации с накоплением F4/80-позитивных макрофагов и пониженным количеством смешенной популяции воспалительных клеток (главным образом лимфоцитов), что часто характеризуется вазоцентрическим распределением, обнаружены только у животных, которых обрабатывали Lob 12 3 muIgG1 Wt. Обнаружены редкие единичные клеточные некрозы гепатоцитов и инфильтраты периваскулярных мононуклеарных клеток в воротную вену печени. Никаких связанных с обработкой проявлений не обнаружено в печени животных, которые получали конструкцию M 2 (табл. 41).

Таблица 41. Встречаемость гистопатологических проявлений (n=4/группу)

Обработка	Наполнитель	Lob 12 3 muIgG1 Wt	Конструкция M 2
локусы гепатоцеллюлярной дегенерации с макрофагами и воспалительными клетками	-	4	-
инфильтраты периваскулярных воспалительных клеток	-	4	-
некроз единичных клеток	-	4	-

Гепатит, связанный с перекрестной сшивкой с FcγR в печени, обнаружены у пациентов, которых лечили Urelumab BMS-663513 (Ascierto P.A. и др., 2010) и у мышей, для обработки которых применяли мышшиный суррогат. Отсутствие проявлений в печени у животных, которых обрабатывали антителом с неактивным Fc, подтверждают указанную гипотезу.

6.6. Определение фармакокинетических параметров содержащих тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

Для решения вопроса о том, пригодны ли содержащие тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, для фармацевтического применения, определяли фармакокинетические параметры (ФК-данные), такие как клиренс, объем распределения или время полувыведения ($t_{1/2}$) у мышей. Для этой цели осуществляли следующие эксперименты.

Эксперимент А. Однодозовое ФК-исследование конструкции 1.2 и контроля Б на здоровых NOG-мышшах.

Самок линии NOG, возраст которых в начале эксперимента составлял 8-10 недель (купленные в виварии Taconic, SOPF), содержали в условиях отсутствия специфических патогенов с суточным циклом 12 ч света/12 ч темноты согласно соответствующим руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местным правительственным органом (Р 2011128). После доставки животных выдерживали в течение 1 недели для того, чтобы они могли привыкнуть к новым условиям, и для обследования. На регулярной основе осуществляли постоянный мони-

торинг состояния здоровья.

Для оценки экспозиции конструкции 1.2 и контроля Б проводили однократное фармакокинетическое исследование (SDPK). Мышам линии NOG вводили с помощью i.v.-болюсной инъекции 2,5 мг/кг агента и отбирали образцы крови в выбранные моменты времени для фармакокинетической оценки. Образцы мышинной сыворотки анализировали с помощью ELISA. Биотинилированный человеческий 4-1BB, тестируемые образцы, меченное дигоксигенином антитело к huCH1 и идентифицирующее антитело к дигоксигенину (POD) добавляли в 96-луночный сенсibilизированный стрептивидином титрационный микропланшет и инкубировали после каждой стадии в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали три раза после каждой стадии для удаления несвязанных субстанций. И, наконец, связанный с пероксидазой комплекс визуализировали, добавляя в качестве субстрата раствор ABTS для образования окрашенного продукта реакции. Интенсивность окраски продукта реакции, которую определяли фотометрически при 405 нм (длина референс-волны 490 нм), пропорциональна концентрации аналита в образце сыворотки. Калибровочный диапазон стандартной кривой для конструкций составлял от 0,156 до 10 нг/мл, при этом концентрация 3 нг/мл соответствовала нижнему предел количественного определения (LLOQ). На фиг. 28А продемонстрировано снижение концентрации с течением времени, обнаруженное в этом эксперименте.

Эксперимент Б. Однократное ФК-исследование конструкций 2.1, 2.3, контроля Б и контроля В на несущих опухоли NOG-мышях, гуманизированных стволовыми клетками.

Для оценки экспозиции конструкций 2.1, 2.3, контроля Б и контроля В проводили однократное фармакокинетическое исследование (SDPK). Самок NSG-мышей, несущих человеческие стволовые клетки, получали от фирмы Jackson Laboratories. Мышей содержали в условиях отсутствия специфических патогенов с суточным циклом 12 ч света/12 ч темноты согласно соответствующим руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местным правительственным органом (ZH193-2014). После доставки животных выдерживали в течение 1 недели для того, чтобы они могли привыкнуть к новым условиям, и для обследования. На регулярной основе осуществляли постоянный мониторинг состояния здоровья.

Человеческие MKN45-клетки (человеческая карцинома желудка) исходно получали из ATCC и после размножения депонировали во внутреннем банке клеток фирмы Glycart. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FCS. Клетки культивировали при 37°C в насыщенной водным паром атмосфере с 5% CO₂. Полученный in vitro пассаж 9, жизнеспособность которого составляла 97%, применяли для подкожной инъекции. Линия человеческих фибробластов NIH-3T3 была создана на фирме Roche Nutley для экспрессии человеческого FAP. Применяли клон 39, представляющий собой полученный in vitro пассаж 12, жизнеспособность которого составляла 98%. Смешивали 50 мкл клеточной суспензии (1×10^6 MKN45-клеток + 1×10^6 3T3-huFAP) с 50 мкл матригеля и инъецировали подкожно в боковую область анестезированных мышей. Путем болюсной i.v.-инъекции вводили 10 мг/кг агентов гуманизированным мышам, когда средний размер опухолей достигал 190 мм³. Получали образцы крови в выбранные моменты времени для фармакокинетической оценки. Образцы мышинной сыворотки анализировали с помощью ELISA. Биотинилированный человеческий 4-1BB, тестируемые образцы, меченное дигоксигенином антитело к huCH1 и идентифицирующее антитело к дигоксигенину (POD) добавляли в 96-луночный сенсibilизированный стрептивидином титрационный микропланшет и инкубировали после каждой стадии в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали три раза после каждой стадии для удаления несвязанных субстанций. И, наконец, связанный с пероксидазой комплекс визуализировали, добавляя в качестве субстрата раствор ABTS для образования окрашенного продукта реакции. Интенсивность окраски продукта реакции, которую определяли фотометрически при 405 нм (длина референс-волны 490 нм), пропорциональна концентрации аналита в образце сыворотки. Калибровочный диапазон стандартной кривой для конструкций составлял от 0,156 до 10 нг/мл, при этом концентрация 3 нг/мл соответствовала нижнему предел количественного определения (LLOQ). На фиг. 28Б продемонстрировано снижение концентрации конструкций с течением времени, обнаруженное в этом эксперименте.

Эксперимент В. Однократное ФК-исследование конструкций 2.1 и 2.3 на здоровых NOG-мышях.

Самок мышей линии NOG, возраст которых в начале эксперимента составлял 8-10 недель (купленные в виварии Taconic, SOPF), содержали в специфических беспатогенных условиях с суточным циклом 12 ч света/12 ч темноты согласно соответствующим руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местным правительственным органом (P 2011128). После доставки животных выдерживали в течение 1 недели для того, чтобы они могли привыкнуть к новым условиям, и для обследования. На регулярной основе осуществляли постоянный мониторинг состояния здоровья.

Для оценки экспозиции конструкций 2.1 и 2.3 проводили однократное фармакокинетическое исследование (SDPK). Мышам линии NOG вводили с помощью болюсной i.v.-инъекции 2,5 мг/кг агента и отбирали образцы крови в выбранные моменты времени для фармакокинетической оценки. Образцы мышинной сыворотки анализировали с помощью ELISA. Биотинилированный человеческий 4-1BB, тестируемые образцы, меченное дигоксигенином антитело к huCH1 и идентифицирующее антитело к дигоксигенину (POD) добавляли в 96-луночный сенсibilизированный стрептивидином титрационный микро-

планшет и инкубировали после каждой стадии в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали три раза после каждой стадии для удаления несвязанных субстанций. И, наконец, связанный с пероксидазой комплекс визуализировали, добавляя в качестве субстрата раствор ABTS для образования окрашенного продукта реакции. Интенсивность окраски продукта реакции, которую определяли фотометрически при 405 нм (длина референс-волны 490 нм), пропорциональна концентрации аналита в образце сыворотки. Калибровочный диапазон стандартной кривой для конструкций составлял от 0,156 до 10 нг/мл, при этом концентрация 3 нг/мл соответствовала нижнему предел количественного определения (LLOQ). На фиг. 28В продемонстрировано снижение концентрации с течением времени.

Протестированные конструкции 2.1 и 2.3 оказались достаточно стабильными в организме и обладали ФК-параметрами в диапазоне, приемлемом для создания фармацевтических средств. Из полученных результатов можно сделать заключение также о том, что конструкция 2.1 оказалась несколько более стабильной.

6.7. Превазирование FAP в человеческих опухолях.

Изучали превазирование FAP в человеческих опухолях согласно методу, описанному в WO 2014/161845, для принятия решения о возможности клинического применения нацеленных на FAP конструкций.

Крысиное антитело к человеческой сепразе (IgG2a, клон D8) фирма Vitatex (MABS1001) применяли для иммуноокрашивания FFPET-(фиксированных формалином, залитых в парафин тканей)-срезов толщиной 2,5 мкм различных указанных опухолей с помощью системы Ventana Benchmark XT. Срезы подвергали стандартной CC1-обработке с последующей инкубацией антитела в течение 60 мин при 37°C в концентрации 5 мкг/мл в разбавителе для антител фирмы Dako (S3022) и позитивное окрашивание выявляли с помощью системы детекции Ultraview DAB (фирма Ventana, № 760-4456). Антитело соответствующего изотипа фирмы Abcam (ab18450) применяли в качестве отрицательного контроля. Стромальный FAP⁺-инфильтрат присутствовал в человеческих опухолях различных типов, включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC), рак молочной железы, колоректальный рак (CRC), рак поджелудочной железы (PAC), рак желудка, немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC) и мезотелиому, что демонстрирует потенциальный клинический интерес применения нацеленных на FAP конструкций (табл. 42).

Таблица 42. Превазирование FAP в человеческих опухолях

Тип опухоли	% случаев FAP ⁺ -инфильтрата от среднего до высокого уровня	Кол-во изученных образцов
HNSCC	90	10
рак молочной железы (BC)	77	105
тройной негативный BC	80	7
CRC	77	90
PAC	74	19
рак желудка	68	28
NSCLC	66	90
мезотелиома	60	10

Пример 7.

7.1. Получение нацеленных на CD19 (8B8-018) содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

7.1.1. Получение, очистка и характеристика слияния антиген CD19-Fc для процесса фагового дисплея.

Для экспрессии и очистки эктодомена CD19 человека и обезьян циномоглус в мономерном состоянии (последовательность человеческого CD19 см. в SEQ ID NO: 31) соответствующий ДНК-фрагмент сливали с геном человеческого IgG1-Fc, содержащего мутации, приводящие к образованию "выступа" (человеческая последовательность: SEQ ID NO: 186; обезьяны (последовательность обезьян циномоглус: SEQ ID NO: 188), и трансфектировали партнером (контрагентом) "Fc-"впадина" (SEQ ID NO: 86) (Merchant и др., 1998). Интродуцировали сайт расщепления IgA (PTPPTP) между эктодоменом антигена и Fc-цепью с "выступом". Интродуцировали Avi-метку для направленного биотинилирования на C-конец конструкции антиген-Fc-"выступ" и интродуцировали мутации H435R и Y436F в Fc-цепь с "впадиной" с целью очистки (Jendeborg L. и др. J. Immunological methods, 1997). Комбинация конструкции антиген-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W (человеческая последовательность: SEQ ID NO: 187; последовательность обезьян циномоглус: SEQ ID NO: 189), с Fc-цепью с "впадиной", содержащей мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V (SEQ ID NO: 90), позволяла получать гетеродимерный фрагмент Fc-слияния, который включал единичную копию эктодомена CD19 (аналог содержащей 4-1BB конструкции, представленной на фиг. 5B). В табл. 43 представлены кДНК и аминокислотные последовательности конструкции антиген в слиянии с Fc.

Таблица 43. кДНК и аминокислотные последовательности молекулы, содержащей мономерный антиген CD19 человека и обезьян циномолгус в слиянии с Fc(kih)

SEQ ID NO:	Антиген	Последовательность
86	нуклеотидная последовательность Fc-цепи с «впадиной»	см. таблицу 32
186	нуклеотидная последовательность конструкции человеческого антигена CD19-Fc-цепь с «выступом»-avi-метка	CCCGAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAATGCCGT GCTGCAGTGCCTGAAGGGCACCTCCGATGGCCCTACCCAGCAGCTGA CCTGGTCCAGAGAGAGCCCCCTGAAGCCCTTCCTGAAGCTGTCTCTG GGCCTGCCTGGCCTGGGCATCCATATGAGGCCTCTGGCCATCTGGCT GTTTCATCTTCAACGTGTCCCAGCAGATGGGCGGCTTCTACCTGTGTG AGCCTGGCCCCCATCTGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGCTGGACCGTG AACGTGGAAGGATCCGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGTGTCCGATCT GGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAGAACAGATCTAGCGAGGGCCCCA GCAGCCCCAGCGGCAAACTGATGAGCCCCAAGCTGTACGTGTGGGCC AAGGACAGACCCGAGATCTGGGAGGGCGAGCCTCCTTGCCCTGCCCC TAGAGACAGCCTGAACCAGAGCCTGAGCCAGGACCTGACAATGGCCCC CTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGTG TCTAGAGGCCCTCTGAGCTGGACCCACGTGCACCCTAAGGGCCCTAA GAGCCTGCTGAGCCTGGAAGTGAAGGACGACAGGCCCGCCAGAGATA TGTGGGTGATGGAACCGGCTGCTGCTGCCTAGAGCCACAGCCCCAG GATGCCGGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCAACCTGACCATGAGCTT CCACCTGGAAATCACCGCCAGACCCGTGCTGTGGCACTGGCTGCTGA GAACAGGCGGCTGGAAGGTGACGCTAGCGGTGGTAGTCCGACACCT CCGACACCCGGGGGTGGTCTGTCAGACAAAACCTACACATGCCACACC GTGCCAGCACCTGAAGCCGACAGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTC ACCGTCTGTCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCA TGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACGCTGTGGTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCGACGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA TCCGGAGGCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAGATTGAATGGCA CGAG
90	полипептидная последовательность Fc-цепи с «впадиной»	см. таблицу 32

187	полипептидная последовательность конструкции человеческого антиген CD19-Fc-цепь с «выступом»-avi метка	PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSL GLPGLGIHMRPLAIWLFI FNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTV NVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWA KDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSV SRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVWMTGLLLPRATAQ DAGKYCHRGNTMSFHLLEI TARPVLWHWLLRTGGWKVDASGGSPPT PTPGGGSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SGGLNDI FEAQKIEWHE
188	нуклеотидная последовательность конструкции антиген CD19 обезьян циномолгус-Fc-цепь с «выступом»-avi –метка	CCCCAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAATGCCCGT GCTCCAGTGCCTGGAAGGCACCTCCGATGGCCCTACACAGCAGCTCG TGTGGTGACAGACAGCCCTTCGAGCCCTTCCTGAACCTGTCTCTG GGCCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATGGGCCCTCTGGGCATCTGGCT GCTGATCTTCAACGTGTCCAACAGACCGCGCGCTTCTACCTGTGTG AGCCTGGCCTGCCAAGCGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGCAGCCGTG TCCGTGGAAGGATCTGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGTGTCCGATCT GGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAGAACAAGAAGCAGCGAGGGCCCTA GCAGCCCCAGCGCAAGCTGAATAGCAGCCAGCTGTACGTGTGGGCC AAGGACAGACCCGAGATGTGGGAGGGCGAGCCTGTGTGTGGCCCCC TAGAGATAGCCTGAACAGAGCCTGAGCCAGGACCTGACATGGCCCC CTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGTG TCCAGAGCCCTCTGAGCTGGACACACGTGCGGCCAAAGGCCCTAA GAGCAGCCTGCTGAGCCTGGAAGTGAAGGACGACCGGCCGACCGGG ATATGTGGGTGGTGATACAGGCCTGCTGCTGACAGAGCCACAGCC CAGGATGCCGGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCAACTGGACCAAGAG CTTTTACCTGGAAATCACCGCCAGACCCGCCCTGTGGCACTGGCTGC TGAGAAATCGGAGGCTGGAAGGTGACGCTAGCGGTGGTGTGCGGACA CCTCCGACACCCGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACATCACATGCCCC ACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGACCGTCACTGTCTCTCT TCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACAGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAGTCCCAAGACA AGCCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTC CTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT CAAGGTCTCCAACAAGCCCTCGGAGCCCCCATCGAAGAACCATCT CCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC CCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGTGGTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAATCCGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAGATTGAATG GCACGAG
189	полипептидная последовательность конструкции антиген CD19 обезьян циномолгус-Fc-цепь с «выступом»-avi-метка	PQEPLVVKVEEGDNAVLQCLEGTSDGPTQQLVWCRDSPFEPFLNLSL GLPGMGI RMGPLGIWLLI FNVSNQTTGGFYLCQPGPLPSEKAWQPGWTV SVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWA KDRPEMWEGEFVCGPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSV SRGPLSWTHVRPKGPKSLLSLELKDDRPDRDMWVVDGTTLLLRATA QDAGKYCHRGNTKSFYLEI TARPALWHWLLRIGWKVDASGGSPPT PTPGGGSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPP PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KSGGLNDI FEAQKIEWHE

Для получения слитых молекул, содержащих мономерный антиген/Fc, находящиеся на экспоненциальной фазе роста растущие в суспензии CHO-клетки совместно трансфектировали двумя плазмидами, кодирующими два компонента слитого белка (цепи с "выступом" и "впадиной"), используя стандартные методы.

Секретированный белок очищали из супернатанта клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии на белке А с последующей гель-фильтрацией. Для осуществления аффинной хроматографии супернатант вносили в колонку MabSelect Sure (CV = 5-15 мл, смола фирмы GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим фосфат натрия (20 мМ), цитрат натрия (20 мМ) (pH 7,5). Несвязанный белок удаляли путем промывки таким же буфером, используя его в объеме, кратном по меньшей мере 6 об. колонки. Связанный белок элюировали, используя линейный градиент: стадия 1, 10 CV от 0 до 60% буфера для элюции (буфер, содержащий 20 мМ цитрат натрия, 500 мМ хлорид натрия (pH 2,5)); стадия 2, 2 CV от 60 до 100% буфера для элюции. При осуществлении элюции с использованием линейного градиента осуществляли дополнительную ступенчатую элюцию с применением объема, кратного 2 об. колонки, 100%-ного буфера для элюции.

Значение pH собранных фракций регулировали, добавляя 1/40 (об./об.) 2М Трис, pH 8,0. Белок концентрировали и фильтровали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную раствором, содержащим 2 мМ MOPS, 150 мМ хлорид натрия, 0,02% (мас./об.) азид на-

трия, pH 7,4.

В табл. 44 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономеров слитого белка, содержащего мономерный антиген CD19 человека и обезьян циномолгус и Fc(kih).

Таблица 44. Биохимический анализ слитого белка, содержащего мономерный антиген CD19 человека и обезьян циномолгус и Fc(kih)

Конструкция	Мономер [%] (SEC)	Выход [мг/л]
слитый белок, содержащий мономерный человеческий CD19 и Fc(kih)	91	0,2
слитый белок, содержащий мономерный CD19 обезьян циномолгус и Fc(kih)	95	3,56

Часть очищенного антигена биотинилировали *in vitro* с использованием набора "BirA biotin-protein ligase standard reaction" (фирма Avidity, каталожный № BirA500) согласно инструкциям производителя. Степень биотинилирования слияния, содержащего человеческий CD19, составляла 94%, а соответствующей содержащей CD19 обезьян циномолгус конструкции - 100%. Затем биотинилированный белок применяли для селекции, скрининга и характеристики полученных из 8B8 клонов с созревшей аффинностью, у которых отсутствовали "горячие точки" деамидирования N27d и N28.

7.1.2. Создание клона 8B8-018 антитела к CD19.

7.1.2.1. Иммунизация и создание мышиных антител к человеческому CD19 (метод гибридом).

Мышей линии Balb/c иммунизировали 6 раз и подвергали бустер-иммунизации с использованием трансфектированных CD19 клеток HEK293 (средняя плотность рецептора 35000 на клетку). Осуществляли мониторинг иммунного ответа путем тестирования образцов сыворотки с помощью ELISA для несущих CD19 клеток на трансфектированных человеческим CD19 клетках NIH-3T3. Селезеночные клетки мышей с достаточными титрами антитела к человеческому CD19 применяли для иммортализации путем слияния с клеточной линией мышинной миеломы P3X63 Ag8.653. Осуществляли три слияния и супернатанты гибридом подвергали скринингу с использованием предназначенного для анализа клеток ELISA с применением трансфектированных человеческим CD19 клеток NIH-3T3 и осуществляли анализ связывания с помощью FACS, применяя клетки Дауди (CD19⁺) и CD19⁻-клетки для специфических в отношении человеческого CD19 антител (см. пример 1 в WO 2011/147834).

7.1.2.2. Скрининг гибридом и оценка биологической функции в отношении клеток антитела к CD19.

ELISA для анализа клеток для скрининга антител против человеческого CD19.

Предназначенный для анализа клеток ELISA применяли для скрининга гибридом и для идентификации тех гибридом, которые секретируют антитела против человеческого CD19. Клетки NIH3T3, трансфектированные человеческим CD19, применяли в качестве позитивных клеток; нетрансфектированные NIH3T3-клетки применяли в качестве применяемых в качестве отрицательного контроля клеток. Для оценки позитивных гибридом определяли соотношение между ОП для трансфектированных и нетрансфектированных NIH3T3-клеток.

Культуральная среда: DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 мг/мл), 10% FCS, Na-пируват, NEAA, глутамин.

Антитела, применяемые в качестве положительного контроля: моноклональное антитело к CD19 (IgG1), фирма Pharmingen, каталожный № 555409, с = 1 мг/мл.

Идентифицирующее антитело: козий антимышиный IgG (H+L), конъюгированный с HRP, фирма Bio-Rad, каталожный № 170-06516.

Разведение 1: 2000 в 1× блокирующем реагенте для ELISA.

Другие реагенты: фибронектин, фирма Roche, каталожный № 838039, с = 1 мг/мл.

Глутаровый альдегид: 25% маточный раствор, фирма Grade Agar Scientific, № R102, конечная концентрация: 0,05% в ЗФР.

Блокирующий реагент для ELISA: 10× маточный раствор, фирма Roche, каталожный № 1112589.

ТМВ-субстрат: фирма Roche, каталожный № 11432559.

Стоп-раствор: 1M H₂SO₄, фирма BioRad, каталожный № 170-6516, разведение 1: 2000 в 1× блокирующем реагенте для ELISA.

День 1.

Сенсибилизация фибронектином: 5 мкг/см² в ЗФР; 96-луночный планшет = 32 см²; 160 мкг/планшет в 6 мл;

ЗФР, 50 мкл/лунку;

инкубация в течение 45 мин при КТ, аспирация сенсибилизирующего раствора;

посев 1,25×10⁴ клеток/лунку в 50 мкл культуральной среды в 96-луночный планшет;

инкубация в течение 40 ч при 37°C;

добавление в верхнюю половину планшета: NIH3T3-клетки, экспрессирующие CD19;

добавление в нижнюю половину планшета: нетрансфектированные NIH3T3-клетки.

День 3.

Добавление антитела, представляющего собой положительный контроль, или образцов (суперна-

тант или мышиная сыворотка) в 50 мкл культуральной среды;

инкубация 2 ч при 4°C;

удаление среды, фиксация клеток 100 мкл глутарового альдегида (0,05% в ЗФР);

промывка два раза 200 мкл ЗФР;

добавление идентифицирующего антитела 1:2000, 50 мкл/лунку;

инкубация 2 ч при КТ;

промывка три раза 200 мкл ЗФР;

добавление 50 мкл ТМВ, инкубация в течение 30 мин при КТ;

прекращение реакции путем добавления 25 мкл 1М H₂SO₄; определение экстинкции при 450 нМ/620 нМ;

расчет результатов: соотношение между ОП для NIH3T3 CD19:ОП для нетрансфектированных NIH3T3.

Для отобранных антител продемонстрировано специфическое связывание с трансфектированными CD19 NIH3T3-клетками по сравнению с нетрансфектированными NIH3T3-клетками (см. пример 2 в WO 2011/147834).

7.1.2.3. Гуманизация антитела к CD19.

CD19-связывающую специфичность мышиного антитела переносили в человеческий акцепторный каркасный участок для элиминации потенциальных проявлений иммуногенности, возникающей в ответ на сегменты последовательностей, которые человеческий организм может распознавать как "чужие". Это осуществляли путем трансплантации полных гипервариабельных участков (CDR) мышиного (донорского) антитела в человеческий (акцепторный) каркасный участок, и этот процесс обозначают как CDR-трансплантация или гуманизация антитела.

Выравнивали мышиную аминокислотную последовательность относительно коллекции V-генов человеческой зародышевой линии антитела и сортировали с учетом идентичности и гомологии последовательности. Перед селекцией каждой конкретной акцепторной последовательности следует определять структуры так называемых канонических петель донорского антитела (Morea V. и др., Methods, т. 20, вып.3, 2000, сс. 267-279). Структуры указанных канонических петель определяли по типу остатков, присутствующих в так называемых канонических положениях. Эти положения лежат (частично) вне CDR-участков, и они должны сохранять функциональную эквивалентность в конечной конструкции для сохранения конформации CDR родительского (донорского) антитела. Последовательность человеческой зародышевой линии VBASE_VH1_1 выбирали в качестве акцепторной для тяжелой цепи, а последовательность VBASE_VK2_5 выбирали для легкой цепи.

7.1.2.4. Удаление "горячих точек" деамидирования.

Было установлено, что гуманизованное антитело к человеческому CD19 дикого типа имеет три "горячие точки" деамидирования в HVR-L1: NSNGNT (SEQ ID NO: 190). Кроме того, было установлено, что в HVR-H2 присутствует дополнительная "горячая точка" деамидирования: KFNG (SEQ ID NO: 191). Для удаления "горячей точки" деамидирования в HVR-H2 интродуцировали точечную мутацию N (Asn) на Q (Gln) в положении 64 (нумерация согласно Кэботу). Таким образом, антитело, представленное в настоящем описании, имеет HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность TEKFGQGRVTM (SEQ ID NO: 192).

Для удаления "горячих точек" деамидирования в легкой цепи для получения гуманизованного антитела к человеческому CD19 с улучшенной устойчивостью к деамидированию интродуцировали индивидуальные мутации в положения 27d, 27e, 28 и 29 по Кэботу и двойную мутацию в положения 27e и 28 (нумерация согласно Кэботу). В целом, создавали 9 вариантов (var.1-var.9) гуманизованного антитела дикого типа (var.0) (см. табл. 45).

Таблица 45. Варианты гуманизованного антитела к CD19 дикого типа

Кэбот	2222	Кэбот	6
положение	7789	положение	4
LC:	de	HC:	
var.0:wt	QSLNSNGNTYLNW		TEKFNGKATM
var.1:N27dH	QSL E HSNGNTYLNW		TEKF Q GRVTM
var.2:N27dQ	QSL E Q SNGNTYLNW		TEKF Q GRVTM
var.3:S27eA	QSL E A NGNTYLNW		TEKF Q GRVTM
var.4:S27eV	QSL E V NGNTYLNW		TEKF Q GRVTM
var.5:S27eP	QSL E P NGNTYLNW		TEKF Q GRVTM
var.6:N28Q	QSL E Q NGNTYLNW		TEKF Q GRVTM
var.7:G29A	QSL E N A NTYLNW		TEKF Q GRVTM
var.8:G29V	QSL E N V NTYLNW		TEKF Q GRVTM
var.9:S27eP/N28S	QSL E N P S NTYLNW		TEKF Q GRVTM

Вариант →	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
↓Параметр										
K _D (BIAcore) [нМ]	5	250	136	2	1	6	54	4	16	45
t _{1/2} [мин]	-	0,1	1,1	105,2	191,5	43,6	4,4	51,5	17,6	4
Связывание с человеческим CD19 после инкубации при pH 7,4 [%]	46	0	75	84	85	95	91	72	83	83
Связывание с человеческим CD19 после инкубации при pH 6,0 [%]	90	0	95	95	97	99	97	86	91	87
Основной пик по данным SEC после инкубации [%]	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	-

Было установлено, что для всех "горячих точек" деамидирования в HVR-L1 можно применять единичную мутацию в положении 27е согласно Кэботу, приводящую к замене S (серин) на Р (пролин). Она представляет собой не мутацию предрасположенного к деамидированию остатка N (аспарагин), а мутацию соседнего участка.

Таким образом, антитело, представленное в настоящем описании, имеет HVR-L1, который содержит аминокислотную последовательность LENPNGNT (SEQ ID NO: 193). В одном из вариантов осуществления изобретения гуманизированное антитело к человеческому CD19 содержит HVR-L1, который имеет аминокислотную последовательность LENPSGNT (SEQ ID NO: 194).

Кроме того, эти антитела сохраняют перекрестную реактивность к CD19 обезьян циномолгус, что продемонстрировано ниже в табл. 46.

Таблица 46

EC ₅₀ [мкг/мл]	var.0	Var.5	var.9
huCD19 ECD	0,087	0,084	0,089
cyCD19 ECD	0,313	0,255	0,435

Для гуманизированного антитела к человеческому CD19 дикого типа (var.0) после очистки обнаружен уровень деамидирования, составляющий примерно 7,5%. После хранения в течение 2 недель при pH 7,4 количество деамидированного антитела возрастало примерно до 18,5%. Для варианта антитела с мутацией S27eP (var.5) обнаружен уровень деамидирования, составляющий примерно 2%, и образование 2% сукцинимидов после очистки. При хранении при pH 7,4 в течение 2 недель присутствовало только примерно 7,5% деамидированного антитела. Var. 5 был обозначен как клон 8B8-018 и выбран для создания нацеленных на CD19 содержащих тримерный лиганд семейства TNF антигенсвязывающих молекул.

7.1.3. Получение одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 3.1).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных (G4S)₂-линкерами и слитых с CL-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 29А: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254), и слитый с CH-доменом человеческого IgG1, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 29Б: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH.

Полинуклеотид, кодирующий димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL-доменом, субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998). Для улучшения правильного спаривания интродуцировали указанные ниже мутации в "скрещенные" CH-CL. В димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL, мутации E123R и Q124K. В мономерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CH1, мутации K147E и K213E.

Последовательности ДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CD19, клон 8B8-018, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами (согласно методу, описанному в WO 2012/130831).

Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-CD19-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-CD19, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и CD19-связывающий Fab (фиг. 30, конструкция 3.1).

В табл. 47 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной

на CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL и заряженными остатками (конструкция 3.1).

Таблица 47. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на D19(8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL и заряженными остатками (конструкция 3.1)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
129	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 3
130	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	см. таблицу 3
203	нуклеотидная последовательность анти-CD19(8B8-018), Fc-цепь с «впадиной»	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAA CCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGAT ACACCTTCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGCAGGC CCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCA TATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAA GAGTCACTATGACATCTGACACCAAGTATCAGCACTGCTTA CATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGACACCGCAGTG TATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTC TGTTGCACTATTGGGGGCAGGGAACCAAGTAACCGTGA GCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACC GTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCT GAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCCAAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC

		AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTG CGCAGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACATAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
204	нуклеотидная последовательность анти- CD19 (8B8-018), легкая цепь	GACATCGTCATGACCCAGACACCCCTGTCCCTCTCTGTGA CCCCGGCCAGCCAGCCTCAATTAGCTGCAAGTCTCTCA AAGTCTGGAGAACCCCAATGGGAACACTTACCTTAATTGG TATCTGCAGAAACCCGGACAATCCCCCTCAACTCCTGATCT ACAGGGTCTCTAAGAGATTCTCAGGCGTGCCAGATCGCTT TAGCGGTTCCGGGTCTGGCACAGACTTCACCTTGAAGATT AGTCGGGTGAAGCTGAGGATGTGGGAGTCTATTACTGTC TGCAGTCACTCATGTGCCCTACACCTTTGGTCAGGGCAC AAAACTGGAGATCAAGCGGACCGTGCCCGTCCCTCCGTG TTCACTTCCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCA CCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCG CGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCA GTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCC AAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGT CCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCG AAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTC CTTCAACCGGGCGAGTGC
115	димерный hu 4-1BBL (71- 254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 3
116	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	см. таблицу 3
205	анти-CD19 (8B8-018), Fc- цепь с «впадиной»	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSLRLSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
206	анти-CD19 (8B8-018), легкая цепь	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNNGNTYLNWYL QKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

* обозначает заряженные остатки.

7.1.4. Получение одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 3.2).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных (G4S)₂-линкерами и слитых с CL-доменом человеческого IgG1, клонировали аналогично схеме, представленной на фиг. 29А, но без аминокислотных мутаций в CL-доме: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержа-

ший один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254), и слитый с CH1-доменом человеческого IgG1, клонировали аналогично схеме, представленной на фиг. 29Б, но без аминокислотных мутаций в CH1-доме: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH1.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CD19, клон 8B8-018, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами (согласно методу, описанному в WO 2012/130831). Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-CD19-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-CD19 позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и CD19-связывающий Fab (фиг. 30, конструкция 3.2).

В табл. 48 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL без заряженных остатков (конструкция 3.2).

Таблица 48. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL без заряженных остатков (конструкция 3.2)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
165	нуклеотидная последовательность конструкции димерный лиганд (71-254)– CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 22
166	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1	См. таблицу 22
203	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8-018), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 47
204	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-018)	См. таблицу 47
117	димерный лиганд (71-254) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 22
118	мономерный лиганд (71-254) –CH1	См. таблицу 22
205	анти-CD19 (8B8-018), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 47
206	легкая цепь анти-CD19 (8B8-018)	См. таблицу 47

7.1.5. Получение двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 3.3).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных (G4S)₂-линкерами, сливали с С-концом Fc-цепи с "впадиной" человеческого IgG1, согласно схеме, представленной на фиг. 29В: Fc-цепь с "впадиной" человеческого IgG1, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254), и слитый с С-концом Fc-цепи с "выступом" человеческого IgG1, получали согласно схеме, представленной на фиг. 29Г: Fc-цепь с "выступом" человеческого IgG1, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CD19, клон 8B8-018, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", "выступом", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами (согласно методу, описанному в WO 2012/130831). Комбинация: анти-CD19 huIgG1, содержащая димерный лиганд цепь с "впадиной" с мутациями Y349C/T366S/L368A/Y407V, анти-CD19 huIgG1, содержащая мономерный лиганд цепь с "выступом" с мутациями S354C/T366W, и легкая цепь анти-CD19, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и два FAP-связывающих Fab (фиг. 30, конструкция 3.3).

В табл. 49 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 3.3).

Таблица 49. Последовательности пар оснований двухвалентной нацеленной CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с включающей Fc (kih) PGLALA (конструкция 3.3)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
207	нуклеотидная последовательность конструкции анти-CD19 (8B8-018)-Fc-цепь с «впадиной»-димерный лиганд	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAA CCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGAT ACACCTTCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAAGCAGGC CCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCA TATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAAGTTTCAGGGAA GAGTCACTATGACATCTGACACCAGTATCAGCACTGCTTA CATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGACACCGCAGTG TATTAATGTGCCAGGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTC TGTTGCACTATTGGGGGCAGGGAACACAGTAACCGTGA GCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGAGCACACGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACC GTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGGTGCACA CCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCT GAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC AAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC

		GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTG CGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTG GAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGC CCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACC TGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCACAGACGT GCTGCTGATCGATGGCCCCCTGCTCTGGTACAGCGATCCT GGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCG TGTAACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGT GGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTTGGCCCTGCAT CTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCCG GAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTG TCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAG GCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCT ACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAG CCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGAT CTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAAGTGTCCC CTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAA TGTTCCGCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGA CGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGG GTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCTACAAAGAAGATACAA AAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTT TTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGG CTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTG CGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGG ACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTT CGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAG CGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGC ATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACT GTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCAAGC CCTAGATCAGAA
208	нуклеотидная последовательность анти- CD19 (8B8-018)-Fc-цепь с «выступом»-мономерный лиганд	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAA CCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGAT ACACCTTCACCGACTATATCATGCATTGGGTGAGGCAGGC CCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCA TATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAA GAGTCACTATGACATCTGACACCAGTATCAGCACTGCTTA CATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGACACCCGAGTG TATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTC TGTTCCGACTATTGGGGGCAGGGAACACAGTAACCGTGA GCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC

		ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC CTCCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAG GGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGAGCCCTG CAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGT CTGGTCAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCA CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTGA CTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTTCAAGTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC AACCCTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCG GAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGC CCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACC TGCGGCAGGGCATGTTTGTCTAGCTGGTGGCCAGAACGT GCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCT GGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCG TGTAACAGTGTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTGGT GGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCAT CTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCG GAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTG TCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAG GCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCT ACAGTGCTGGGCCTGTTTCAAGTGAACCCCGAGATTCCAG CCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
204	нуклеотидная последовательность анти- CD19 (8B8-018), легкая цепь	см. таблицу 47
209	анти-CD19 (8B8-018)-Fc- цепь с «впадиной»- димерный лиганд	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG

		GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVVF FQLELRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGSGGSGREGP ELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVVFQLELRVAVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGL FRVTPEIPAGLPSRSE
210	анти-CD19 (8B8-018)-Fc- цепь с «выступом»- мономерный лиганд	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNV NKKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVVF FQLELRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
206	анти-CD19(8B8-018), легкая цепь	см. таблицу 47

7.1.6. Получение одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 3.4).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-248), разделенных (G4S)₂-линкерами и слитых с CL-доменом человеческого IgG1, клонировали аналогично схеме, представленной на фиг. 29А: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-248), и слитый с CH-доменом человеческого IgG1, клонировали аналогично схеме, представленной на фиг. 29Б: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH.

Полипептид, кодирующий димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL-доменом, субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998). Для улучшения правильного спаривания интродуцировали указанные ниже мутации в "скрещенные" CH-CL. В димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL, мутации E123R и Q124K. В мономерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CH1, мутации K147E и K213E.

Последовательности ДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CD19, клон 8B8-018, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами (согласно методу, описанному в WO 2012/130831). Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-CD19-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-CD19, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и CD19-связывающий Fab (фиг. 30, конструкция 3.4).

В табл. 50 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL и заряженными остатками (конструкция 3.4).

Таблица 50. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL и заряженными остатками (конструкция 3.4)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
169	нуклеотидная последовательность конструкции димерный лиганд (71-248) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 24

170	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BB (71-248) – CH1*	См. таблицу 24
203	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8-018), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 47
204	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-018)	См. таблицу 47
119	димерный лиганд (71-248) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 24
120	мономерный лиганд (71-248)-CH1*	См. таблицу 24
205	анти-CD19 (8B8-018), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 47
206	легкая цепь анти-CD19 (8B8-018)	См. таблицу 47

* обозначает заряженные остатки.

7.1.7. Получение одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 3.5).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-248), разделенных (G4S)₂-линкерами и слитых с CL-доменом человеческого IgG1, клонировали аналогично схеме, представленной на фиг. 29А, но без аминокислотных мутаций в CL-доме: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-248), и слитый с CH1-доменом человеческого IgG1, клонировали аналогично схеме, представленной на фиг. 29Б, но без аминокислотных мутаций в CH1-доме: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH1.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CD19, клон 8B8-018, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами (согласно методу, описанному в WO 2012/130831). Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-CD19-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-CD19, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и CD19-связывающий Fab (фиг. 30, конструкция 3.5).

В табл. 51 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL без заряженных остатков (конструкция 3.5).

Таблица 51. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL без заряженных остатков (конструкция 3.5)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
171	нуклеотидная последовательность конструкции димерный лиганд (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 25
172	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный лиганд (71-248)-CH1	См. таблицу 25
203	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8-018), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 47
204	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-018)	См. таблицу 47
173	димерный лиганд (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 25
174	мономерный лиганд (71-248)-CH1	См. таблицу 25
205	анти-CD19 (8B8-018), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 47
206	легкая цепь анти-CD19 (8B8-018)	См. таблицу 47

7.1.8. Получение двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 3.6).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-248), разделенных (G4S)₂-линкерами, сливали с С-концом Fc-цепи с "впадиной" человеческого IgG1, согласно схеме, представленной на фиг. 29В: Fc-цепь с "впадиной" человеческого IgG1, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-248), и слитый с С-концом Fc-цепи с "выступом" человеческого IgG1, получали согласно схеме, представленной на фиг. 29Г: Fc-цепь с "выступом" человеческого IgG1, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CD19, клон 8B8-018, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами (согласно методу, описанному в WO

2012/130831). Комбинация: анти-CD19 huIgG1, содержащая димерный лиганд цепь с "впадиной" с мутациями Y349C/T366S/L368A/Y407V, анти-CD19 huIgG1, содержащая мономерный лиганд цепь с "выступом" с мутациями S354C/T366W и легкая цепь анти-CD19, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и два FAP-связывающих Fab (фиг. 30, конструкция 3.6).

В табл. 52 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 3.6).

Таблица 52. кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-018) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB(71-248) в слиянии с Fc (kih) (конструкция 3.6)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
211	нуклеотидная последовательность конструкции анти-CD19 (8B8-018)-Fc-цепь с «впадиной»-димерный лиганд (71-248)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAA CCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGAT ACACCTTCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGCAGGC CCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCA TATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAA GAGTCACTATGACATCTGACACCAAGTATCAGCACTGCTTA CATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGACACCGCAGTG TATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTC TGTTCCGACTATTGGGGGCAGGGAACCAAGTAACCGTGA GCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCCGTGACC GTGTCCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCT GAGCAGCGTGGTCACCGTGCTTCTAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC AAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC

		GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCAT CCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAAGCCTCTCGTG CGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGAACAACATAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTG GAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGC CCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGACTGCTGGACC TGCGGCAGGGAATGTTTGCCAGCTGGTGGCCAGAACGT GCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCT GGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCG TGTAACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGGCGAGAGTGGT GGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCAT CTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCG GAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTG TCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAG GCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCT ACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGAGTGACCCCGAGATTCCAG CAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTA GAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCGACGATCCCGCTGGGCT GCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCTGCTCAGCTGGTGGCT CAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACT CCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGAC TGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTA AAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGA GCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTG GCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTG CAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTC CGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCAGAGGACGCCT GCTGCATCTGAGCGCCGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTG CATACTGAAGCCAGAGCCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTC AGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGA GATCCCAGCCGGGCTC
212	нуклеотидная последовательность конструкции анти-CD19 (8B8-018)-Fc-цепь с «выступом»-мономерный (71-248) лиганд	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAA CCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGAT ACACCTTCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAAGCAGGC CCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCA TATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAA GAGTCACTATGACATCTGACACCAGTATCAGCACTGCTTA CATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGACACCGCAGTG TATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTC TGTTCTGACTATTGGGGGCAGGGAACCACAGTAACCGTGA GCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC ACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG

		GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC CTTCCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAG GGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTG CAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGT CTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCA CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTCTGTA CTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTTCAAGTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC AACCCTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCG GAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGC CCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACC TGCGGCAGGGAATGTTTGCCAGCTGGTGGCCCAGAAGCT GCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCT GGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCG TGTAACCTGCTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGT GGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTTGGCCCTGCAT CTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCCG GAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTG TCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGATCTGCACACAGAG GCCAGGGCTAGACACGCTGGCAGCTGACACAGGGCGCT ACAGTGTGGGCTGTTTCAAGAGTGACCCCCGAGATTCTCTG CCGGGCTC
204	нуклеотидная последовательность анти- CD19 (8B8-018), легкая цепь	см. таблицу 47
213	анти-CD19 (8B8-018)-Fc- цепь с «впадиной»- димерный лиганд (71-248)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLID

		GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAAGVYVVFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTEI PAGL
214	анти-CD19 (8B8-018)-Fc- цепь с «выступом»- мономерный (71-248) лиганд	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTIVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTEIPAGL
206	анти-CD19 (8B8-018), легкая цепь	см. таблицу 47

7.2. Получение нацеленных на CD19 (антитело, полученное из клона 8B8 с созревшей аффинностью) содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул и соответствующих контрольных молекул.

7.2.1. Создание полученных из 8B8 с созревшей аффинностью анти-CD19-связывающих агентов, лишенных "горячих точек".

7.2.1.1. Селекция CD19-специфических антител с созревшей аффинностью.

Деамидирование остатков аспарагина в положениях 27d и 28, локализованных в CDR1 легкой цепи гуманизированного клона 8B8, приводит к значительному снижению биологической активности. Поэтому создавали 2 фаговые дисплейные библиотеки, в которых: а) оба остатка аспарагина в положениях 27d и 28 элиминировали и б) дополнительно рандомизировали CDR тяжелой и легкой цепей для отбора вариантов 8B8 с повышенной аффинностью.

7.2.1.2. Создание библиотек 8B8 с созревшей аффинностью, лишенных "горячих точек" в LCDR1.

Создание полученных из 8B8 антител с созревшей аффинностью без сайтов деамидирования N27d и N28, локализованных в LCDR1, осуществляли с помощью фагового дисплея с применением стандартного протокола (Silacci и др., 2005). На первой стадии ДНК-последовательности VL и VH гуманизированного родительского клона 8B8 (SEQ ID NO: 215 и SEQ ID NO: 216) клонировали в фагмиде заявителей, которую затем применяли в качестве матрицы для рандомизации. На следующей стадии создавали две библиотеки для отбора предпочтительных клонов с помощью фагового дисплея. Для элиминации вышеуказанных положений "горячих точек" в обеих библиотеках применяли рандомизированный праймер LCDR1 (SEQ ID NO: 217), который обеспечивал присутствие только аминокислот S T Q E в положениях 27d и 28. Библиотеку для созревания 1 рандомизировали в CDR1 и CDR2 и легкой, и тяжелой цепей, в то время как библиотеку для созревания 2 рандомизировали в CDR1 и CDR3 легкой цепи и в CDR3 тяжелой цепи. Рандомизированные положения в соответствующих CDR-участках представлены на фиг. 31A. Для создания библиотеки для созревания 1, рандомизированной в CDR1 и CDR2 и легкой, и тяжелой цепей, объединяли три фрагмента с помощью ПЦР для "сращивания (генома) перекрывающимися расширениями" (SOE) и клонировали в фаговом векторе (фиг. 31Б). Применяли следующие комбинации праймеров для создания фрагментов библиотек: фрагмент 1: LMB3 (SEQ ID NO: 222) и CD19 L1 обратный случайный (рассеянный) праймер (SEQ ID NO: 217), фрагмент 2: CD19 L2 прямой случайный праймер (SEQ ID NO: 218) и CD19 H1 обратный случайный праймер (SEQ ID NO: 219) и фрагмент 3 (CD19 H2 прямой случайный праймер (SEQ ID NO: 220) и CD19 H3 обратный константный праймер (SEQ ID NO: 221) (табл. 53). После сборки полноразмерного рандомизированного фрагмента в достаточных количествах его расщепляли NcoI/NheI параллельно с идентично обработанным акцепторным фагмидным вектором. 3-кратный молярный избыток библиотеки-вставки лигировали с 10 мкг фагмидного вектора. Очищенные полученные в результате лигирования продукты применяли для 20 трансформаций, что приводило к получению 2×10^9 трансформантов. Фагмидные частицы, экспонирующие библиотеку 8B8 с созревшей аффинностью, выделяли ("спасали") и очищали путем ПЭГ/NaCl-очистки с целью применения для селекций.

Аналогичным образом создавали вторую библиотеку, рандомизированную в CDR1 и CDR3 легкой цепи и в CDR3 тяжелой цепи. Применяли следующие комбинации праймеров для создания фрагментов библиотек: фрагмент 1: LMB3 (SEQ ID NO: 222) и CD19 L1 обратный случайный праймер (SEQ ID NO: 217), фрагмент 2: CD19 L1 прямой константный праймер (SEQ ID NO: 223) и CD19 L3 обратный случайный праймер (SEQ ID NO: 224) и фрагмент 3: CD19 L3 обратный константный праймер (SEQ ID NO: 225) и CD19 H3 обратный случайный праймер (SEQ ID NO: 226) (табл. 54). После сборки полноразмерного рандомизированного фрагмента в достаточных количествах его расщепляли NcoI/KpnI параллельно с идентично обработанным акцепторным фагмидным вектором. 3-кратный молярный избыток библиотеки-вставки лигировали с 20 мкг фагмидного вектора. Очищенные полученные в результате лигирования продукты применяли для 40 трансформаций, что приводило к получению 2×10^9 трансформантов. Фагмидные частицы, экспонирующие библиотеку 8B8 с созревшей аффинностью выделяли ("спасали") и очищали путем ПЭГ/NaCl-очистки с целью применения для селекций.

Таблица 53. Праймеры библиотеки для созревания аффинности 8B8 и удаления "горячих точек" L1_L2/H1_H2

SEQ ID	Обозначение	Последовательность
217	CD19 L1 обратный случайный праймер	CAG CTG CGG GCT CTG ACC CGG TTT CTG GAG ATA CCA GTT CAG 1 CGT 2 GCC 3 GGA 4 TTC CAG AGA TTG GCT GGA TTT GCA AGA AAT G 1: 40% Y, 6% A/S/T/G/P/D/N/E/Q/V, 2: 40% N, 6% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 3: 25% S/T/Q/E, 4: 25% S/T/Q/E
218	CD19 L2 прямой случайный праймер	CTC CAG AAA CCG GGT CAG AGC CCG CAG CTG CTG ATC TAC 5 GTA TCT 6 CGC 7 8 GGC GTT 9 GAT CGT TTC AGC GGT TCT GGA TCC GGC ACC 5: 30% R, 20% E, 5% A/S/T/Y/G/P/D/N/Q/V, 6: 30% K, 20% S, 5% A/N/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 7: 40% F, 5% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V/I/L, 8: 40% S, 6.6% A/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 9: 50% P, 50% L
219	CD19 H1 обратный случайный праймер	CAT CCA CTC CAG ACC CTG GCC CGG GGC CTG ACG AAC CCA 10 CAT 11 12 13 14 GAA 15 GTA ACC AGA TGC TTT GCA GCT CAC TTT AAC GGA AGC 10: 52% H, 4% G/A/S/P/T/N/Y/D/E/Q/V/I, 11: 30% I, 15% Y, 5% G/A/S/T/P/N/H/D/E/Q/V, 12: 52% Y, 4% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 13: 30% D, 15% G, 5% A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 14: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 15: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I
220	CD19 H2 прямой случайный праймер	CAG GCC CCG GGC CAG GGT CTG GAG TGG ATG GGC 16 ATT 17 CCA 18 19 20 21 TCC 22 TAT ACC 23 AAA TTC CAG GGC CGC GTC ACG ATG ACC 16: 45% Y, 5% A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 17: 52% N, 4% G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 18: 40% Y, 5% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 19: 30% N, 15% S, 5% G/A/T/P/Y/H/D/E/Q/V/I, 20: 30% D, 15% G, 5% A/S/T/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 21: 52% G, 4% N/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 22: 30% K, 15% N, 4% G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 23: 30% E, 15% Q, 5% G/A/S/T/P/Y/N/H/D/V/I
221	CD19 H3 обратный константный праймер	CGTCACCGGTTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAG
222	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC

Таблица 54. Праймеры библиотеки для созревания аффинности 8B8 и удаления "горячих точек" L1_L3/H3

SEQ ID	Обозначение	Последовательность
223	CD19 L1 прямой константный праймер	TGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAG
217	CD19 L1 обратный случайный праймер	См. таблицу 53
224	CD19 L3 обратный случайный праймер	TTT AAT TTC CAG TTT AGT TCC TTG ACC GAA GGT 24 25 26 27 28 29 CTG CAG ACA ATA GTA GAC GCC AAC GTC TTC AGC 24: 52% Y, 4% G/A/S/T/N/P/D/E/Q/V/L/I, 25: 52% P, 4% G/A/S/T/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 26: 42% V, 10% L, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I, 27: 52% H, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I, 28: 42% T, 10% I, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/L, 29: 45% L, 11% G, 4% A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I
225	CD19 L3 прямой константный праймер	ACCTTCGGTCAAGGAACTAACTGGAAATTAAACG
226	CD19 H3 обратный случайный праймер	TT GGT GCT AGC AGA GCT TAC GGT CAC CGT GGT ACC TTG GCC CCA GTA ATC AAA 30 31 32 33 34 35 36 37 38 GCG TGC ACA ATA GTA AAC AGC GGT GTC 30: 50% L, 3.8% G/A/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 31: 50% A, 4,2% G/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 32: 50% S, 4,2% G/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 33: 50% G, 4,2% S/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 34: 50% Y, 4,2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 35: 50% Y, 4,2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 36: 50% Y, 4,2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 37: 50% T, 4,2% G/A/Y/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 38: 50% G, 4,2% Y/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I
222	LMB3	См. таблицу 53

7.2.1.3. Селекция полученных из 8B8 клонов с созревшей аффинностью, лишенных "горячих точек" N27d и N28 в LCDR1.

Для селекции клонов с созревшей аффинностью, лишенных "горячих точек" N27d и N28 в LCDR1, осуществляли два подхода селекции с помощью фагового дисплея.

При использовании первого подхода селекцию осуществляли на слитом белке человеческий CD19-Fc с использованием обеих фаговых дисплейных библиотек. Раунды пэннинга осуществляли в растворе согласно следующей схеме: 1) связывание $\sim 10^{12}$ фагмидных частиц с 30 нМ биотинилированным белком CD19-Fc в течение 0,5 ч в общем объеме 1 мл, 2) "захват" биотинилированного белка CD19-Fc и специфически связанных фаговых частиц путем добавления $5,4 \times 10^7$ покрытых стрептвидином магнитных гранул в течение 10 мин, 3) промывка гранул с использованием 5 раз 1 мл 3ФР/Твин20 и 5 раз 1 мл 3ФР, 4) элюция фаговых частиц путем добавления 1 мл 100 мМ ТЭА в течение 10 мин и нейтрализация путем добавления 500 мкл 1М Трис/HCl, pH 7,4, 5) повторное заражение находящихся на экспоненциальной фазе роста бактерий E.coli TG1 и 6) заражение хелперного фага VCSM13 и последующее осаждение с помощью ПЭГ/NaCl фагмидных частиц, предназначенных для применения в следующих раундах селекции. Селекции осуществляли с использованием 3 раундов, применяя понижающиеся концентрации антигена (30×10^{-9} М, 10×10^{-9} М и 3×10^{-9} М). В раунде 2 и 3 "захват" комплексов антиген:фаг осуществляли, используя покрытые нейтравидином планшеты вместо стрептвидиновых гранул. Нейтравидиновые планшеты промывали 5 раз 3ФР/Твин20 и 5 раз 3ФР. В раунде 3 нейтравидиновый планшет инкубировали в течение ночи в 2 л 3ФР для селекции по скорости диссоциации ("off-rate"-селекция) перед элюцией фага из планшета. Кроме того, белок, содержащий CD19 обезьян циномогус-Fc, применяли в раунде 2 для обогащения перекрестно-реактивными связывающими агентами.

При использовании второго подхода селекции фаговый пэннинг осуществляли на клетках, временно экспрессирующих на клеточной поверхности ECD CD19 либо человека, либо обезьян циномогус. Для кратковременной трансфекции НЕК-клеток создавали экспрессионные плазмиды, которые несли ДНК-последовательности (в направлении от 5' к 3') следующих белковых сегментов Flag-метка, SNAP-метка, ECD CD19 либо человека, либо обезьян циномогус и трансмембранная область рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) (SEQ ID NO: 227 и 228). Экспрессию соответствующих белков (SEQ ID NO: 229 и 230) на клеточной поверхности подтверждали проточной цитометрией, используя для детекции антитело к Flag. В первом раунде селекции обе библиотеки экспонировали на клетках, экспрес-

сирующих слитый белок, содержащий ECD CD19 либо человека, либо обезьян циномолгус. Для последующих раундов пэннинга виды ECD CD19 соответственно изменяли. Клетки, кратковременно трансфектированные нерелевантным мембранным белком, применяли для предпроверки (преклиринга).

Раунды пэннинга осуществляли согласно следующей схеме:

- 1) трансфекция НЕК-клеток конструкциями, экспрессирующими либо ECD CD19, либо нерелевантный трансмембранный белок, согласно описанной выше стандартной процедуре;
- 2) инкубация клеток в целом в течение 48 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Выделение клеток путем центрифугирования (3 мин при 250 × g) и ресуспендирование 1×10⁷ ECD CD19-позитивных клеток и 1×10⁷ негативных клеток в 3ФР/5% БСА соответственно;
- 3) преклиринг неспецифического фага путем инкубации фаговой библиотеки с 1×10⁷ CD19-негативных клеток в течение 60 мин при 4°C с использованием осторожного вращения на ротаторе для пробирок;
- 4) центрифугирование клеток при 250 × g в течение 3 мин и перенос супернатанта в свежую пробирку и добавление 1×10⁷ CD19-позитивных клеток и инкубация в течение 60 мин при 4°C с использованием осторожного вращения на ротаторе для пробирок;
- 5) промывка клеток путем центрифугирования в течение 1 мин при 250×g, аспирация супернатанта и ресуспендирование в 1 мл 3ФР (8 раз);
- 6) элюция фага с помощью 1 мл 100 мМ ТЭА, инкубация в течение 5 мин при КТ и нейтрализация элюата 500 мкл 1М Трис-HCl, pH 7,6;
- 7) повторное заражение бактерий E.coli TG1 на экспоненциальной фазе роста; и
- 8) заражение хелперным фагом VCSM13 и последующее осаждение ПЭГ/NaCl фагмидных частиц, предназначенных для использования в последующих раундах селекции. Селекции проводили с использованием более 3 раундов.

Для обоих подходов селекции специфические связывающие агенты идентифицировали с помощью ELISA следующим образом: 100 мкл 30 нМ биотинилированного белка CD19-Fc на лунку применяли для сенсibilизации нейтравидиновых планшетов. Добавляли содержащие Fab бактериальные супернатанты и связывание Fab выявляли посредством их Flag-меток, используя вторичное антитело к Flag/HRP.

Клоны, которые выявлены как ELISA-позитивные на рекомбинантном человеческом CD19, дополнительно тестировали с помощью ELISA, основанного на анализе клеток, в котором применяли клетки, кратковременно трансфектированные содержащими ECD человеческого CD19 экспрессионными плазмидами (SEQ ID NO: 227). Указанный анализ осуществляли следующим образом: через 48 ч после трансфекции НЕК-клетки собирали и центрифугировали при 250 × g в течение 5 мин. Затем клетки ресуспендировали в охлажденном на льду 3ФР, дополненном 2% БСА, до получения 4×10⁶ клеток/мл и инкубировали в течение 20 мин на льду для блокады неспецифических сайтов связывания. По 4 × 10⁵ клеток в 100 мкл вносили в каждую лунку 96-луночного планшета и центрифугировали при 250 × g и 4°C в течение 3 мин. Супернатант аспирировали и 50 мкл бактериального супернатанта, содержащего растворимые Fab-фрагменты, разводили 50 мкл охлажденного на льду 3ФР/2% БСА, добавляли в планшет, смешивали с клетками и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Затем клетки промывали 3 раза охлажденным на льду 3ФР перед добавлением из расчета 100 мкл на лунку 3ФР/2% БСА, содержащего в разведении 1:2000 антитело к Fab-HRP. После инкубации в течение 1 ч клетки вновь промывали 3 раза охлажденным на льду 3ФР. Для проявления добавляли 100 мкл субстрата "1-step ultra TMB-ELISA" на лунку. После инкубации в течение 10 мин супернатант переносили в новый 96-луночный планшет, содержащий 40 мкл 1М H₂SO₄ на лунку, и абсорбцию измеряли при 450 нМ. Клоны, для которых характерны сигналы, выраженно превышающие фоновый уровень, подвергали скринингу в отношении кинетических характеристик с помощью SPR-анализа на устройстве ProteOn XPR36.

7.2.1.4. Идентификация вариантов 8B8 с созревшей аффинностью с помощью SPR.

Для характеристики ELISA-позитивных клонов скорость диссоциации измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса и сравнивали с родительским гуманизированным клоном 8B8.

При осуществлении этого эксперимента 7000 RU поликлонального антитела к человеческому Fab иммобилизовали на всех 6 каналах GLM-чипа с помощью амминного сочетания (Na-ацетат, pH 4,5, 25 мкл/мин, 240 с) (вертикальная ориентация). Каждый содержащий антитело бактериальный супернатант фильтровали и 2-кратно разводили 3ФР, а затем инъецировали в течение 360 с со скоростью 25 мкл/мин до достижения уровней иммобилизации, соответствующих 100-400 единиц ответа (RU), в вертикальной ориентации. Инъекция конструкции мономерный CD19-Fc: для измерения кинетических характеристик за один прогон ("one-shot"-кинетика) направление инъекции изменяли на горизонтальную ориентацию, инъецировали одновременно трехкратные серийные разведения очищенной конструкции мономерный CD19-Fc (концентрации, варьирующие в диапазоне от 150 до 6 нМ) со скоростью 50 мкл/мин параллельно в различные каналы 1-4, продолжительность ассоциации составляла 180 с, а продолжительность диссоциации 300 с. Fc-фрагмент человеческого IgG (150 нМ) инъецировали в канал 5 в качестве отрицательного контроля специфического связывания с конструкцией мономерный CD19-Fc. В шестой канал инъецировали буфер (3ФРТ), создавая "параллельный" ("in-line") "пустой" контроль для сопоставления. Реге-

нерацию осуществляли с помощью двух импульсных обработок 10 мМ глицином, pH 1,5 и 50 мМ NaOH в течение 30 с со скоростью 90 мкл/мин (горизонтальная ориентация). Константы скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывали с использованием простой модели связывания 1:1 Ленгмюра с помощью программы ProteOn Manager v3.1 путем одновременной аппроксимации сенсограмм. Идентифицировали клоны, экспрессирующие Fab с наиболее низкими константами скорости диссоциации (табл. 55). Следует отметить, что константы скорости диссоциации клонов 5A07 и 5B08 не удалось определить из-за несоответствующей аппроксимации. Несмотря на это оба клоны были отобраны, поскольку полученные результаты позволяют предположить очень низкую диссоциацию. Вариабельные домены соответствующих фагмид секвенировали. Важно отметить, что оба остатка аспарагина в LCDR1 (положения 27d и 28) заменяли на серин или треонин, демонстрируя удаление обоих сайтов деамидирования. Сравнительный анализ первичной структуры представлен на фиг. 32. CDR наиболее перспективных клонов представлены в табл. 56 (вариабельные области легкой цепи) и табл. 57 (вариабельные области тяжелой цепи) (клон 5H09: (SEQ ID NO: 231-236); клон 7H07: (SEQ ID NO: 237-242); клон 2B03: (SEQ ID NO: 243-248); клон 2B11: (SEQ ID NO: 249-254); клон 5A07: (SEQ ID NO: 255-260); клон 5B08: (SEQ ID NO: 261-266); клон 5D08: (SEQ ID NO: 267-272)).

Таблица 55. Константы диссоциации отобранных клонов, полученных в результате скринингового анализа с использованием бактериального супернатанта

Клон	Константа диссоциации k_d (1/с)
Родительский 8B8	3,01E-4
5H09	2,58E-4
7H07	5,75E-5
2B03	3,24E-5
2B11	4,37E-6
5A07	n.d.
5B08	n.d.
5D08	1,95E-4

Таблица 56. Последовательности CDR отобранных легких цепей 8B8

Клон	SEQ ID NO	CDR-L1	SEQ ID NO	CDR-L2	SEQ ID NO	CDR-L3
5H09	231	KSSQSLESSTGNTYLN	232	RVSKRFS	233	LQLIDYPVT
7H07	237	KSSQSLETSTGNTYLN	238	RVSKRFS	239	LQATHIPYT
2B03	243	KSSQSLETSTGNTYLN	244	RVSKRFS	245	LQLTHVPYT
2B11	249	KSSQSLETSTGNTYLN	250	RVSKRFS	251	LQLLEDPYT
5A07	255	KSSQSLETSTGNTYLN	256	RVSKRFS	257	LQPGHYPGT
5B08	261	KSSQSLETSTGNTYLN	262	RVSKRFS	263	LQLDSYPNT
5D08	267	KSSQSLETSTGNTYLN	268	RVSKRFS	269	LQLTHEPYT

Таблица 57. Последовательности CDR отобранных тяжелых цепей 8B8

Клон	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
5H09	234	DYIMH	235	YINPYNDGSKYTEKFQG	236	GTYYYGSALFDY
7H07	240	DYIMH	241	YINPYNDGSKYTEKFQG	242	GTYYYGSELF DY
2B03	246	DYITH	247	YINPYNDGSKYTEKFQG	248	GTYYYGPD LFDY
2B11	252	DYIMH	253	YINPYNDGSKYTEKFQG	254	GTYYYGPQLFDY
5A07	258	DYIMH	259	YINPYNDGSKYTEKFQG	260	GTYYYGSALFDY
5B08	264	DYIMH	265	YINPYNDGSKYTEKFQG	266	GTYYYGPQLFDY
5D08	270	DYIMH	271	YINPYNDGSKYTEKFQG	272	GTYYYGSELF DY

7.2.2. Характеризация полученных из 8B8 антител с созревшей аффинностью.

7.2.2.1. Клонирование вариабельных доменов антител в экспрессионных векторах.

Последовательности ДНК вариабельных областей тяжелых и легких цепей отобранных анти-CD19-

связывающих агентов субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью, либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. В тяжелую цепь интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами согласно методу, описанному в публикации Международной заявки на патент WO 2012/130831 A1.

кДНК и аминокислотные последовательности анти-CD19 IgG представлены в табл. 58 и 59 соответственно. Все кодирующие антитело последовательности клонировали в экспрессионном векторе, в котором транскрипция вставки находилась под контролем химерного промотора MPSV и который содержал синтетическую сигнальную полиА-последовательность, локализованную на 3'-конце CDS. Кроме того, вектор содержал последовательность OriP EBV для поддержки эписомальной формы плазмиды.

Таблица 58. кДНК и аминокислотные последовательности клона анти-CD19 8B8 в формате P329GLALA человеческого IgG1

SEQ ID NO:	Клон и цепь	Последовательность
273	легкая цепь родительского 8B8	GATGCTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAG ATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAA TGGAACACCTATTTGAACTGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCA CAACTCCTGATCTACAGGGTTTCCAAACGATTTTCTGGGGTCCCTAGACA GGTTTCAGTGGTAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAGAAATCAGCA GAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTTCTGCCTACAACCTACACA TGTCCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTAC GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAGGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT
274	тяжелая цепь родительского 8B8	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTT CAGTGAAGATGGCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTATAT TATGCACTGGGTGAAGCAGAAGACTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGG ATATATTAATCCTTACAATGATGGTTCTAAGTACACTGAGAAGTTCAAC GGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCTTCCATCACAGCCTACATGG AGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAG AGGGACCTATTATTATGGTAGCGCCCTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGC ACCACTCTCACAGTCTCCTCGGCTAGCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCC CCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTG CCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTACCGTCTGCAACAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGG TGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
		GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
275	легкая цепь родительского 8B8	DAVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLSNSNGNTYLNWY LQKPGQSPQL LIYRVSKRFSGLVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLQLTHVPYTF GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
276	тяжелая цепь родительского 8B8	EVQLQQSGPELVKPGASVKMACKASGYTFTDYIMHWVKQKTGQGLEWIG YINPYNDGSKYTEKFNKATLTSDKSSITAYMELSSLTSEDSAVYYCARGT YYYGSALFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVQDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Таблица 59. кДНК и аминокислотные последовательности клонов анти-CD19 с созревшей аффинностью в формате P329GLALA человеческого IgG1

SEQ ID NO:	Клон и цепь	Последовательность
277	2B11, легкая цепь	GATATTGTCATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGTC AGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTCCAC CGGCACCACGTACCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCC GCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATC GTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCAGCTTTACTCTGAAAATCAGCCG TGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCTGCTGGAA GATCCATACACCTTCGGTCAAGGAACGAAACTGGAATTTAAACGTACG GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
278	2B11, тяжелая цепь	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAACCGGGCGCTT CCGTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATAT CATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGG CTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAG GGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGG AACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACG CGGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGT ACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAC TCAGGCGCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC ACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTTTCCTCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT

		CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCA TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGGCTGCTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAC
279	2B11, легкая цепь	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWYLQKPGQSPQLLI YRVSKRFSGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCLQLLEDPTYFG QGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
280	2B11, тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWM GYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAR GTYYYGPQLFDYWQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
281	7H07, легкая цепь	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGTC AGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTCCAC CGGCAACACGTACCTGAACCTGGTATCTCCAGAAACCGGCTCAGAGCCC GCAGCTGTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCTCTGATC GTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTACTCTGAAAATCAGCCG TGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGGCAACCCAT ATCCCATACACCTTCGGTCAAGGAATAAATGGAATTAACGTACGG TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA ATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC CTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
282	7H07, тяжелая цепь	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGCTT CCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATAT CATGCACTGGGTTTCGTCAGGCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGG CTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCAG GGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGG AACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACG CGGTACCTACTACTACGGTTCTGAACTGTTTGATTACTGGGGCCAAAGGT ACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC ACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG

		CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA TCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
283	7H07, легкая цепь	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQLL IYRVSKRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQATHIPYTFG QGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
284	7H07, тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYMHWVRQAPGQGLEWM GYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAR GTYYYGSELFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
285	2B03, легкая цепь	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGTC AGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTCCAC CGGCAACACGTACCTGAACCTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCC GCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGAT CGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCC GTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGTTGACCA CGTTCCGTACACCTTCGGTCAAGGAANNAACCTGGAAATTAACGTAC GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCATGTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
286	2B03, тяжелая цепь	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAACCGGGCGCT TCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATA TCACGCACTGGGTTTCGTACAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGG GCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCC AGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACAT GGAACGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCA CGCGGTACCTACTACTACGGTCCAGATCTGTTTGATTACTGGGGCCAAG GTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG AACTCAGGGCGCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCGGCTGTCTTAC AGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGACGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC

		ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTG CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACACAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
287	2B03, легкая цепь	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQLL IYRVSKRFSGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCLQLTHVPYTF GQGXXLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
288	2B03, тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYITHWVRQAPGGGLEWM GYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLLDVAVYYCAR GTYYYGPDLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTSKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG K
289	5A07, легкая цепь	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGTC AGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTCCAC CGGCAACACGTACCTGAACCTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCC GCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTCTCTGAT CGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCAGCTTTACTCTGAAAATCAGCC GTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCCAGGTCA TTACCCAGGTACCTTCGGTCAAGGAACCTAACTGGAAATTAACGTAC GGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
290	5A07, тяжелая цепь	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGCT TCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATA TCATGCACTGGGTTTCGTACAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGATGG GCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCC AGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACAT GGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTACTATTGTGCA CGCGGTACTTACTACTACGGTTCCGCCCTCTTTGATTACTGGGGCCAAG GTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCACCGGTCTT CCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACTTCCCGGCTGTCTTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGACGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAAGCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC

		ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTG CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
291	5A07, легкая цепь	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQLL IYRVSKRFSGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYVCLQPGHYPGTF GQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
292	5A07, тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWM GYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAR GTYYYGSALFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG K
293	5D08, легкая цепь	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGTC AGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTCCAC CGGCAACACGTACCTGAACCTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCC GCAGCTGCTGATCTACCGTGATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCTCTGAT CGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCC GTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCTGACCCA TGAACCATACACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAACCGTAC GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACCTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
294	5D08, тяжелая цепь	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGCT TCCGTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATA TCATGCACTGGGTTTCGTACAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGG GCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCC AGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACAT GGAACCTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCA CGCGGTACCTACTACTACGGTCTGAACTGTTTGATTACTGGGGCCAAAG GTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG AACTCAGGCGCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC

		ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTG CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAG
295	5D08, легкая цепь	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQLL IYRVSKRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHEPYTF GQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
296	5D08, тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWM GYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAR GTYYYGSEFLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKP KDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
297	5B08, легкая цепь	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCGGGTC AGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAACCTCCAC CGGCAACACGTACCTGAAGTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCC GCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGAT CGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCAGCTTACTCTGAAAATCAGCC GTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCTGGATTCT TTACCCAAACACCTTCGGTCAAGGAATAAACTGGAAATTAACGTAC GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
298	5B08, тяжелая цепь	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAACCGGGCGCT TCCGTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATA TCATGCACTGGGTTCTGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGG GCTACATTAACCCATAACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTC AGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACAT GGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTACTATTGTGCA CGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAAG GTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGG AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTAC AGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAAAGCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCT AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAAGACCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT AGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTG

		CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCTCCCGTGGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
299	5B08, легкая цепь	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQLL IYRVSKRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLDSYPNTF GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
300	5B08, тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWM GYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAR GTYYYGPQLFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVKDYFPEPVTVSWSNGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
301	5H09, легкая цепь	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCGGGTC AGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAATCTTCCAC CGGCAACACGTACCTGAACCTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCC GCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCTCTGAT CGTTTACGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTACTCTGAAAATCAGCC GTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCTGATCGA TTACCCAGTTACCTTCGGTCAAGGAACTAACTGGAATTAACAGTACG GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAAACAAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
302	5H09, тяжелая цепь	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAACCGGGCGCT TCCGTAAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATA TCATGCACTGGGTTTCGTCAGGCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGG GCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCC AGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACAT GGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCA CGCGGTACCTACTACTACGGTTCTGCACTGTTGATTACTGGGGCCAAG GTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGG AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCT AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCTCACCCTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGATAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTG

		CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
303	5H09, легкая цепь	DIVMTQTPLSLVTTPGQPASISCKSSQSLESSTGNTYLNWYLQKPGQSPQLL IYRVSKRFGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCLQLIDYPVTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
304	5H09, тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWM GYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR GTYYYGSALFDYWGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSLT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

7.2.2.2. Определение аффинности отобранных антител с помощью SPR.

Для точного определения аффинности с помощью SPR отобранные антитела к CD19 получали путем котрансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессионными векторами для клеток млекопитающих, используя полиэтиленмин. Клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами в соотношении 1:1 ("вектор для тяжелой цепи": "вектор для легкой цепи") согласно стандартной процедуре. Через 7 дней после трансфекции измеряли титр антитела в супернатанте и все титры уравнивали до 10 мкг/мл.

Аффинность (K_D) родительского антитела 8B8, а также его производных измеряли с помощью SPR, используя устройство ProteOn XPR36 (фирма Biorad) при 25°C. 7000 RU поликлонального антитела к человеческому Fab иммобилизовали на всех 6 каналах GLM-чипа с помощью амминного сочетания (На-ацетат, pH 4,5, 25 мкл/мин, 240 с) (вертикальная ориентация). Каждый содержащий антитело супернатант НЕК фильтровали и разводили 3ФРТ (10 mM фосфат, 150 mM хлорид натрия, pH 7,4, 0,005% Твин 20) до концентрации 10 мкг/мл, а затем инъецировали в течение 360 с со скоростью 25 мкл/мин до достижения уровней иммобилизации, соответствующих 500-800 единиц ответа (RU), в вертикальной ориентации. Инъекция конструкции мономерный CD19-Fc: для измерения кинетических характеристик за один прогон ("one-shot"-кинетика) направление инъекции изменяли на горизонтальную ориентацию, трехкратные серийные разведения очищенной конструкции мономерный CD19-Fc (концентрации, варьирующие в диапазоне от 150 до 6 nM) инъецировали одновременно со скоростью 50 мкл/мин параллельно в различные каналы 1-4, продолжительность ассоциации составляла 180 с, а продолжительность диссоциации 300 с. Fc-фрагмент человеческого IgG (150 nM) инъецировали в канал 5 в качестве отрицательного контроля специфического связывания с конструкцией мономерный CD19-Fc. В шестой канал инъецировали буфер (3ФРТ), создавая "параллельный" ("in-line") "пустой" контроль для сопоставления. Обобщение соответствующих сенсограмм представлено на фиг. 33. Регенерацию осуществляли с помощью двух импульсных обработок 10 mM глицином, pH 1,5 и 50 mM NaOH в течение 30 с со скоростью 90 мкл/мин (горизонтальная ориентация). Константы скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывали с использованием простой модели связывания 1:1 Ленгмюра с помощью программы ProteOn Manager v3.1 путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия диссоциации (K_D) рассчитывали как соотношение k_{off}/k_{on} . Обобщение результатов кинетических и термодинамических исследований представлено в табл. 60. Константа диссоциации всех клонов с созревшей аффинностью улучшалась по сравнению с их родительским клоном 8B8.

Таблица 60. Обобщение кинетических и термодинамических данных, характеризующих взаимодействие между анти-CD19 huIgG1 и человеческим CD19

Клон	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	KD (M)
родительский 8B8	5,66E+4	1,34E-4	2,36E-9
5H09	7,91E+4	1,50E-5	1,89E-10
7H07	7,45E+4	5,57E-5	7,47E-10
2B03	6,02E+4	5,00E-5	8,31E-10
2B11	6,34E+4	3,14E-5	4,95E-10
5A07	6,98E+4	3,07E-5	4,40E-10
5B08	6,81E+4	5,26E-5	7,72E-10
Клон	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	KD (M)
5D08	8,88E+4	8,44E-5	9,51E-10

7.2.2.3. Получение и очистка анти-CD19 IgG1 P329G LALA.

Отобранные антитела к CD19 получали путем котрансфекции клеток НЕК293-EBNA экспрессионными векторами для клеток млекопитающих, используя полиэтиленмин. Клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами в соотношении 1:1 ("вектор для тяжелой цепи": "вектор для легкой цепи").

Для получения в 500-миллилитровые встряхиваемые колбы засевали 400 млн клеток НЕК293 EBNA за 24 ч до трансфекции. Перед трансфекцией клетки центрифугировали в течение 5 мин при 210×g и супернатант заменяли предварительно нагретой средой CD CHO. Экспрессионные векторы (200 мкг общей ДНК) смешивали в 20 мл среды CD CHO. После добавления 540 мкл ПЭИ раствор интенсивно перемешивали в течение 15 с и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки смешивали с раствором ДНК/ПЭИ, переносили в 500-миллилитровую встряхиваемую колбу и инкубировали в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂. После инкубации добавляли 160 мл среды F17 и клетки культивировали в течение 24 ч. Через 1 день после трансфекции в культуру добавляли 1 мМ вальпроовую кислоту и 7% Feed 1 с добавками. После культивирования в течение 7 дней супернатант собирали центрифугированием в течение 15 мин при 210×g. Раствор стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм-фильтр), дополняли азмидом натрия до конечной концентрации 0,01% (мас./об.) и выдерживали при 4°C.

Очистку молекул антител из супернатантов клеточных культур осуществляли с помощью аффинной хроматографии с использованием белка А, описанной выше в качестве примера очистки слияний антиген-Fc. Белок концентрировали и фильтровали перед внесением в колонку HiTrap Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную раствором, содержащим 20 мМ гистидин, 140 мМ NaCl, pH 6,0.

Концентрацию белка очищенных антител определяли, измеряя ОП при 280 нМ, используя коэффициент молярной экстинкции, который рассчитывали на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу антител анализировали с помощью КЭ-ДСН в присутствии восстановителя и без него (фирма Invitrogen, США), используя устройство LabChipGXII (фирма Caliper). Содержание агрегатов в образцах антител анализировали с помощью колонки для аналитической гель-фильтрации TSKgel G3000 SW XL (фирма Tosoh), уравновешенной подвижным буфером, содержащим 25 мМ K₂HPO₄, 125 мМ NaCl, 200 мМ моногидрохлорид L-аргинина, 0,02% (мас./об.) NaN₃, pH 6,7, при 25°C (табл. 61).

Таблица 61. Результаты биохимического анализа клонов анти-CD19 P329G LALA IgG1

Клон	Выход [мг/л]	Мономер [%]	КЭ-ДСН (не восстан.)
родительский 8B8	25,3	100	99,1
2B11	35,4	100	98,4
7H07	89,8	100	99,4
2B03	182	100	100
5A07	90,2	100	99,4
5D08	90,2	100	99,3
5B08	24,1	99,6	100
5H09	29,9	100	98,1

Для получения биспецифических конструкций отбирали клон 2B11, поскольку в нем отсутствовали три "горячие точки" деамидирования.

Последовательность ДНК, кодирующей часть эктодомена (аминокислоты 71-254 и 71-248) человеческого лиганда для 4-1BB, синтезировали на основе P41273-последовательности из базы данных Uniprot.

7.2.3. Получение одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей тримерный лиганд

для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 4.1).

Конструкцию 4.1 получали согласно методу, описанному для конструкции 3.1 (фиг. 30), но используя последовательности ДНК, кодирующие вариабельную область тяжелой и легкой цепи специфического для CD19 связывающего агента клон 8B8-2B11.

В табл. 62 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами и с заряженными остатками (конструкция 4.1).

Таблица 62. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 4.1)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
129	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 3
130	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	см. таблицу 3
305	нуклеотидная последовательность анти-CD19(8B8-2B11), Fc-цепь с «впадиной»	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAACGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCCGTGACCG TGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACAC CTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTG AGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AAATCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACGCTCTCGTG CGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGAACAATAACAAGACC ACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG

		GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACCTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
277	нуклеотидная последовательность анти- CD19 (8B8-2B11), легкая цепь	см. таблицу 59
115	димерный hu 4-1BBL (71- 254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 3
116	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	см. таблицу 3
306	анти-CD19 (8B8-2B11), Fc-цепь с «впадиной»	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
206	анти-CD19 (8B8-2b11), легкая цепь	см. таблицу 59

* обозначает заряженные остатки.

7.2.4. Получение одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 4.2).

Конструкцию 4.2 получали согласно методу, описанному для конструкции 3.2 (фиг. 30), но используя последовательности ДНК, кодирующие вариабельную область тяжелой и легкой цепи специфического для CD19 связывающего агента клона 8B8-2B11.

В табл. 63 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 4.2).

Таблица 63. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 4.2)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
165	нуклеотидная последовательность конструкции димерный лиганд (71-254)-CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 22
166	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1	См. таблицу 22
305	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8-2B11), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 62
277	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-2B11)	См. таблицу 59
117	димерный лиганд (71-254) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 22
118	мономерный лиганд (71-254)-CH1	См. таблицу 22
306	анти-CD19 (8B8-2B11), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 62
279	легкая цепь анти-CD19 (8B8-018)	См. таблицу 59

7.2.5. Получение двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 4.3).

Конструкцию 4.3 получали согласно методу, описанному для конструкции 3.3 (фиг. 30), но используя последовательности ДНК, кодирующие вариабельную область тяжелой и легкой цепи специфического для CD19 связывающего агента клона 8B8-2B11.

В табл. 64 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 4.3).

Таблица 64. кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 4.3)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
307	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «впадиной»-димерный	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC
	лиганд	GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAACGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGCGGCACAGCCGCTCTGGGC TGCTTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCC CGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGT GGTCACCGTGCCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCC ACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCCGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTGCACCCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTCT CGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTG AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCG GCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCT GAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGG GCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCG ATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGC GTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAA GAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTT CAGCTGGAACGTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGG CTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGC TGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCC TGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGG CAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGC ATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTG ACACAGGGCGCTACAGTGTCTGGGCCTGTTACAGTGAACCC CGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCG GAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAA CTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAG GGAATGTTGCGCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGG GGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAA AGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGGTGACTATGTGTTTTT CAGCTGGAACGTAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAG GATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTG CTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCAC CAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAG GACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTG CATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGCATGCTTGAGCAGCTG

		ACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCT GAGATCCCTGCCGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
308	нуклеотидная последовательность анти- CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «выступом»- мономерный лиганд	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCTGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAACGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG GGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCC GCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACAATGCCCCAC CGTGCCCAAGCAGCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGA AGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGCTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTTGCCC CCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGG TGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACC CCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCC AAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGCGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGC CCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCAT GTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGG CCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTG ACTGACAGGCGGCCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACT GGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAACGTGTTCTTTTCACT GGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTG TGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAAGCGTGTCTG GCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCA GCTCCGAGGCCCCGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGG CTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCT GCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCTTGGCAGCTGACAC AGGGCGCTACAGTGCTGGGCTGTTTCAAGTGAACCCCGAG ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
277	нуклеотидная последовательность анти- CD19 (8B8-018), легкая	см. таблицу 59

	цепь	
309	анти-CD19 (8B8-2B11)- Fc-цепь с «впадиной»- димерный лиганд	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFPYSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGG LYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRVVAEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPPEIPAGLPSRSEGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGGSLYKEDTKELVVAAGVYVFFQLE LRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGL LFRVTPPEIPAGLPSRSE
310	анти-CD19 (8B8-2B11)- Fc-цепь с «выступом»- мономерный лиганд	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRVVAEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPPEIPAGLPSRSE
279	анти-CD19 (8B8-018), легкая цепь	См. таблицу 59

7.2.6. Получение одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 4.4).

Конструкцию 4.4 получали согласно методу, описанному для конструкции 3.4 (фиг. 30), но используя последовательности ДНК, кодирующие вариативную область тяжелой и легкой цепи специфического для CD19 связывающего агента клона 8B8-2B11.

В табл. 65 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами и с заряженными остатками (конструкция 4.4).

Таблица 65. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 4.4)

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
169	нуклеотидная последовательность конструкции димерный лиганд (71-248) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См таблицу 24
170	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1*	См таблицу 24
305	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8-2B11), Fc-цепь с «впадиной»	См таблицу 62
277	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-2B11)	См таблицу 59
119	димерный лиганд (71-248) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См таблицу 24
120	мономерный лиганд (71-248)-CH1*	См таблицу 24
306	анти-CD19 (8B8-2B11), Fc-цепь с «впадиной»	См таблицу 62
279	легкая цепь анти-CD19 (8B8-2B11)	См таблицу 59

* обозначает заряженные остатки.

7.2.7. Получение одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 4.5).

Конструкцию 4.5 получали согласно методу, описанному для конструкции 3.5 (фиг. 30), но используя последовательности ДНК, кодирующие вариабельную область тяжелой и легкой цепи специфического для CD19 связывающего агента клона 8B8-2B11.

В табл. 66 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 4.5).

Таблица 66. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 4.5)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
171	нуклеотидная последовательность конструкции димерный лиганд (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 25
172	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный лиганд (71-248)-CH1	см. таблицу 25
305	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8-2B11), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 62
277	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CD19 (8B8-2B11)	см. таблицу 59
173	димерный лиганд (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	см. таблицу 25
174	мономерный лиганд (71-248)-CH1	см. таблицу 25
306	анти-CD19 (8B8-2B11), Fc-цепь с «впадиной»	см. таблицу 62
279	легкая цепь анти-CD19 (8B8-2B11)	см. таблицу 59

7.2.8. Получение двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 4.6).

Конструкцию 4.6 получали согласно методу, описанному для конструкции 3.6 (фиг. 30), но используя последовательности ДНК, кодирующие вариабельную область тяжелой и легкой цепи специфического для CD19 связывающего агента клона 8B8-2B11.

В табл. 67 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 4.6).

Таблица 67. кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на CD19 (8B8-2B11) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 4.6)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
311	нуклеотидная последовательность конструкции анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «впадиной»-димерный	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATCCAGGGCC

	лиганд (71-248)	GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAACGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGGTGCACACCTTCCC CGCCGTGTGTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGT GGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCGTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGACCCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCTCT CGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTG AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGCG GCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCT GAGCCCTGATGATCCTGCCGGAAGTCTGGACCTGCGGCAGG GAATGTTTGCCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCG ATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGC GTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAA GAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTT CAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGG CTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGC TGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCC TGCCAGCAGCGAGGCCCAGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGG CAGGCTGTGTCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGC ATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTG ACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTACAGAGTGACCCC CGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGC GGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCGACGATCC CGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTGCTCAGCT GGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTG GTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGG GACTGTCTTACAAAGAAGATACAAAAAGAACTGGTGGTGGCTA AAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGGGC GGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCT CTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGAGGGGCTGCAGC ACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCTTCCGAGGC CAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCT GAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAG CCAGAGCCCCGCGATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGG
--	-----------------	--

		<i>GCTC</i>
312	нуклеотидная последовательность конструкции анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «выступом»-мономерный (71-248) лиганд	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAACGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCG GCTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCAC CGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCAATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACCCCTGCCC CCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCTGTGG TGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACC CCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCC AAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTGAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGCG GAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGC CCTGATGATCCTGCCGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAAT GTTTGCCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGG CCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTG ACTGACAGGGCGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAGAAGT GGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTGAGCT GGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTG TGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTG GCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCA GCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGG CTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCT GCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACAC AGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCTGCCGGGCTC
277	нуклеотидная последовательность анти-CD19 (8B8-2B11), легкая цепь	см. таблицу 59
313	анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc-цепь с «впадиной»-	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM

	димерный лиганд (71-248)	ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGG GSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVA EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
314	анти-CD19 (8B8-2B11)-Fc- цепь с «выступом»- мономерный (71-248) лиганд	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHWVRQA PGQGLEWMGYINPNYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
279	анти-CD19 (8B8-018), легкая цепь	см. таблицу 59

7.3. Получение "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc конструкций и человеческих IgG в качестве контрольных молекул.

7.3.1. Получение "ненацеленных" содержащих тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул (контрольные молекулы).

Указанные контрольные молекулы получали согласно методу, описанному выше для нацеленной на CD19 конструкции 3.1 (обозначена как контроль Б), 3.3 (обозначена как контроль В), 3.4 (обозначена как контроль Г) и 3.5 (обозначена как контроль Д), с единственным различием, состоящем в том анти-CD19-связывающий агент (VH-VL) заменяли на представляющий собой зародышевую линию контроль, обозначенный DP47, который не связывается с антигеном (см. фиг. 30).

В табл. 68 представлены соответственно кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной "ненацеленной" (DP47) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc(kih), содержащей "скрещенные" СН-CL с заряженными остатками молекулы, представляющей собой контроль Б.

В табл. 69 представлены соответственно кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной "ненацеленной" (DP47) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc(kih) молекулы, представляющей собой контроль В.

В табл. 70 представлены соответственно кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной "ненацеленной" (DP47) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc(kih) содержащей "скрещенные" СН-CL с заряженными остатками молекулы, представляющей собой контроль Г.

В табл. 71 представлены соответственно кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной "ненацеленной" (DP47) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc(kih) без заряженных остатков в СН-CL-кроссовер-молекулы, представляющей собой контроль Д.

Таблица 68. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной "ненацеленной" (DP47) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BBL (71-254) в слиянии с Fc(kih) молекулы с CH-CL-кроссовером и с заряженными остатками (контроль Б)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
96	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 3
97	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	См. таблицу 3
79	нуклеотидная последовательность DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
80	нуклеотидная последовательность легкой цепи DP47	См. таблицу 18
98	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 3
99	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	См. таблицу 3
81	DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
82	легкая цепь DP47	См. таблицу 18

* обозначает заряженные остатки.

Таблица 69. кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной "ненацеленной" (DP47) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BBL (71-254) в слиянии с Fc(kih) молекулы (контроль В)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
177	нуклеотидная последовательность конструкции DP47, Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-254)	См. таблицу 27
178	нуклеотидная последовательность конструкции DP47, Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	См. таблицу 27
80	нуклеотидная последовательность легкой цепи DP47	См. таблицу 18
179	DP47, Fc-цепь с «впадиной», слитая с димерным hu 4-1BBL (71-254)	См. таблицу 27
180	DP47, Fc-цепь с «выступом», слитая с мономерным hu 4-1BBL (71-254)	См. таблицу 27
82	легкая цепь DP47	См. таблицу 18

Таблица 70. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной "ненацеленной" (DP47), содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BBL (71-248) в слиянии с Fc(kih) молекулы с CH-CL-кроссовером и с заряженными остатками (контроль Г)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
169	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 24
170	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1*	См. таблицу 24
79	нуклеотидная последовательность DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
80	нуклеотидная последовательность легкой цепи DP47	См. таблицу 18
119	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 24
120	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	См. таблицу 24
81	DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
82	легкая цепь DP47	См. таблицу 18

* обозначает заряженные остатки.

Таблица 71. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной "ненацеленной" (DP47) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BBL (71-248) в слиянии с Fc(kih) молекулы с CH-CL-кроссовером и без заряженных остатков (контроль Д)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
171	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 25
172	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1	См. таблицу 25
79	нуклеотидная последовательность DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
80	нуклеотидная последовательность легкой цепи DP47	См. таблицу 18
173	димерный hu 4-1BBL (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 25
174	мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1	См. таблицу 25
81	DP47, Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 18
82	легкая цепь DP47	См. таблицу 18

7.3.2. Антитела в качестве контрольных молекул.

Получали два контрольных человеческих IgG1, содержащих PGLALA.

В табл. 72 представлены кДНК и аминокислотные последовательности анти-CD19 huIgG1 PGLALA (клон 8B8-018), т.е. контроля Ж.

В табл. 73 представлены кДНК и аминокислотные последовательности контрольной зародышевой линии DP47 huIgG1 PGLALA (контроль Е).

Таблица 72. кДНК и аминокислотные последовательности анти-CD19 (8B8-018) huIgG1 PGLALA (контроль Ж)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
315	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи CD19 (8B8-018) (huIgG1 PGLALA)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTC AAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGC AAGGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATATC ATGCATTGGGTACAGGCAGGCCCTGGCCAAGGT CTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATATAAT GATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGA AGAGTCACTATGACATCTGACACCAAGTATCAGC ACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTG ATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCA CATATTACTACGGCTCAGCTCTGTTGACTATTG GGGGCAGGGAACCAAGTAACCGTGAGCTCCG CAAGTACTAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGG CACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCTGGGGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAG CGTCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA
204	нуклеотидная последовательность легкой цепи CD19 (8B8-018)	см. таблицу 47
316	тяжелая цепь CD19 (8B8-018) (huIgG1 PGLALA)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIM HWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGR VTMTSDTSISTAYMELSRSDDTAVYYCARGTY YYGSALFDYWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
206	легкая цепь CD19 (8B8-018)	См. таблицу 47

Таблица 73. кДНК и аминокислотные последовательности контрольной зародышевой линии DP47 huIgG1 PGLALA (контроль E)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
181	нуклеотидная последовательность тяжелой цепи DP47 (hu IgG1 PGLALA)	См. таблицу 29
80	нуклеотидная последовательность легкой цепи DP47	См. таблицу 18
182	тяжелая цепь DP47 (hu IgG1 PGLALA)	См. таблицу 29
82	легкая цепь DP47	См. таблицу 18

7.4. Получение нацеленных на CD19 содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул и соответствующих контрольных молекул.

Кодирующие последовательности нацеленных и "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) антигенсвязывающих молекул клонировали в плазмидном векторе, в котором экспрессия вставки контролируется промотором MPSV и который содержит синтетическую полиА-последовательность, локализованную на 3'-конце CDS. Кроме того, вектор содержал последовательность OriP EBV для поддержки эписомальной формы плазмиды.

Содержащую разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) антигенсвязывающую молекулу получали путем совместной трансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессионными векторами для клеток млекопитающих с использованием полиэтиленимина. Клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами. Для вариантов 1, 2, 4, 5 и соответствующих контролей Б, Г и Д применяли соотношение 1:1:1:1 ("вектор для конструкции димерный лиганд-CL-цепь с "выступом": "вектор для слияния мономерный лиганд-CH1": "вектор для анти-CD19 Fab с цепью с "впадиной": "вектор для легкой цепи анти-CD19"). Для вариантов 3, 6 и соответствующих контролей В применяли соотношение 1:1:1 ("вектор для конструкции huIgG1-Fc-цепь с "впадиной"-димерный лиганд": "вектор для конструкции huIgG1-Fc-цепь с "выступом"-мономерный лиганд": "вектор для легкой цепи анти-CD19"). Человеческие IgG, применяемые в качестве контролей в этом анализе, получали методом, применяемым для биспецифической конструкции (для трансфекции применяли только вектор для легкой цепи и вектор для тяжелой цепи в соотношении 1:1).

Для производства в 500-миллилитровые встряхиваемые колбы засевали 300 млн клеток HEK293 EBNA за 24 ч до трансфекции. Для трансфекции клетки центрифугировали в течение 10 мин при $210 \times g$ и супернатант заменяли 20 мл предварительно нагретой среды CD CHO. Экспрессионные векторы (200 мкг общей ДНК) смешивали в 20 мл среды CD CHO. После добавления 540 мкл ПЭИ раствор интенсивно перемешивали в течение 15 с и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки смешивали с раствором ДНК/ПЭИ, переносили в 500-миллилитровую встряхиваемую колбу и инкубировали в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂. После инкубации добавляли 160 мл среды Excell, дополненной 6 mM L-глутамином, 5 г/л соевого пептида (PEPSOY) и 1,2 mM вальпроевой кислотой, и клетки культивировали в течение 24 ч. Через 1 день после трансфекции добавляли 12% Feed 7 (аминокислота и глюкоза). После культивирования в течение 7 дней супернатант собирали центрифугированием в течение 30-40 мин при по меньшей мере 400×g. Раствор стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм-фильтр), дополняли азмидом натрия до конечной концентрации 0,01% (мас./об.) и выдерживали при 4°C.

Содержащую разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающую молекулу, а также IgG, очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии с использованием белка А с последующей гель-фильтрацией. Для осуществления аффинной хроматографии супернатант вносили в колонку MabSelect Sure (CV = 5-15 мл, смола фирмы GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим фосфат натрия (20 mM), цитрат натрия (20 mM) (pH 7,5). Несвязанный белок удаляли путем промывки таким же буфером, используя его в объеме, кратном по меньшей мере 6 об. колонки. Связанный белок элюировали, используя или линейный градиент (20 CV), или ступенчатую элюцию (8 CV), буфером, содержащим 20 mM цитрат натрия, 100 mM хлорид натрия, 100 mM глицин (pH 3,0). При осуществлении элюции с использованием линейного градиента осуществляли дополнительную ступенчатую элюцию с применением объема, кратного 4 об. колонки.

Значение pH собранных фракций регулировали, добавляя 1/10 (об./об.) 0,5M фосфата натрия, pH 8,0. Белок концентрировали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную раствором, содержащим 20 mM гистидин, 140 mM хлорид натрия, 0,01 об.% Твин20, pH 6,0.

Концентрацию белка определяли путем измерения оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу нацеленной содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулы анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя (5 mM 1,4-дифитотреитол) и без него и осуществляли окрашивание кумасси SimpleBlue™ SafeStain, (фирма Invitrogen, США). Содержание агрегатов в образцах анализировали, используя колонку для аналитической гель-фильтрации TSKgel G3000 SW XL (фирма Tosoh), уравновешенную подвижным буфером, содержащим 25 mM K₂HPO₄, 125 mM NaCl, 200 mM моногидрохлорид L-аргинина, 0,02% (мас./об.) NaN₃, pH

6,7 при 25°C.

В табл. 74 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономеров нацеленных на CD19 содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул.

Таблица 74. Результаты биохимического анализа нацеленных на CD19 содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул

Конструкция	Мономер [%] (SEC)	Выход [мг/л]
одновалентная нацеленная на CD19 (8B8-018) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc с CH-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 3.1)	98	8,6
двухвалентная нацеленная на CD19 (8B8-018) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (конструкция 3.3)	100	11,3
одновалентная нацеленная на CD19 (8B8-018) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc с CH-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 3.4)	99	11,5
одновалентная нацеленная на CD19 (8B8-018), содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc с CH-CL-кроссовером без заряженных остатков (конструкция 3.5)	97	13,3
двухвалентная нацеленная на CD19 (8B8-018) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (конструкция 3.6)	96	19,9
одновалентная нацеленная на CD19 (8B8-2B11) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc с CH-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 4.4)	99,2	21,2

В табл. 75 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономера "ненацеленных" (DP47) содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) как одновалентных (контроль Б, Г и Д), так и двухвалентных (контроль В) молекул.

Таблица 75. Результаты биохимического анализа "ненацеленных" (DP47) содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекул

Конструкция	Мономер [%] (SEC)	Выход [мг/л]
одновалентная «ненацеленная» (DP47) содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) (контроль Б)	99	15,4
двухвалентная «ненацеленная» (DP47) содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) (контроль В)	98	12,6
одновалентная «ненацеленная» (DP47) содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) (контроль Г)	99,5	25,9
одновалентная «ненацеленная» (DP47) содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) (контроль Д)	93,3	4,1

В табл. 76 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономера человеческого анти-CD19 (8B8-018) IgG1 PGLALA и IgG1 PGLALA зародышевой линии DP47 (контроль Е).

Таблица 76. Результаты биохимического анализа контрольных человеческих IgG1 PGLALA

Конструкция	Мономер [%] (SEC)	Выход [мг/л]
анти-CD19 (8B8-018) huIgG1 PGLALA	100	36,6
человеческий IgG1 PGLALA зародышевой линии DP47	100	50

Пример 8.

Функциональная характеристика нацеленных на CD19 содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

8.1. Поверхностный плазмонный резонанс (аффинность).

Связывание нацеленных на CD19 содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул (конструкции 3.4 и 3.6) с рекомбинантным 4-1BB-Fc(kih) и CD19 оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Все эксперименты на основе SPR осуществляли с помощью устройства Biacore T100 при 25°C с использованием HBS-EP в качестве подвижного буфера (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% сурфактанта P20, фирма

Biacore, Фрейбург/Германия).

Взаимодействие с 4-1BB человека и обезьян циномолгус.

Антитело к человеческому Fab (фирма Biacore, Фрейбург/Германия) непосредственно связывали с CM5-чипом при pH 5,0, используя набор для стандартного аминного сочетания (фирма Biacore, Фрейбург/Германия). Уровень иммобилизации соответствовал примерно 8000 RU. Нацеленные на CD19 содержащие разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc молекулы "захватывали" в течение 60 с в концентрации 2 и 5 нМ (инъектировали также контроль Г). Рекомбинантный человеческий или обезьяний (циномолгус) 4-1BB-avi His пропускали в диапазоне концентраций от 2,7 до 2000 нМ (3-кратные разведения) со скоростью потока 30 мкл/мин через проточные ячейки в течение 120 с. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение 180 с. Различия всех показателей преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного в проточной референс-ячейке. В этом случае антигены пропускали по поверхности с иммобилизованным антителом к человеческому Fab, но инъектировали HBS-EP вместо антител.

Взаимодействие с человеческим CD19.

Антитело к человеческому Fab (фирма Biacore, Фрейбург/Германия) непосредственно связывали с CM5-чипом при pH 5,0, используя набор для стандартного аминного сочетания (фирма Biacore, Фрейбург/Германия). Уровень иммобилизации соответствовал примерно 8000 RU. Нацеленные на CD19 содержащие разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc молекулы или контрольное антитело (анти-CD19 (8B8-018) huIgG1 PGLALA) "захватывали" в течение 60 с в концентрации 20 нМ. Рекомбинантный человеческий CD19-Fc(kih) пропускали в диапазоне концентраций от 7,8 до 500 нМ (2-кратное разведение) со скоростью потока 30 мкл/мин через проточные ячейки в течение 120 с. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение 130/1800 с. Различия всех показателей преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного в проточной референс-ячейке. В этом случае антигены пропускали по поверхности с иммобилизованным антителом к человеческому Fab, но инъектировали HBS-EP вместо антител.

Кинетические константы определяли с помощью программы Biacore T200 Evaluation (vAA, фирма Biacore AB, Уппсала/Швеция), осуществляя аппроксимацию путем численного интегрирования уравнений для скорости на основе модели связывания 1:1 Ленгмюра.

Биспецифические конструкции 3.4, 3.6 и контроль Г характеризовались сходным связыванием с 4-1BB. В табл. 77 представлены средние значения и стандартные отклонения (в скобках), полученные в двух экспериментах (в которых концентрации конструкций в растворе, в котором осуществляли "захват", составляли 2 или 5 нМ). Биспецифические конструкции 3.4 и 3.6 связывались с человеческим CD19 с такой же аффинностью, что и IgG. Константы аффинности, характеризующие взаимодействие, определяли путем аппроксимации на основе модели связывания 1:1 Ленгмюра. Данные, полученные при оценке с использованием hu4-1BB и су4-1BB, представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (в скобках) (два эксперимента, в которых концентрации в растворе, в котором осуществляли "захват", составляли 2 или 5 нМ).

Таблица 77. Связывание нацеленных на CD19 содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc молекул с рекомбинантным человеческим (hu) 4-1BB, обезьяньим (cy) 4-1BB и человеческим (hu) CD19

	Антиген	Ka (1/Mc)	Kd 1/c)	KD (M)
одновалентная нацеленная на CD19 (8B8-018) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) молекула с CH-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 3.4)	hu 4-1BB	7,2E+04 (5,9E+03)	2,5E-02 (1,0E-05)	3,4E-07 (2,8E-08)
	cy 4-1BB	1,2E+05 (8,6E+03)	1,3E-02 (1,8E-04)	1,1E-07 (9,9E-09)
	hu CD19	2,77E+04	2,67E-04	9,64E-09
двухвалентная нацеленная на CD19 (8B8-018) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) молекула (конструкция 3.6)	hu 4-1BB	6,9E+04 (1,7E+03)	2,4E-02 (1,5E-04)	3,5E-07 (1,1E-08)
	cy 4-1BB	1,1E+05 (7,7E+03)	1,4E-02 (3,1E-04)	1,3E-07 (1,3E-08)
	hu CD19	2,55E+04	2,69E-04	1,06E-08
одновалентная «ненацеленная» (DP47) содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) молекула с CH-CL-кроссовером и с заряженными остатками (контроль Г)	hu 4-1BB	7,3E+04 (3,9E+03)	2,6E-02 (6,3E-04)	3,5E-07 (1,0E-08)
	cy 4-1BB	1,2E+05 (1,9E+03)	1,4E-02 (1,0E-04)	1,2E-07 (2,9E-09)
анти-CD19 (8B8-018) huIgG1 PGLALA	hu CD19	2,12E+04	2,61E-04	1,23E-08

8.2. Поверхностный плазмонный резонанс (одновременное связывание).

Оценивали способность одновременно связываться с человеческим 4-1BB-Fc(kih) и человеческим CD19 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Все эксперименты на основе SPR осуществляли с помощью устройства Biacore T100 при 25°C с использованием HBS-EP в качестве подвижного буфера (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% сурфактанта P20, фирма Biacore, Фрейбург/Германия). Биотинилированную конструкцию человеческий 4-1BB-Fc(kih) связывали непосредственно с проточной ячейкой стрептвидинового (SA) сенсорного чипа. Применяли уровни иммобилизации, соответствующие вплоть до 250 резонансным единицам (RU).

Нацеленные на CD19 содержащие тримерный разделенный 4-1BBL конструкции (конструкции 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 4.4) пропускали в концентрации 200 нМ со скоростью потока 30 мкл/мин через проточные ячейки в течение 90 с и время фазы диссоциации устанавливали на 0 с. Человеческий CD19 инъецировали в качестве второго анализатора, пропуская его со скоростью потока 30 мкл/мин через проточные ячейки в течение 90 с в концентрации 500 нМ (фиг. 34). Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение 120 с. Различия всех показателей преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного в проточной референс-ячейке, в которой не иммобилизовали белок.

Как продемонстрировано на графиках на фиг. 35, все биспецифические конструкции обладали способностью одновременно связываться с человеческим 4-1BB и человеческим CD19.

Пример 9.

Функциональная характеристика нацеленных на CD19 содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

9.1. Связывание нацеленных на CD19 содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул на активированных человеческих PMBC.

Для оценки связывания содержащих тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул с человеческими PMBC использовали в различных полученных титровании концентрациях нацеленные на CD19 содержащие тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы, осуществляя анализ, описанный в примере 5.2.

На фиг. 36А и 36Б продемонстрировано связывание конструкций 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 и 3.6, полученных согласно методу, описанному в примере 7, на активированных экспрессирующих 4-1BB CD4⁺-Т-клетках и CD8⁺-Т-клетках соответственно. Дискриминационные окна устанавливали на живые CD45⁺CD3⁺CD4⁺-или CD45⁺CD3⁺CD8⁺-Т-клетки и строили график зависимости MFI для конъюгированного с PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического AffiniPure от полученных титрованием концентраций нацеленных содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc вариантов. В табл. 78 представлены полученные величины EC₅₀, определенные для конструкций 3.1, 3.3.

3.4, 3.5 и 3.6 и контрольных молекул.

Таблица 78. Связывание на активированных экспрессирующих 4-1BB CD4⁺-Т-клетках и CD8⁺-Т-клетках

Конструкция	EC ₅₀ [нМ] 4-1BB ⁺ CD8 ⁺	EC ₅₀ [нМ] 4-1BB ⁺ CD4 ⁺
контроль Б	0,05	0,26
контроль В	0,02	0,30
контроль Г	0,04	0,28
контроль Д	0,13	1,22
3.1	0,03	0,28
3.3	0,01	0,29
3.4	0,15	2,04
3.5	0,04	1,03
3.6	0,05	0,21

9.2. Связывание с экспрессирующими CD19 опухолевыми клетками.

Для анализов связывания на экспрессирующих CD19 опухолевых клетках применяли следующие экспрессирующие человеческий CD19 клеточные линии лимфомы: клетки диффузной крупноклеточной неходжкинской В-клеточной лимфомы (B-NHL) линии SU-DHL-8 (DSMZ ACC573), клетки острого лимфобластного лейкоза из клеток-предшественников В-лимфоцитов линии Nalm6 (DSMZ ACC-128), клетки диффузной крупноклеточной лимфобластной лимфомы линии Toledo (ATCC CRL-2631) и клетки диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы линии OCI-Ly18 (DSMZ ACC-699). Анализы осуществляли согласно методу, описанному выше в примере 5.3 для экспрессирующих FAP линий опухолевых клеток MV-3 и WM-266-4.

Дискриминационные окна устанавливали на живые опухолевые клетки и строили график зависимости MFI для конъюгированного с PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fc-специфического AffiniPure от полученных титрованием концентраций нацеленных содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc конструкций.

На фиг. 37А продемонстрировано связывание конструкций 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 и 3.6, полученных согласно методу, описанному в примере 7, с клетками диффузной крупноклеточной неходжкинской В-клеточной лимфомы (B-NHL) линии SU-DHL-8, на фиг. 37Б - связывание конструкций 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 и 3.6 с клетками острого лимфобластного лейкоза из клеток-предшественников В-лимфоцитов линии Nalm6. На фиг. 37В продемонстрировано связывание конструкций 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 и 3.6 с клетками диффузной крупноклеточной лимфобластной лимфомы линии Toledo, а на фиг. 37Г - связывание конструкций 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 и 3.6 с клетками диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы линии OCI-Ly18. В табл. 79 представлены полученные величины EC₅₀, определенные для конструкций 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 и 3.6 и контрольных молекул.

Таблица 79. Связывание с экспрессирующими CD19 опухолевыми клетками

Конструкция	EC ₅₀ [нМ] SU-DHL-8	EC ₅₀ [нМ] Nalm6	EC ₅₀ [нМ] Toledo	EC ₅₀ [нМ] OCI-Ly18
3.1	0,64	0,43	0,29	0,29
3.3	0,15	0,14	0,10	0,09
3.4	0,31	0,39	0,29	0,26
3.5	0,54	0,43	0,27	0,31
3.6	0,14	0,12	0,09	0,10
контроль Ж	0,09	0,10	0,06	0,07

Пример 10.

Биологическая активность нацеленных на CD19 содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

10.1. Активация NF-κB в клетках HeLa, экспрессирующих человеческий 4-1BB.

Клетки HeLa, экспрессирующие человеческий 4-1BB и NF-κB-люциферазу, создавали согласно методу, описанному в примере 6.1.

Активация NF-κB в клетках HeLa, экспрессирующих человеческий 4-1BB, при совместном культивировании с экспрессирующими CD19 опухолевыми клетками.

Клетки HeLa, экспрессирующие NF-κB-люциферазу и человеческий 4-1BB, собирали и ресуспендировали в среде DMEM, дополненной 10 об.% FBS и 1 об.% GlutaMAX-I, до концентрации 0,2×10⁶ клеток/мл. 100 мкл (2 × 10⁴ клеток) указанной клеточной суспензии переносили в каждую лунку стерильного белого плоскодонного 96-луночного планшета для культуры ткани с крышкой (фирма Greiner bio-one, каталожный № 655083) и планшет инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день добавляли 50 мкл среды, содержащей в концентрациях, полученных титрованием, нацеленные на CD19 содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (CD19 разделенный тример 4-1BBL) или "ненацеленные" (DP47) содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (DP47 разделенный тример 4-1BBL). Экспрессирующие CD19

линии клеток В-клеточной лимфомы (линия клеток диффузной крупноклеточной неходжкинской В-клеточной лимфомы (В-NHL) SU-DHL-8 (DSMZ ACC573) и клетки человеческой неходжкинской В-клеточной лимфомы линии Пфейфер (ATCC CRL-2632)) ресуспендировали в среде DMEM, дополненной 10 об.% FBS и 1 об.% GlutaMAX-I, до концентрации 2×10^6 клеток/мл.

Суспензию экспрессирующих CD19 клеток В-клеточной лимфомы (50 мкл, конечное соотношение 1:5) или только среду добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение 6 ч при 37°C и 5% CO₂. Клетки промывали два раза 200 мкл/лунку D-3ФР. Добавляли в каждую лунку 40 мкл свежеприготовленного репортерного буфера для лизиса (фирма Promega, каталожный № E3971) и планшет выдерживали в течение ночи при -20°C. На следующий день планшеты с замороженными клетками и идентифицирующий буфер (система для анализа люциферазы 1000, фирма Promega, каталожный № E4550) подвергали оттаиванию при комнатной температуре. Добавляли 100 мкл идентифицирующего буфера в каждую лунку и максимально быстро измеряли люциферазную активность с использованием ридера для микропланшетов SpectraMax M5/M5e и программы SoftMax Pro (фирма Molecular Devices), подсчитывая испускание света в URL (единицы испускаемого света в течение 0,5 с/лунку), или планшет-ридера для считывания нескольких меток Victor3 1420 (multilabel counter plate reader) (фирма Perkin Elmer) и программы Perkin Elmer 2030 Manager, определяя испускание света в виде количества импульсов в секунду (CPS), и строили график зависимости от концентрации тестируемых конструкций.

Нацеленные на CD19 содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (конструкции 3.1 и 3.3) инициировали активацию пути передачи сигналов NFκB в репортерной клеточной линии в присутствии экспрессирующих CD19 клеток В-клеточной лимфомы. В противоположность этому, "ненацеленные" контрольные молекулы не инициировали такое же действие при применении в любых тестируемых концентрациях (фиг. 38).

Пример 11.

11.1. Получение нацеленных на CEA (T84.66-LCHN) содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

1.1.1. Гуманизация клона анти-CEA T84.66.

Новые гуманизированные варианты мышиного антитела T84.66 (Wagener и др., J. Immunol. 130, 1983, с. 2308, Neumaier и др., J. Immunol. 135, 1985, с. 3604) создавали путем трансплантации CDR в последовательности человеческих акцепторных каркасных участков зародышевой линии.

Гуманизация антитела нечеловеческого происхождения в основном включала трансплантацию остатков CDR из нечеловеческого антитела (донор) в каркасный участок человеческого антитела (акцептор). Как правило, акцепторный каркасный участок выбирают путем выравнивания последовательности донора относительно коллекции потенциальных акцепторных последовательностей и выбора одной из них, которая либо обладает приемлемой гомологией с донором, либо характеризуется сходными аминокислотами в некоторых положениях, которые имеют решающее значение для структуры и активности. При создании настоящего изобретения выбор акцепторного каркасного участка осуществляли путем выравнивания последовательности мышиного белка T84.66 (NCBI, код доступа № CAA36980 для тяжелой цепи (SEQ ID NO: 317), и CAA36979 (SEQ ID NO: 318) для легкой цепи) относительно коллекции последовательностей человеческой зародышевой линии и отбора такой человеческой последовательности, для которой характерна высокая идентичность последовательности. При создании настоящего изобретения последовательность IGHV1-69*08 из базы данных IMGT выбирали в качестве последовательности акцепторного каркасного участка тяжелой цепи (IMGT, код доступа Z14309, SEQ ID NO: 319), а последовательность IGKV3-11*01 (IMGT, код доступа X01668, SEQ ID NO: 320) выбирали в качестве последовательности акцепторного каркасного участка легкой цепи. В указанные два акцепторных каркасных участка трансплантировали три гипервариабельных участка (CDR) вариабельных доменов мышиных тяжелой и легкой цепей. Поскольку каркасный участок 4 (FR4) не являлся частью вариабельной области гена V зародышевой линии, то сравнительный анализ первичной структуры этого положения осуществляли индивидуально. Последовательность JH4 выбирали для тяжелой цепи, а последовательность JK2 выбирали для легкой цепи.

11.1.2. Связывание различных гуманизированных вариантов T84.66 IgG с клетками.

Связывание различных гуманизированных вариантов T84.66 IgG тестировали на экспрессирующих CEA клетках человеческой аденокарциномы желудка (MKN45, DSMZ ACC 409).

Клетки собирали, подсчитывали количество, оценивали жизнеспособность и ресуспендировали из расчета 2×10^6 клеток/мл в FACS-буфере (100 мкл 3ФР, 0,1% БСА). 100 мкл клеточной суспензии (содержащей $0,2 \times 10^6$ клеток) инкубировали в круглом 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C с возрастающими концентрациями анти-CEA IgG (4 нг/мл - 60 мкг/мл), дважды промывали холодным 3ФР, 0,1% БСА, повторно инкубировали в течение еще 30 мин при 4°C со вторичным антителом, представляющим собой конъюгированный с PE F(ab')₂-фрагмент козьего IgG против человеческого IgG, Fc-специфический AffiniPure (фирма Jackson Immuno Research Lab, PE №109-116-170), промывали дважды холодным 3ФР, 0,1% БСА и немедленно анализировали с помощью FACS, используя устройство FACS CantoII (программа FACS Diva). Получали кривые связывания и рассчитывали величины EC₅₀ с помо-

щью программы GraphPadPrism5.

На фиг. 39 представлены различные схемы связывания отобранных гуманизированных вариантов Т84.66 IgG с человеческим СЕА, который экспрессировался на МKN45-клетках. На основе рассчитанных характеризующих связывание величин EC_{50} (табл. 80) для дополнительного исследования выбирали гуманизированный вариант 1.

Таблица 80. Связывание различных гуманизированных вариантов Т84.66 IgG с клетками (величины EC_{50} , полученные на основе кривых связывания, представленных на фиг. 39, для расчета которых применяли программу Graph Pad Prism)

	EC_{50} (мкг/мл)
родительский химерный клон Т84.66	0,99
	EC_{50} (мкг/мл)
гуманизированный вариант 1	1,5
гуманизированный вариант 2	8,6
гуманизированный вариант 3	1,4
гуманизированный вариант 4	3,1
гуманизированный вариант 5	-
гуманизированный вариант 6	-

Гуманизированный вариант 1 обозначали ниже как Т84.66-LCHA. Аминокислотные последовательности его CDR и VH и VL, а также аминокислотные последовательности VH- и VL-доменов родительского химерного клон Т84.66 представлены в табл. 81.

Таблица 81. Аминокислотные последовательности переменных доменов анти-СЕА клон Т84.66-LCHA и его родительского антитела Т84.66

Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
СЕА CDR-H1	DTYMH	321
СЕА CDR-H2	RIDPANGNSKYVPKFQ	322
СЕА CDR-H3	FGYYVSDYAMAY	323
СЕА CDR-L1	RAGESVDIFGVGFLH	324
СЕА CDR-L2	RASNRAT	325
СЕА CDR-L3	QQTNEPDYPT	326
родительский СЕА-связывающий агент, VH	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGL EWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATITADTSSNTAYLQLTSLTSED AVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTSTVTVSS	327
родительский СЕА-связывающий агент, VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPG QPPKLLIYRASNLSESGIPVRFSGTSGRTDFTLIIDPVEADDAVATYYC QQTNEPDYPTFGGGTKLEIK	328
гуманизированный СЕА-связывающий агент анти-СЕА (Т84.66-LCHA), VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGFNIKDTYMHVVRQAPGQG LEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSS	329
гуманизированный СЕА-связывающий агент анти-СЕА (Т84.66-LCHA), VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQ APRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQ QTNEPDYPTFGGGTKLEIK	330

11.2. Получение нацеленных на СЕА (Т84.66-LCHA) содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

Различные фрагменты последовательности ДНК, кодирующей часть эктодомена (аминокислоты 71-254 и 71-248) человеческого лиганда для 4-1BB синтезировали на основе P41273-последовательности из базы данных Uniprot (SEQ ID NO: 42).

11.2.1. Получение одновалентной нацеленной на СЕА (Т84.66-LCHA) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 5.1).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных (G4S)₂-линкерами и слитых с человеческим IgG1-CL-доменом, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 29А: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254) и слитый с человеческим IgG1-CH-доменом, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 29Б: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH.

Для улучшения правильного спаривания интродуцировали указанные ниже мутации в "скрещенные" CH-CL. В димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL, мутации E123R и Q124K. В мономерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CH1, мутации K147E и K213E.

Последовательности ДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для СЕА, клон Т84.66-LCHA, субклонировали в рамке считывания либо с

константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами согласно методу, описанному в WO 2012/130831.

Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-СЕА-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-СЕА, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и СЕА-связывающий Fab (фиг. 40, конструкция 5.1).

В табл. 82 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на СЕА (Т84.66-LCHN) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL и заряженными остатками (конструкция 5.1).

Таблица 82. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на СЕА (Т84.66-LCHN) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) молекулы с CH-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 5.1)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
129	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 3
130	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	См. таблицу 3
331	нуклеотидная последовательность анти-СЕА (Т84.66-LCHN), Fc-цепь с «впадиной»	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGC TTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCCAGG CCCCGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACC CCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCCAAGTTCCAGG GCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCCACCGC CTACATGGAACGTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACT ACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGT GTCTCTGTCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACACGCGGCGGCACAGCCGCT CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGA CCGTGTCTTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCTCCCGCTGCA CACCTTCCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGC CTGAGCAGCGTGGTCAACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCG ACAAAACCTACACATGCCCCACCGTGCCCGAGCAGCTGAAGC TGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCC AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTGCAACGAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCC CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTCTC GTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAG ACCACGCTTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCCT CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA

332	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CEA (T84.66-LCHA)	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCACCCTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGTAGAGCCGGCGAGAGCGTGGACATCTTCGGCGTGGGATTTCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCAGACTGCTGATCTACAGAGCCAGCAACCCGGGCCACAGGCATCCCCGCCAGATTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGACCAACGAGGACCCCTACACCTTTGGCCAGGGCACC AAGCTGGAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
115	димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 3
116	мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	См. таблицу 3
333	анти-CEA (T84.66-LCHA), Fc-цепь с «впадиной»	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
334	легкая цепь анти-CEA (T84.66-LCHA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLPEPDAVYYCQQTNEPDYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

* обозначает заряженные остатки.

11.2.2. Получение одновалентной нацеленной на CEA (T84.66-LCHA) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 5.2).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных (G4S)₂-линкерами и слитых с человеческим IgG1-CL-доменом, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 29А, но без аминокислотных мутаций в CL-доме: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254) и слитый с человеческим IgG1-CH1-доменом, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 29Б, но без аминокислотных мутаций в CH1-доме: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH1.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CEA, клон Т84.66-LCHA, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1.

Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами согласно методу, описанному в WO 2012/130831. Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-CEA-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-CEA, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и CEA-связывающий Fab (фиг. 40, конструкция 5.2).

В табл. 83 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CEA (T84.66-LCHA) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL без заряженных остатков (конструкция 5.2).

Таблица 83. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CEA (T84.66-LCHN) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) молекулы с CH-CL-кроссовером без заряженных остатков (конструкция 5.2)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
165	нуклеотидная последовательность конструкции димерный лиганд (71-254)– CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 22
166	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1	См. таблицу 22
331	нуклеотидная последовательность анти-CEA (T84.66-LCHN), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 82
332	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CEA (T84.66-LCHN)	См. таблицу 82
117	димерный лиганд (71-254) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 22
118	мономерный лиганд (71-254) – CH1	См. таблицу 22
333	анти-CEA (T84.66-LCHN), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 82
334	легкая цепь анти-CEA (T84.66-LCHN)	См. таблицу 82

11.2.3. Получение двухвалентной нацеленной на CEA (T84.66-LCHN) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 5.3).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных (G4S)₂-линкерами, сливали с С-концом Fc-цепи с "впадиной" человеческого IgG1, согласно схеме, представленной на фиг. 29В: Fc-цепь с "впадиной" человеческого IgG1, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганд для 4-1BB (71-254) и слитый с С-концом Fc-цепи с "выступом" человеческого IgG1 получали согласно схеме, представленной на фиг. 29Г: Fc-цепь с "выступом" человеческого IgG1, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CEA, клон T84.66-LCHN, субклонировали в рамке считывания с константной тяжелой цепью с "впадиной", с "выступом", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами согласно методу, описанному в WO 2012/130831. Комбинация: анти-CEA huIgG1, содержащая димерный лиганд цепь с "впадиной" с мутациями Y349C/T366S/L368A/Y407V, анти-CEA huIgG1, содержащая мономерный лиганд цепь с "выступом" с мутациями S354C/T366W, и легкая цепь анти-CEA, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и два CEA-связывающих Fab (фиг. 40, конструкция 5.3).

В табл. 84 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на CEA (T84.66-LCHN) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 5.3).

Таблица 84. кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на СЕА (Т84.66-LCHА) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1ВВ (71-254) в слиянии с Fc (kih) PGLALA молекулы (конструкция 5.3)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
335	нуклеотидная последовательность конструкции анти-СЕА(Т84.66-LCHА)-Fc-цепь с «впадиной» димерный 4-1ВВL (71-254)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGC TTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCCAGG CCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACC CCGCCAACGGCAACAGCAAAATACGTGCCCAAGTTCCAGG GCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCCACCGC CTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACT ACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGT GTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGG CCCCCAGCAGCAAGAGCACACGCGGCGGCACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCA GCGTGGTCACCGTGCCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACAT GCCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGC CTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAG GCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGA GCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGC AGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGA TCGATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTG GCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACC AAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTT TTTCACTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATC TGGCTCTGTGTCTTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAG CGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGC CTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCCGAATAGCGCATTTGGGTTTC AAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGA GTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCA GCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGTGA

		CCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAG GCGGAGGCGGATCTGGCGGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACC CGAACTGTCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAG ACAGGGAATGTTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCT GATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGG CAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATA CAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGT TTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGC TCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGC TCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTG CCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAAAGCGCCTTCGGGTTC CAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGG AGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCA GCTGACTCAGGGGGCACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGAC ACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
336	нуклеотидная последовательность конструкции анти- СЕА(Т84.66-LCHA)-Fc- цепь с «выступом»- мономерный 41-BBL (71- 254)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGC TTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCCAGG CCCCGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACC CCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGG GCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCGACCTCCACCGC CTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACT ACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGT GTCTCTGCTAGCACCAAGGGGCCATCGGTCTCCCCCTGGC ACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGT CGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTC CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGC CCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCACT CTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTG CCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG TGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACTACAAGAC CACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTA CTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA ACGTGTTCACTGTCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGC GGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGC TGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAG GGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATC GATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGG CGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAA AGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGACTACGTGTTCTT

		TCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTG GCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCG CTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTC CTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGGGTTCAGG GCAGGCTGTCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTG CATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCT GACACAGGGCGCTACAGTGTCTGGGCTGTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
332	нуклеотидная последовательность анти- СЕА(Т84.66-LCHA), легкая цепь	см. таблицу 82
337	анти-СЕА(Т84.66-LCHA)- Fc-цепь с «впадиной»- димерный 41-BBL (71- 254)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTYMHVVRQA PGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRVVAEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGG GGSGGGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLE LRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLG LFRVTPEIPAGLPSRSE
338	анти-СЕА(Т84.66-LCHA)- Fc-цепь с «выступом»- мономерный 4-1BBL (71- 254)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTYMHVVRQA PGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRVVAEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
334	анти-СЕА(Т84.66-LCHA), легкая цепь	см. таблицу 82

11.2.4. Получение одновалентной нацеленной на СЕА (Т84.66-LCHA) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 5.4).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-248), разделенных (G4S)₂-линкерами и слитых с человеческим IgG1-CL-доменом, клонировали аналогично схеме, представленной на фиг. 29А: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-248) и слитый с человеческим IgG1-CH-доменом, клонировали аналогично схеме, представленной на фиг. 29Б: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH.

Полипептид, кодирующей димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL-доменом, субклонировали в рамке считывания с CH2- и CH3-доменами тяжелой цепи с "выступом" человеческого IgG1 (Merchant, Zhu и др. 1998). Для улучшения правильного спаривания интродуцировали указанные ниже мутации в "скрещенные" CH-CL. В димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL, интродуцировали мутации E123R и Q124K. В мономерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CH1, - мутации K147E и K213E.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связываю-

щего агента, специфического для CEA, клон T84.66-LCHN, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами согласно методу, описанному в WO 2012/130831. Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-CEA-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-CEA, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и CEA-связывающий Fab (фиг. 40, конструкция 5.4).

В табл. 85 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CEA (T84.66-LCHN) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL и заряженными остатками (конструкция 5.4).

Таблица 85. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CEA (T84.66-LCHN) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) молекулы с CH-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 5.1)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
169	нуклеотидная последовательность конструкции димерный лиганд (71-248) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 24
170	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-248) – CH1*	См. таблицу 24
331	нуклеотидная последовательность анти-CEA (T84.66-LCHN), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 82
332	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CEA (T84.66-LCHN)	См. таблицу 82
119	димерный лиганд (71-248) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 24
120	мономерный лиганд (71-248)-CH1*	См. таблицу 24
333	анти-CEA (T84.66-LCHN), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 62
334	легкая цепь анти-CEA (T84.66-LCHN)	См. таблицу 59

* обозначает заряженные остатки.

11.2.5. Получение одновалентной нацеленной на CEA (T84.66-LCHN) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами без заряженных остатков (конструкция 5.5).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-248), разделенных (G4S)₂-линкерами и слитых с человеческим IgG1-CL-доменом, клонировали аналогично схеме, представленной на фиг. 29А, но без аминокислотных мутаций в CL-доме: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-248) и слитый с человеческим IgG1-CH1-доменом, клонировали аналогично схеме, представленной на фиг. 29Б, но без аминокислотных мутаций в CH1-доме: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH1.

Последовательности ДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CEA, клон T84.66-LCHN, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами согласно методу, описанному в WO 2012/130831. Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-CEA-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-CEA, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и CEA-связывающий Fab (фиг. 40, конструкция 5.5).

В табл. 86 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на CEA (T84.66-LCHN) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL без заряженных остатков (конструкция 5.5).

Таблица 86. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на СЕА (Т84.66-LCHN) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) молекулы с CH-CL-кроссовером без заряженных остатков (конструкция 5.5)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
171	нуклеотидная последовательность конструкции димерный лиганд (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 25
172	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный лиганд (71-248)-CH1	См. таблицу 25
331	нуклеотидная последовательность анти- СЕА (Т84.66-LCHN), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 82
332	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-СЕА (Т84.66-LCHN)	См. таблицу 82
173	димерный лиганд (71-248) – CL-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 25
174	мономерный лиганд (71-248)-CH1	См. таблицу 25
333	анти-СЕА (Т84.66-LCHN), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 82
334	легкая цепь анти-СЕА (Т84.66-LCHN)	См. таблицу 82

11.2.6. Получение двухвалентной нацеленной на СЕА (Т84.66-LCHN) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 5.6).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-248), разделенных (G4S)₂-линкерами, сливали с С-концом Fc-цепи с "впадиной" человеческого IgG1, согласно схеме, представленной на фиг. 29В: Fc-цепь с "впадиной" человеческого IgG1, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганд для 4-1BB (71-248) и слитый с С-концом Fc-цепи с "выступом" человеческого IgG1 получали согласно схеме, представленной на фиг. 29Г: Fc-цепь с "выступом" человеческого IgG1, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB.

Последовательности ДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для СЕА, клон Т84.66-LCHN, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", с "выступом", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами согласно методу, описанному в WO 2012/130831. Комбинация: анти-СЕА huIgG1, содержащая димерный лиганд цепь с "впадиной" с мутациями Y349C/T366S/L368A/Y407V, анти-СЕА huIgG1, содержащая мономерный лиганд цепь с "выступом" с мутациями S354C/T366W, и легкая цепь анти-СЕА, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и два СЕА-связывающих Fab (фиг. 40, конструкция 5.6).

В табл. 87 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на СЕА (Т84.66-LCHN) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 5.6).

Таблица 87. кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на СЕА (Т84.66-LCHN) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) молекулы (конструкция 5.6)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
339	нуклеотидная последовательность конструкции анти-СЕА (Т84.66-LCHN)-Fc-цепь с «впадиной»-димерный 4-1BBL (71-248)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGC TTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCCAGG CCCCTGGACAGGGAAGTGAATGGATGGGCAGAATCGACC CCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGG GCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCCACCGC CTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGC CGTGTAATACTGTGCCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACT ACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGT GTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCT CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGA CCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGC CTGAGCAGCGTGGTCAACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCCAAGAGCTGCG ACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCCAGCACCTGAAGC TGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCC AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCC CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTCTC GTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAG ACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTGGAGGCGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAG GGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGACTGCTGG ACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCAGCTGGTGGCCAGAA CGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGTTACAGCGAT CCTGGAAGTGGTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCT ACAAAGAGGACACCAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCG GCGTGTAATACTACGTGTTCTTTAGCTGGAAGTGCAGAGAGT GGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTC TGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGC CCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCAC CTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAG AGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCG CTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAAGTGAACCCCCGAGATTCC AGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATC TAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATCCCGCTGG

		GCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTTCGCTCAGCTGGTG GCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGT ACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGG GACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGG CTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTCAGCTGGAACT GAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTC CCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGG GCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTT CTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCGAAGGACG CCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCAT CTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGA CTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACC TGAGATCCCAGCCGGGCTC
340	нуклеотидная последовательность конструкции анти- CEA (T84.66- LCHN)-Fc-цепь с «выступом»- мономерный (71- 248) 4-1BBL	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGC TTCAACATCAAGGACACCTACATGCACCTGGGTGCGCCAGG CCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACC CCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCAGG GCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCCACCGC CTACATGGAACCTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACT ACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGT GTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG GCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGAC ACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGAGC AAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCT GCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGT GTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGAC CACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG TACTCCAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGG CGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGG GCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAAGTGTGGA CCTGCGGCAGGGAATGTTGCCAGCTGGTGGCCAGAAC GTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATC CTGGAAGTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTA CAAAGAGGACACCAAGAAGAACTGGTGGTGGCCAAGCCGG CGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACCTGCGGAGAGTG GTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTTGGCCCTGC

		ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCC CGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACC TGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGA GGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGC TACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGAGTGACCCCCGAGATTCCT GCCGGGCTC
332	нуклеотидная последовательность анти-CEA (T84.66- LCHA), легкая цепь	см. таблицу 82
341	анти-CEA (T84.66- LCHA)-Fc-цепь с «впадиной»- димерный 4-1BBL (71-248)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTYMHVVRQA PGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYM ELSSLRSEDТАVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVYVF FQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAAGVYVYVFQLELRRV VAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGL
342	анти-CEA (T84.66- LCHA)-Fc-цепь с «выступом»- мономерный (71- 248) 4-1BBL	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTYMHVVRQA PGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYM ELSSLRSEDТАVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVYVF FQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
334	анти-CD19(8B8- 018), легкая цепь	см. таблицу 82

11.2.7. Получение одновалентной нацеленной на CEA (T84.66) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH1-CL-доменами с заряженными остатками (конструкция 5.7).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных (G4S)₂-линками, и слитых с человеческим IgG1-CL-доменом, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 29А: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254) и слитый с человеческим IgG1-CH-доменом, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 29Б: человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH.

Для улучшения правильного спаривания интродуцировали указанные ниже мутации в "скрещенные" CH-CL. В димерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CL, - мутации E123R и Q124K. В мономерный лиганд для 4-1BB, слитый с человеческим CH1, - мутации K147E и K213E.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CEA, клон T84.66, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "высту-

пом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами согласно методу, описанному в WO 2012/130831.

Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-СЕА-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-СЕА, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и СЕА-связывающий Fab. Конструкция 5.7 соответствует конструкции 5.1, представленной на фиг. 40.

В табл. 88 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на СЕА (Т84.66) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL и заряженными остатками (конструкция 5.7).

Таблица 88. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на СЕА (Т84.66) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) молекулы с CH-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 5.7)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
129	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu 4-1BBL (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 3
130	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	См. таблицу 3
343	нуклеотидная последовательность анти-СЕА (Т84.66), Fc-цепь с «впадиной»	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACCTGGTGGAACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGTACCGCCAGCGGCTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTCAAGCAGCGCCTGAGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCGACCCGCCAACGGCAACAGCAAAATACGTGCCCAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCAGCAGCAACACAGCCTACCTGCAGCTGACCGAGCCTGACCTCCGAGGACCCGCGTGTAAGTCTGCGCCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCTGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGGCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCCAAGAGCTGCACAAAACTCACACATGCCCCACCGTGCCCCAGCACCTGAAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAACAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC

		CGGGTAAA
344	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-CEA (Т84.66)	GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCTCTCTGGCCGTGTCTCTGGGACAGAGGGCCACCATGTCTTGACAGAGCCGGCGAGAGCGTGGACATCTTCGGCGTGGGATTTCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAGAGCCAGCAACCTGGAAAAGCGGCATCCCCGTGCGGTTTAGCGGCACCGGCAGCAGAACCGACTTCACCCTGATCATCGACCCCGTGGAAGCCGACGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGACCAACGAGGACCCCTACACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
115	димерный hu 4-1BB (71-254) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	См. таблицу 3
116	мономерный hu 4-1BB (71-254) – CH1*	См. таблицу 3
345	анти-CEA (Т84.66), Fc-цепь с «впадиной»	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVWKQRP EQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATITADTSSNTAYLQL TSLTSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQTSVTSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
346	легкая цепь анти-CEA (Т84.66)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIFGVGFLHWYQ QKPGQPPKLLIYRASNLSEGPVRFSGTGSRTDFTLIIDPV EAD DVATYYCQQTNEPDYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNMFYPREAVQWQVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNREGC

* обозначает заряженные остатки.

11.2.8. Получение двухвалентной нацеленной на CEA (Т84.66) содержащей тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 5.8).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда для 4-1BB (71-254), разделенных (G4S)₂-линкерами, сливали с С-концом Fc-цепи с "впадиной" человеческого IgG1, согласно схеме, представленной на фиг. 29В: Fc-цепь с "впадиной" человеческого IgG1, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB. Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для 4-1BB (71-254) и слитый с С-концом Fc-цепи с "выступом" человеческого IgG1, получали согласно схеме, представленной на фиг. 29Г: Fc-цепь с "выступом" человеческого IgG1, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для 4-1BB.

Последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для CEA, клон Т84.66, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", с "выступом", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами согласно методу, описанному в WO 2012/130831. Комбинация: анти-CEA huIgG1, содержащая димерный лиганд цепь с "впадиной" с мутациями Y349C/T366S/L368A/Y407V, анти-CEA huIgG1, содержащая димерный лиганд цепь с "выступом" с мутациями S354C/T366W, и легкая цепь анти-CEA, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для 4-1BB и два CEA-связывающих Fab. Конструкция 5.8 соответствует конструкции 5.3, представленной на фиг. 40.

В табл. 89 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на CEA (Т84.66) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы (конструкция 5.8).

Таблица 89. кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной нацеленной на СЕА (Т84.66) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1ВВ (71-254) в слиянии с Fc (kih) PGLALA молекулы (конструкция 5.8)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
347	нуклеотидная последовательность конструкции анти-СЕА (Т84.66)-Fc-цепь с «впадиной»-димерный 4-1ВВL (71-254)	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACTGGTGGAACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGTACCGCCAGCGGCTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTCAAGCAGCGGCCTGAGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCGACC CCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGG GCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCAGCAGCAACACAG CCTACCTGCAGCTGACCAGCCTGACCTCCGAGGACACCGC CGTGTA TACTACTGCGCCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGAC TACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACC GTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCC TGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGCACAGCCG CTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT

		GACCGTGTCTTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATA GCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGG CAGCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGC GACAAAACTCACACATGCCCCACCGTGCCAGCACCTGAA GCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTC TCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGA GAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGC TGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGC GATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGCCAAGG CCGGCGTGTAACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAG AGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCC CTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAG CTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGA GGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTG CACCTGTCTGCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACA CAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGG GCGCTACAGTGCTGGGCTGTTTACAGAGTGACCCCCAGAT TCCAGCCGGCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGG CGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAAGT GTCCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAG GGAATGTTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGA TTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGC AGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGA TACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTAT GTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGGGG AGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCC ACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACT GTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGC GCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCG GACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAG CCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCT GGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG CCAAGCCCTAGATCAGAA
348	нуклеотидная последовательность конструкции анти-СЕА (Т84 66)-Fc-цепь с	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAAGTGGTGAA CCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGTACCGCCAGCGGCT TCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTCAAGCAGC GGCCTGAGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCGACC CCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCCAAGTTCAGG

	«выступом»- мономерный 4- IBBL (72-254)	GCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCAGCAGCAACACAG CCTACCTGCAGCTGACCAGCCTGACCTCCGAGGACACCGC CGTGTAATACTGCGCCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGAC TACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACC GTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC TGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTG ACAAAATCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGC TGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCC AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGCTCAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTG GTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAATACTACAAG ACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTAATCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTTACGTGACGCGTGTATGCACGAGGCCCT GCACAACTACACCCAGAAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCC GGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGA GGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGTGGACTGTG GACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGA ACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGA TCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCTGAGC TACAAAGAGGACACCAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCC GGCGTGTACTACGTGTTCTTTTACGTGGAAGTGGGAGAG TGGTGGCCGCGGAAGGATCTGGCTCTGTGCTCTGCGCCCT GCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCT CTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGG CCCAGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCA CCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACA GAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGC GCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAAGTGACCCCCGAGATTC CAGCCGCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
344	нуклеотидная последовательнос ть анти-CEA (T84.66), легкая цепь	см. таблицу 88
349		EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRP EQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATITADTSSNTAYLQL TSLTSEDVAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQTSVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

		KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG GSGGGGSRGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVGLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGGSGGGGSRGP ELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVVFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLGL FRVTPEIPAGLPSRSE
350	анти-СЕА (Т84.66)-Fc-цепь с «выступом»- мономерный 4- 1BB (71-254)	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRP EQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATITADTSNTAYLQL TSLTSEDTA VYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQTSVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG GSGGGGSRGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVGLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
346	анти-СЕА (Т84.66), легкая цепь	см. таблицу 88

11.3. Получение "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc молекул и человеческого IgG в качестве контрольных молекул.

11.3.1. Получение "ненацеленных" содержащих тримерный человеческий лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул (контрольные молекулы).

Указанные контрольные молекулы получали согласно методу, описанному выше для нацеленной на СЕА конструкции 5.1 (обозначена как контроль Б), 5.3 (обозначена как контроль В), 3.4 (обозначена как контроль Г) и 3.5 (обозначена как контроль Д), с единственным различием, состоящем в том, что анти-СЕА-связывающий агент (VH-VL) заменяли на представляющий собой зародышевую линию контроль, обозначенный DP47, который не связывается с антигеном (см. фиг. 40). кДНК и аминокислотные последовательности контроля Б, представляющего собой одновалентную "ненацеленную" (DP47) содержащую разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) молекулу со "скрещенными" СН-CL с заряженными остатками, представлены выше в табл. 68 (см. пример 7.3.1). В табл. 69 представлены кДНК и аминокислотные последовательности двухвалентной "ненацеленной" (DP47) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) молекулы, представляющей собой контроль В. В табл. 70 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной "ненацеленной" (DP47) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) молекулы с СН-CL-кроссовером с заряженными остатками, представляющей собой контроль Г. В табл. 71 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной "ненацеленной" (DP47) содержащей разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) молекулы без заряженных остатков в СН-CL-кроссовером, представляющей собой контроль Д.

11.3.2. Антитела в качестве контрольных молекул.

Дополнительным контролем, применяемым в анализах, который был обозначен как контроль Е, являлся "ненацеленный" (DP47) контроль зародышевой линии, который представлял собой человеческий IgG1, содержащий мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами. кДНК и аминокислотные последовательности контроля Е представлены выше в табл. 73.

11.4. Получение нацеленных на СЕА содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул и соответствующих контрольных молекул.

Кодирующие последовательности нацеленных и "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) антигенсвязывающих молекул клонировали в плазмидном векторе, в котором экспрессия вставки контролируется промотором MPSV и который содержит синтетическую полиА-последовательность, локализованную на 3'-конце CDS. Кроме того, вектор содержал последовательность OriP EBV для поддержки эписомальной формы плазмиды.

Содержащую разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc(kih) молекулу получали путем совместной трансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессионными векторами для клеток млекопитающих.

тающих с использованием полиэтиленимина. Клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами. Для вариантов 1, 2, 4, 5 и их контролей Б, Г и Д применяли соотношение 1:1:1:1 ("вектор для конструкции димерный лиганд-CL-цепь с "выступом": "вектор для слияния мономерный лиганд-CH1": "вектор для анти-СЕА Fab с цепью с "впадиной": "вектор для легкой цепи анти-СЕА"). Для вариантов 3, 6 и соответствующего контроля В применяли соотношение 1:1:1 ("вектор для цепи hulgG1 Fc с "впадиной"-димерный лиганд": "вектор для цепи hulgG1 Fc с "выступом"- мономерный лиганд": "вектор для легкой цепи анти-СЕА"). Человеческие IgG, применяемые в качестве контролей в этом анализе, получали методом, применяемым для биспецифической конструкции (для трансфекции применяли только вектор для легкой цепи и вектор для тяжелой цепи в соотношении 1:1).

Для производства в 500-миллилитровые встряхиваемые колбы засевали 300 млн клеток НЕК293 EBNA за 24 ч до трансфекции. Для трансфекции клетки центрифугировали в течение 10 мин при 210×g и супернатант заменяли 20 мл предварительно нагретой среды CD CHO. Экспрессионные векторы (200 мкг общей ДНК) смешивали в 20 мл среды CD CHO. После добавления 540 мкл ПЭИ раствор интенсивно перемешивали в течение 15 с и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки смешивали с раствором ДНК/ПЭИ, переносили в 500-миллилитровую встряхиваемую колбу и инкубировали в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂. После инкубации добавляли 160 мл среды Excell, дополненной 6 мМ L-глутамином, 5 г/л соевого пептида (PEPSOY) и 1,2 мМ вальпроевой кислотой, и клетки культивировали в течение 24 ч. Через 1 день после трансфекции добавляли 12% Feed (аминокислота и глюкоза). После культивирования в течение 7 дней супернатант собирали центрифугированием в течение 30–40 мин по меньшей мере при 400×g. Раствор стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм-фильтр), дополняли азидом натрия до конечной концентрации 0,01% (мас./об.) и выдерживали при 4°C.

Содержащую разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекулу, а также IgG, очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии с использованием белка А с последующей гель-фильтрацией. Для осуществления аффинной хроматографии супернатант вносили в колонку MabSelect Sure (CV = 5–15 мл, смола фирмы GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим фосфат натрия (20 мМ), цитрат натрия (20 мМ) (pH 7,5). Несвязанный белок удаляли путем промывки таким же буфером, используя его в объеме, кратном по меньшей мере 6 об. колонки. Связанный белок элюировали, используя или линейный градиент (20 CV), или ступенчатую элюцию (8 CV), буфером, содержащим 20 мМ цитрат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин (pH 3,0). При осуществлении элюции с использованием линейного градиента осуществляли дополнительную ступенчатую элюцию с применением объема, кратного 4 об. колонки.

Значение pH собранных фракций регулировали, добавляя 1/10 (об./об.) 0,5М фосфата натрия, pH 8,0. Белок концентрировали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную раствором, содержащим 20 мМ гистидин, 140 мМ хлорид натрия, 0,01 об.% Твин20, pH 6,0.

Концентрацию белка определяли путем измерения оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу нацеленной содержащей тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя (5 мМ 1,4-дителиотреитол) и без него и осуществляли окрашивание кумасси SimpleBlue™ SafeStain, (фирма Invitrogen, США), или анализировали с помощью КЭ-ДСН, используя устройство LabChipGXII (фирма (Perkin Elmer). Содержание агрегатов в образцах антигел анализировали с помощью колонки для аналитической гель-фильтрации TSKgel G3000 SW XL (фирма Tosoh), уравновешенной подвижным буфером, содержащим 25 мМ K₂HPO₄, 125 мМ NaCl, 200 мМ моногидрохлорид L-аргинина, 0,02% (мас./об.) NaN₃, pH 6,7, при 25°C.

В табл. 90 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономеров нацеленных на СЕА содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул.

Таблица 90. Результаты биохимического анализа нацеленных на СЕА содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекул

Конструкция	Мономер [%] (SEC)	Выход [мг/л]
одновалентная нацеленная на СЕА (T84.66-LCHN) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc молекула с CH-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 5.4)	98	1,4
двухвалентная нацеленная на СЕА (T84.66-LCHN) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc молекула (конструкция 5.6)	98	0,4
одновалентная нацеленная на СЕА (T84.66) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc молекула с CH-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 5.7)	97	15
двухвалентная нацеленная на СЕА (T84.66) содержащая разделенный тримерный лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc молекула (конструкция 5.8)	96	2

В табл. 91 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономеров "ненацеленных" (DP47) содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекул, как одновалентных (контроль Б, Г и Д), так и двухвалентных (контроль В), и человеческого IgG1PGLALA зародышевой линии DP47 (контроль Е).

Таблица 91. Результаты биохимического анализа "ненацеленных" (DP47) содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) молекул

Конструкция	мономер [%] (SEC)	Выход [мг/л]
одновалентная «ненацеленная» (DP47) содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) молекула (контроль Б)	99	15,4
двухвалентная «ненацеленная» (DP47) содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB (71-254) в слиянии с Fc (kih) молекула (контроль В)	98	12,6
одновалентная «ненацеленная» (DP47) содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) молекула (контроль Г)	99.5	25,9
одновалентная «ненацеленная» (DP47) содержащая разделенный тримерный человеческий лиганд для 4-1BB (71-248) в слиянии с Fc (kih) молекула (контроль Д)	93.3	4,1
человеческий IgG1 PGLALA зародышевой линии DP47	100	50

Пример 12.

Функциональная характеристика нацеленных на CEA содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

12.1. Поверхностный плазмонный резонанс (одновременное связывание).

Получение huNA3B3A2 в качестве антигена нацеленных на CEA содержащих тримерный разделенный 4-1BBL конструкций.

Антиген, применяемый для анализа связывания с CEA методом SPR, представлял собой гибридную молекулу, состоящую из доменов A3 и B3 человеческого CEACAM5 (CEA) и доменов N и A2 человеческого CEACAM1 (BGP1), аналогичную описанной для NABA (Durbin H. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(10), 10 мая 1994, сс. 4313-4317). Антиген обозначали как NA3B3A2 и его схематическое изображение представлено на фиг. 41.

В табл. 92 представлены нуклеотидная и аминокислотная последовательности huNA3B3A2-avi-His.

Таблица 92. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности huNA3B3A2-avi-His

SEQ ID NO:	Антиген	Последовательность
351	нуклеотидная последовательность huNA3B3A2-avi His	CAGCTGACCACCGAGTCCATGCCCTTCAACGTGGCCGA GGGCAAAGAGGTGCTGCTGCTGGTCCACAACCTGCCCC AGCAGCTGTTTCGGCTACAGCTGGTACAAGGCGAGCGG GTGGACGGCAACCGGCAGATCGTGGGCTACGCCATCGG CACCCAGCAGGCCACACCCGGCCCTGCCAATAGCGGCA GAGAGACAATCTACCCCAACGCCAGCCTGCTGATCCAG AACGTGACCCAGAACGACACCGGCTTCTACACACTCCA AGTCATCAAGAGCGACCTGGTCAACGAGGAAGCCACCG GCCAGTTCCACGTGTACCCCGAGCTGCCCAAGCCCAAGC ATCAGCAGCAACAACAGCAAGCCCGTGGAAGATAAGGA CGCCGTGGCCTTTACCTGCGAGCCCGAGGCCCAGAACA CCACCTACCTGTGGTGGGTCAACGGCCAGAGCCTGCC GTGTCCCCCAGACTCCAGCTGAGCAACGGCAACAGAAC CCTGACCCCTGTTCAACGTGACCCGGAATGACGCCAGAG CCTACGTGTGCGGCATCCAGAACAGCGTGTCCGCCAAC CGCAGCGACCCCGTGACCCTGGATGTGCTGTACGGCCC CGACACCCCATCATCAGCCCCCTGACAGCAGCTACCT GAGCGGCGCCAACCTGAACCTGAGCTGCCACAGCGCCA GCAACCCCAAGCCCTCAGTACAGCTGGCGGATCAACGGC ATCCCCCAGCAGCACACCCAGGTGCTGTTATCGCCAAG ATCACCCCAACAACAACAGGCACCTACGCCTGCTTCGTG TCCAACCTGGCCACCGGCCGAACAACAGCATCGTGAA GTCCATCACCGTGTCCGCCTCCCTGAGCCCCGTGGTGGC CAAGCCTCAGATCAAGGCCAGCAAGACCACCGTGACCG GCGACAAGGACAGCGTGAACCTGACCTGCTCCACCAAC GATACCGGCATCAGCATCCGGTGGTTCTTCAAGAATCA GTCCCTGCCCAGCAGCGAGCGGATGAAGCTGAGCCAGG

		GCAACATCACCCCTGTCCATCAACCCCGTGAAGAGAG GACGCCGGCACCTATTGGTGCGAGGTGTTCAACCCCATC AGCAAGAACCAGAGCGACCCCATCATGCTGAACGTGAA CTACAACGCCCTGCCCCAAGAAAACCTGATCAATGTTG ATCTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCAGGCAGCGGCCTG AACGACATCTTCGAAGCCCAGAAAATCGAGTGGCACGA GGCCAGAGCCCACCACCACCATCACCAC
352	человеческий NA3B3A2- avi-His	QLTTESMPFNVAEGKEVLLL VHNLPQQLFGYSWYKGERV DGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVQ NDTGFTLQVIKSDLVNEEATGQFHVPELPKPSISSNNSK PVEDKDAVFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSRLQLS NGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVLTVL YGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGI PQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSIT VSASLSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGISI RWFFKNQSLPSSERMKLSQGNITLSINPVKREDAGTYWCE VFNPISKNQSDPIMLVNPNALPQENLINVLDLEVLFGPGGS GLNDIFEAQKIEWHEARAHNNNNH

Получение белков осуществляли согласно методу, описанному выше для получения слитого с Fc белка (пример 7.1.1). Секретируемые белки очищали из супернатантов клеточных культур с помощью хелатирующей хроматографии с последующей гель-фильтрацией. Первую хроматографическую стадию осуществляли с использованием картриджа NiNTA Superflow (5 мл, фирма Qiagen), уравновешенного в буфере, содержащем 20 мМ фосфат натрия, 500 нМ хлорид натрия, pH 7,4. Элюцию осуществляли, применяя в объеме, кратном более 12 об. колонки, градиент от 5 до 45% буфера для элюции (20 мМ фосфат натрия, 500 нМ хлорид натрия, 500 мМ имидазол, pH 7,4).

Белок концентрировали и фильтровали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 75 (фирма GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим 20 мМ гистидин, 140 мМ NaCl, 0,01% Твин-20, pH 6,0. В табл. 93 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономера белка человеческого NA3B3A2-avi-His.

Таблица 93. Биохимический анализ человеческого NA3B3A2-avi-His

Конструкция	Мономер [%] (SEC)	Выход [мг/л]
человеческий NA3B3A2-avi-His	88	14,1

Способность одновременно связываться с конструкцией человеческого 4-1BB-Fc (kih) и человеческим NA3B3A2 оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Все эксперименты на основе SPR осуществляли с помощью устройства Biacore T100 при 25°C с использованием HBS-EP в качестве подвижного буфера (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% сурфактанта P20, фирма Biacore, Фрейбург/Германия). Биотинилированную конструкцию человеческого 4-1BB-Fc(kih) непосредственно связывали с проточной ячейкой стрептивидинового (SA) сенсорного чипа. Применяли уровни иммобилизации, соответствующие вплоть до 250 RU (резонансные единицы).

Нацеленные на CEA содержащие тримерный разделенный 4-1BBL конструкции (конструкции 5.4, 5.6, 5.7 и 5.8) пропускали в концентрации 200 нМ со скоростью потока 30 мкл/мин через проточные ячейки в течение 90 с и время фазы диссоциации устанавливали на 0 с. Человеческий NA3B3A2 пропускали в качестве второго аналита со скоростью потока 30 мкл/мин через проточные ячейки в течение 90 с в концентрации 500 нМ (фиг. 41Б). Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение 120 с. Различия всех показателей преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного в проточной референс-ячейке, в которой не иммобилизовали белок.

Как продемонстрировано на графиках на фиг. 42, все биспецифические конструкции обладали способностью одновременно связываться с человеческим 4-1BB и человеческим NA3B3A2.

12.2. Связывание нацеленных на CEA содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающих молекул на активированных человеческих PMBC.

Для определения связывания содержащих тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул с человеческими PMBC применяли в различных полученных титровании концентрациях нацеленных на CEA содержащих тримерный 4-1BBL в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы в анализе, описанном в примере 5.2.

На фиг. 43 представлены данные о связывании конструкций 5.4, 5.6, 5.7 и 5.8, полученных согласно методу, описанному в примере 11, на активированных 4-1BB-экспрессирующих CD4⁺-Т-клетках и CD8⁺-Т-клетках соответственно. Дискриминационные окна устанавливали на живые CD45⁺CD3⁺CD4⁺- или CD45⁺CD3⁺CD8⁺-Т-клетки и строили график зависимости MFI для конъюгированного с PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического AffiniPure от полученных титрованием концентраций нацеленных содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc вариантов. В табл. 94 представлены полученные величины EC₅₀, определенные для конструкций 5.4, 5.6, 5.7 и 5.8 и контрольных молекул.

Таблица 94. Связывание на активированных экспрессирующих 4-1BB CD4⁺-Т-клетках и CD8⁺-Т-клетках

Конструкция	EC ₅₀ [нМ] 4-1BB ⁺ CD8 ⁺	EC ₅₀ [нМ] 4-1BB ⁺ CD4 ⁺
контроль Б	0,05	0,26
контроль В	0,02	0,30
контроль Г	0,04	0,28
контроль Д	0,13	1,22
5.4	0,13	0,35
5.6	0,06	0,34
5.7	0,0004	0,36
5.8	0,17	0,38

12.2. Связывание с экспрессирующими CEA опухолевыми клетками.

Для анализов связывания на экспрессирующих CEA опухолевых клетках применяли следующие линии экспрессирующих человеческий CEA клеток лимфомы: экспрессирующие CEA опухолевые клетки человеческого рака желудка линии MKN-45 (ATCC TCP-1008) и клетки человеческой колоректальной аденокарциномы линии LS180 (ATCC CL-187). Анализы осуществляли согласно методу, описанному в примере 5.3 для экспрессирующих FAP опухолевых клеток линий MV-3 и WM-266-4.

Дискриминационные окна устанавливали на живые опухолевые клетки и строили график зависимости MFI для конъюгированного с PE F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфического AffiniPure от полученных титрованием концентраций нацеленных содержащих разделенный тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc конструкций.

На фиг. 44 представлены данные о связывании конструкции 5.7, полученной согласно методу, описанному в примере 11.2.7, с экспрессирующими человеческий CEA клетками человеческого рака желудка линии MKN-45 (слева) и клетками человеческой колоректальной аденокарциномы линии LS180 (справа). В табл. 95 представлены полученные величины EC₅₀, определенные для экспрессирующих человеческий CEA клеток человеческого рака желудка линии MKN-45.

Таблица 95. Связывание с экспрессирующими CEA опухолевыми клетками

Конструкция	EC ₅₀ [нМ] MKN45-8	EC ₅₀ [нМ] LS180
5.7	11,6	14,4

Пример 13.

Биологическая активность нацеленных на CEA содержащих тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

13.1. Активация NF-κB в клетках HeLa, экспрессирующих человеческий 4-1BB.

Клетки HeLa, экспрессирующие человеческий 4-1BB и NF-κB-люциферазу, создавали согласно методу, описанному в примере 6.1.

Активация NF-κB в клетках HeLa, экспрессирующих человеческий 4-1BB, при совместном культивировании с экспрессирующими CEA опухолевыми клетками.

Клетки HeLa, экспрессирующие NF-κB-люциферазу и человеческий 4-1BB, собирали и ресуспендировали в среде DMEM, дополненной 10 об.% FBS и 1 об.% GlutaMAX-I, до концентрации 0,2×10⁶ клеток/мл. 100 мкл (2×10⁴ клеток) указанной клеточной суспензии переносили в каждую лунку стерильного белого плоскодонного 96-луночного планшета для культуры ткани с крышкой (фирма Greiner bio-one, каталожный № 655083) и планшет инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день добавляли 50 мкл среды, содержащей в полученных титровании концентрациях нацеленные на CEA содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (CEA разделенный тример 4-1BBL) или "ненацеленные" (DP47) содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (DP47 разделенный тример 4-1BBL). Экспрессирующие CEA опухолевые клетки человеческого рака желудка линии MKN-45 (ATCC TCP-1008) ресуспендировали в среде DMEM, дополненной 10 об.% FBS и 1 об.% GlutaMAX-I, до концентрации 2×10⁶ клеток/мл.

Суспензию экспрессирующих CEA клеток В-клеточной лимфомы (50 мкл, конечное соотношение 1:5) или только среду добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение 6 ч при 37°C и 5% CO₂. Клетки промывали два раза 200 мкл/лунку D-3ФР. Добавляли в каждую лунку 40 мкл свежеприготовленного репортерного буфера для лизиса (фирма Promega, каталожный № E3971) и планшет выдерживали в течение ночи при -20°C. На следующий день планшеты с замороженными клетками и идентифицирующий буфер (система для анализа люциферазы 1000, фирма Promega, каталожный № E4550) подвергали оттаиванию при комнатной температуре. Добавляли 100 мкл идентифицирующего буфера в каждую лунку и максимально быстро измеряли люциферазную активность с использованием ридера для микропланшетов SpectraMax M5/M5e и программы SoftMax Pro (фирма Molecular Devices), подсчитывая испускание света в URL (единицы испускаемого света в течение 0,5 с/лунку), или планшет-ридера для считывания нескольких меток Victor3 1420 (фирма Perkin Elmer) и программы Perkin Elmer 2030

Manager, определяя испускание света в виде импульсов в секунду (CPS), и строили график зависимости от концентрации тестируемых конструкций.

Нацеленные на СЕА содержащие тримерный лиганд для 4-1BB в слиянии с Fc антигенсвязывающие молекулы (конструкции 5.7 и 5.8) инициировали активацию пути передачи сигналов NFκB в репортерной клеточной линии в присутствии клеток человеческого рака желудка линии MKN-45. В противоположность этому, "ненацеленные" контрольные молекулы не инициировали такое же действие при применении в любых тестируемых концентрациях (фиг. 45). В табл. 96 представлены соответствующие величины EC₅₀.

Таблица 96. Связывание с экспрессирующими СЕА опухолевыми клетками

Конструкция	EC ₅₀ [нМ]	EC ₅₀ [нМ]
	Без опухолевых клеток MKN-45	MKN45
5.4	3,1	0,34
5.6	2,05	0,21
5.7	0,85	0,05
5.8	1,52	0,45

Пример 14.

14.1. Получение нацеленных на FAP содержащих тримерный лиганд для OX40 в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

Последовательность ДНК, кодирующую часть эктодомена (аминокислоты 51-183) человеческого лиганда для OX40 синтезировали в соответствии с последовательностью P23510 из базы данных Uniprot. Для снижения гетерогенности человеческого лиганда для OX40, обусловленной гликозилированием, остатки аспарагина в положениях 90 и 114 заменяли посредством мутации на аспарагиновую кислоту с помощью сайтнаправленного мутагенеза (согласно Compaan D.M., Hymowitz S.G., Structure 14(8), 2006, сс. 1321-1330).

Полипептид, содержащий два эктодомена лиганда OX40, разделенные (G4S)₂-линкерами и слитые с человеческим IgG1-CL-доменом, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 46А: человеческий лиганд для OX40, (G4S)₂-коннектор, человеческий лиганд для OX40, (G4S)₂-коннектор, человеческий CL.

Полипептид, содержащий один эктодомен лиганда для OX40 и слитый с человеческим IgG1-CH-доменом, клонировали согласно схеме, представленной на фиг. 46Б: человеческий лиганд для OX40, (G4S)₂-коннектор, человеческий CH.

Для улучшения правильного спаривания интродуцировали указанные ниже мутации в "скрещенные" CH-CL. В димерный лиганд для OX40, слитый с человеческим CL, - мутации E123R и Q124K. В мономерный лиганд для OX40, слитый с человеческим CH1, - мутации K147E и K213E.

Создание и получение FAP-связывающих агентов описано в WO 2012/020006 A2, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Последовательности ДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей связывающего агента, специфического для FAP, клон 28H11, субклонировали в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью с "впадиной", либо с константной легкой цепью человеческого IgG1. Интродуцировали мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala в константную область тяжелых цепей с "выступом" и "впадиной" для элиминации связывания с Fc-гамма-рецепторами согласно методу, описанному в WO 2012/130831.

Комбинация: димерный лиганд-Fc-цепь с "выступом", содержащая мутации S354C/T366W, мономерное CH1-слияние, нацеленный анти-FAP-Fc-цепь с "впадиной", содержащая мутации Y349C/T366S/L368A/Y407V, и легкая цепь анти-FAP, позволяла создавать гетеродимер, который включал собранный тримерный лиганд для OX40 и FAP-связывающий Fab (фиг. 46В, конструкция 6.1).

В табл. 97 представлены кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на FAP (28H1) содержащей разделенный тримерный лиганд для OX40 (51-183) в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы со "скрещенными" CH-CL и заряженными остатками (конструкция 6.1).

Таблица 97. кДНК и аминокислотные последовательности одновалентной нацеленной на АР (28Н1) содержащей разделенный тримерный лиганд для ОХ40 в слиянии с Fc (kih) молекулы с СН-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 6.1)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
353	нуклеотидная последовательность конструкции димерный hu ОХ40L (51-183) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	CAGGTGTCCACAGATACCCAGAAATCCAGAGCATCAAG GTGCAGTTCACCGAGTACAAGAAAGAGAAGGGCTTCATC CTGACCAGCCAGAAAGAGGACGAGATCATGAAGGTGCAG GACAACAGCGTGATCATCAACTGCGACGGCTTCTACCTGA TCAGCCTGAAGGGCTACTTCAGCCAGGAAGTGGACATCA GCCTGCACTACCAGAAGGACGAGGAACCCCTGTTCCAGCT GAAGAAAGTGCGGAGCGTGAACAGCCTGATGGTGGCCAG CCTGACCTACAAGGACAAGGTGTACCTGAACGTGACCACC GACAACACCAGCCTGGACGACTTCCACGTGAACGGCGGC GAGCTGATCCTGATTCACCAGAACCCCGGCGAGTTCTGCG TGCTGGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGATCTCAGG TGTCACACCGCTACCCCGGATTACGTCCATTAAGGTGCA GTTTACAGAGTATAAGAAAGAAAAAGGCTTTATTCTGACT TCCCAGAAAGAAGATGAGATTATGAAGGTGCAGGATAAT TCTGTGATCATCAATTGTGACGGCTTCTACCTGATCAGCCT GAAGGGCTACTTCAGCCAGGAAGTGGACATCAGCCTGCA CTACCAGAAGGACGAGGAACCCCTGTTCCAGCTGAAGAA AGTGCGGAGCGTGAACAGCCTGATGGTGGCCAGCCTGAC CTACAAGGACAAGGTGTACCTGAACGTGACCACCGACAA CACCAGCCTGGACGACTTCCACGTGAACGGCGGCGAGCT GATCCTGATCCACCAGAACCCTGGCGAGTTCTGCGTGCTG GGAGGCGGAGGCTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTG GCTGCACCATCTGTCTTTATCTTCCCACCCAGCGACCGGA AGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGTCGTGTGCTGTGAA TAACTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTG ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC AAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACA

		AGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAAGCCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACACAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
354	нуклеотидная последовательность конструкции мономерный hu OX40L (51-183) – CH1*	CAGGTGTCCACAGATACCCCAGAATCCAGAGCATCAAGGTGCAGTTCACCGAGTACAAGAAAGAGAAGGGCTTCATCTGACCAGCCAGAAAGAGGACGAGATCATGAAGGTGCAGACAACAGCGTGATCATCAACTGCGACGGCTTCTACTGATCAGCCTGAAGGGCTACTTCAGCCAGGAAGTGGACATCAGCCTGCACTACCAGAAGGACGAGGAACCCCTGTTCAGCTGAAGAAAGTGCGGAGCGTGAACAGCCTGATGGTGGCCAGCCTGACCTACAAGGACAAGGTGTACCTGAACGTGACCACGACAACACCAGCCTGGACGACTTCCACGTGAACGGCGGCGAGCTGATCCTGATTACACAGAACCCCGGCGAGTTCTGCTGCTGGGAGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAGCACAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGC
68	нуклеотидная последовательность анти-FAP (28H1), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 2
69	нуклеотидная последовательность легкой цепи анти-FAP (28H1)	См. таблицу 2
355	димерный hu OX40L (51-183) – CL*-Fc-цепь с «выступом»	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQDNSVIINCDGFYLISLKGYSQEVDISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVLGGGSGGGGSQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQDNSVIINCDGFYLISLKGYSQEVDISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVLGGGSGGGGSRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP
		KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
356	мономерный hu OX40L (51-183) – CH1*	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQDNSVIINCDGFYLISLKGYSQEVDISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVLGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
18	анти-FAP (28H1), Fc-цепь с «впадиной»	См. таблицу 2
19	легкая цепь анти-FAP (28H1)	См. таблицу 2

* обозначает заряженные остатки.

14.2. Получение "ненацеленного" человеческого IgG1 в качестве контроля Е.

Контрольная молекула, применяемая в этих анализах, обозначенная как контроль Е (фиг. 46Г), представляла собой "ненацеленную" молекулу (DP47, контроль зародышевой линии) человеческого IgG1, содержащую мутации Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala для элиминации связывания с Fc-γ-рецепторами согласно методу, описанному в публикации Международной заявки на патент WO 2012/130831. Ее получение описано в пример 2.3, в табл. 29 представлены кДНК и аминокислотные последовательности "ненацеленного" (DP47) huIgG1 PGLALA (контроль Е).

14.3. Получение нацеленных на FAP содержащих разделенный тримерный лиганд для OX40 в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул и соответствующих контрольных молекул.

Кодирующие последовательности нацеленных и "ненацеленных" содержащих разделенный тримерный лиганд для OX40 в слиянии с Fc (kih) молекул клонировали в плазмидном векторе, в котором экспрессия вставки контролируется промотором MPSV и который содержит синтетическую полиА-последовательность, локализованную на 3'-конце CDS. Кроме того, вектор содержал последовательность OriP EBV для поддержания эписомальной формы плазмиды.

Содержащую разделенный тримерный лиганд для OX40 в слиянии с Fc(kih) молекулу получали путем совместной трансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессионными векторами для клеток млекопитающих с использованием полиэтиленимина. Клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами. Для вариантов 1, 2, 4, 5 и соответствующих контролей Б, Г и Д применяли соотношение 1:1:1:1 ("вектор для конструкции димерный лиганд-CL-цепь с "выступом": "вектор для слияния мономерный лиганд-СН1": "вектор для анти-FAP-Fab с цепью с "впадиной": "вектор для легкой цепи анти-FAP"). Для вариантов 3, 6 и соответствующих контроля В применяли соотношение 1:1:1 ("вектор для цепи huIgG1 Fc с "впадиной"-димерный лиганд": "вектор для цепи huIgG1 Fc с "выступом"-мономерный лиганд": "вектор для легкой цепи анти-FAP"). Человеческие IgG, применяемые в качестве контролей в этом анализе, получали методом, который применяли для биспецифической конструкции (для трансфекции применяли только вектор для легкой цепи и вектор для тяжелой цепи в соотношении 1:1).

Для производства в 500-миллилитровые встряхиваемые колбы засевали 300 млн клеток HEK293 EBNA за 24 ч до трансфекции. Для трансфекции клетки центрифугировали в течение 10 мин при 210×g и супернатант заменяли 20 мл предварительно нагретой среды CD CHO. Экспрессионные векторы (200 мкг общей ДНК) смешивали в 20 мл среды CD CHO. После добавления 540 мкл ПЭИ раствор интенсивно перемешивали в течение 15 с и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки смешивали с раствором ДНК/ПЭИ, переносили в 500-миллилитровую встряхиваемую колбу и инкубировали в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂. После инкубации добавляли 160 мл среды Excell, дополненной 6мМ L-глутамином, 5 г/л соевого пептида (PEPSOY) и 1,2 мМ вальпроевой кислотой, и клетки культивировали в течение 24 ч. Через 1 день после трансфекции добавляли 12% Feed (аминокислота и глюкоза). После культивирования в течение 7 дней супернатант собирали центрифугированием в течение 30-40 мин по меньшей мере при 400×g. Раствор стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм-фильтр), дополняли азидом натрия до конечной концентрации 0,01% (мас./об.) и выдерживали при 4°C.

Содержащую разделенный тримерный лиганд для OX-40 в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающую молекулу, а также IgG, очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии с использованием белка А с последующей гель-фильтрацией. Для осуществления аффинной хроматографии супернатант вносили в колонку MabSelect Sure (CV = 5-15 мл, смола фирмы GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим фосфат натрия (20 мМ), цитрат натрия (20 мМ) (pH 7,5). Несвязанный белок удаляли путем промывки таким же буфером, используя его в объеме, кратном по меньшей мере 6 об. колонки. Связанный белок элюировали, используя или линейный градиент (20 CV), или ступенчатую элюцию (8 CV), буфером, содержащим 20 мМ цитрат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин (pH 3,0). При осуществлении элюции с использованием линейного градиента осуществляли дополнительную ступенчатую элюцию с применением объема, кратного 4 об. колонки.

Значение pH собранных фракций регулировали, добавляя 1/10 (об./об.) 0,5М фосфата натрия, pH 8,0. Белок концентрировали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную раствором, содержащим 20 мМ гистидин, 140 мМ хлорид натрия, 0,01 об.% Твин20, pH 6,0.

Концентрацию белка определяли путем измерения оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу нацеленной содержащей тримерный лиганд для OX40 в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя (5 мМ 1,4-дителиотреитол) и без него и осуществляли окрашивание кумасси SimpleBlue™ SafeStain, (фирма Invitrogen, США), или анализировали с помощью КЭ-ДСН, используя устройство LabChipGXII (фирма (Perkin Elmer). Содержание агрегатов в образцах антител анализировали с помощью колонки для аналитической гель-фильтрации TSKgel G3000 SW XL (фирма Tosoh), уравновешенной подвижным буфером, содержащим 25 мМ K₂HPO₄, 125 мМ NaCl, 200 мМ моногидрохлорид L-аргинина, 0,02% (мас./об.) NaN₃, pH 6,7, при 25°C.

В табл. 98 обобщены данные о выходе и конечном содержании мономеров нацеленной на FAP содержащей разделенный тримерный лиганд для OX40 в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающей молекулы и человеческого IgG1 PGLALA зародышевой линии DP47 (контроль E).

Таблица 98. Результаты биохимического анализа нацеленных на FAP содержащих разделенный тримерный лиганд для OX40 в слиянии с Fc (kih) молекул

Конструкция	Мономер [%] (SEC)	Выход [мг/л]
одновалентная нацеленная на FAP (28H1) содержащая разделенный тримерный лиганд для OX40 в слиянии с Fc молекула с CH-CL-кроссовером с заряженными остатками (конструкция 6.1)	93,8	19,7
человеческий IgG1 PGLALA зародышевой линии DP47	100	50

Пример 15.

Функциональная характеристика нацеленных содержащих тримерный лиганд для OX40 в слиянии с Fc антигенсвязывающих молекул.

15.1. Связывание с экспрессирующими человеческий FAP опухолевыми клетками.

Связывание с находящимся на клеточной поверхности FAP тестировали, используя клетки WM-266-4 (ATCC CRL-1676). $0,5 \times 10^5$ клеток WM-266-4 добавляли в каждую лунку круглодонных 96-луночных планшето для суспензионных клеток (фирма Greiner bio-one, Cellstar, каталожный № 650185). Клетки окрашивали в течение 120 мин при 4°C в темноте в 50 мкл/лунку холодного (4°C) FACS-буфера (D-3ФР (фирма Gibco by Life Technologies, каталожный № 14190 326) с BCA (0,1 об.%, фирма Sigma-Aldrich, каталожный № A9418), содержащего в полученных титровании количествах конструкцию антитела к OX40. После трех промывок избыточным количеством FACS-буфера клетки окрашивали в течение 45 мин при 4°C в темноте в 25 мкл/лунку холодного (4°C) FACS-буфера, содержащего конъюгированный с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) F(ab')₂-фрагмент козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфический AffiniPure (фирма Jackson ImmunoResearch, каталожный № 109 096 098).

И, наконец, содержимое планшетов ресуспендировали, используя по 90 мкл/лунку FACS-буфера, содержащего 0,2 мкг/мл DAPI (фирма Santa Cruz Biotech, каталожный № Sc-3598) и данные получали в этот же день с использованием проточного цитометра с 5 лазерами LSR-Fortessa (фирма BD Bioscience, с программой DIVA).

Как продемонстрировано на фиг. 47А, одновалентная нацеленная на FAP (28H1) содержащая разделенный тримерный лиганд для OX40 в слиянии с Fc (kih) антигенсвязывающая молекула (FAP-OX40L), в отличие от отрицательного контроля E, эффективно связывалась с экспрессирующими человеческий FAP клетками-мишенями. Величина EC₅₀, характеризующая связывание с FAP-позитивными WM-266-4-клетками, составляла 6,9 нМ.

15.2. Связывание с OX40- и FAP-негативными опухолевыми клетками.

Отсутствие связывания с OX40-негативными FAP-негативными опухолевыми клетками тестировали с использованием клеток A549 NucLight™ Red (фирма Essenbioscience, каталожный № 4491), экспрессирующих флуоресцентный белок NucLight Red, окрашивание которым ограничено ядрами, что позволяет осуществлять разделение с немечеными позитивными по человеческому FAP клетками WM266-4. Родительские клетки A549 (ATCC CCL-185) трансдуцировали лентивирусом Essen CellPlayer NucLight Red (фирма Essenbioscience, каталожный № 4476; EF1α, пуromycin) при MOI 3 (ТЕ/клетку) в присутствии 8 мкг/мл полибрена, следуя стандартному протоколу Essen.

Смесь 5×10^4 немеченых клеток WM266-4 и немеченых клеток A549 NucLight™ Red в FACS-буфере добавляли в каждую лунку круглодонных 96-луночных планшето для суспензионных клеток и анализ связывания осуществляли согласно методу, описанному в разделе 15.1.

Как продемонстрировано на фиг. 47Б, конструкция FAP-OX40L не связывалась с OX40-негативными FAP-негативными человеческими опухолевыми клетками.

15.3. Связывание с экспрессирующими человеческий OX40 клетками: наивные и активированные человеческие мононуклеарные лейкоциты периферической крови (PBMC).

Лейкоцитарные пленки получали из центра донорской крови Цюриха. Для выделения свежих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) лейкоцитарные пленки разводили таким же объемом D-3ФР (фирма Gibco by Life Technologies, каталожный № 14190 326). В 50-миллилитровые полипропиленовые пробирки (фирма TPP, каталожный № 91050) вносили 15 мл Histopaque 1077 (фирма SIGMA Life Science, каталожный № 10771, полисахароза (фиколл) и диатризоат натрия, плотность доведена до 1,077 г/мл) и наслаивали раствор разведенной лейкоцитарной пленки на Histopaque 1077. Пробирки центрифугировали в течение 30 мин при 400×g при комнатной температуре с небольшим ускорением без перерыва. Затем PBMC собирали из интерфазы, промывали трижды D-3ФР и ресуспендировали в среде для Т-клеток, состоящей из среды RPMI 1640 (фирма Gibco by Life Technology, каталожный № 42401-042), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, фирма Gibco by Life Technology, каталожный № 16000-044, партия 941273, обработана γ-лучами, свободная от микоплазм и инактивированная тепловой обработкой при 56°C в течение 35 мин), 1 об.% GlutaMAX-I (фирма GIBCO by Life Technologies, ка-

таложный № 35050 038), 1 мМ пируватом натрия (фирма SIGMA, каталожный № S8636), 1 об.% содержащей заменимые аминокислоты среды MEM (фирма SIGMA, каталожный № M7145) и 50 мкМ β-меркаптоэтанолом (фирма SIGMA, M3148).

PBMC использовали непосредственно после выделения (связывание на покоящихся человеческих PBMC) или их стимулировали для индукции сильной экспрессии человеческого OX40 на клеточной поверхности Т-клеток (связывание с активированным PBMC). Для этого наивные PBMC культивировали в течение 4 дней в среде для Т-клеток, дополненной 200 ед./мл пролейкина (фирма Novartis) и 2 мкг/мл PHA-L (фирма SIGMA, L2769), в 6-луночной планшете для культуры ткани и затем в течение ночи в 6-луночных планшетах для культуры ткани, предварительно сенсibilизированных (10 мкг/мл) антителом к человеческому CD3 (клон OKT3, фирма BioLegend, каталожный № 317315) и (2 мкг/мл) антителом к человеческому CD28 (клон CD28.2, фирма BioLegend, каталожный № 302928), в среде для Т-клеток, дополненной 200 ед./мл пролейкина, при 37°C и 5% CO₂.

Для обнаружения OX40 смешивали наивные человеческие PBMC и активированные человеческие PBMC. Для получения возможности отличать наивные PBMC от активированных человеческих PBMC наивные клетки метили перед анализом связывания с помощью красителя для анализа пролиферации клеток eFluor670 (фирма eBioscience, каталожный № 65-0840-85).

Для мечения клетки собирали, промывали предварительно нагретым (37°C) D-3ФР и плотность клеток доводили до 1×10^7 клеток/мл в D-3ФР. Добавляли краситель для оценки пролиферации клеток eFluor670 (фирма eBioscience, каталожный № 65-0840-85) к суспензии наивных человеческих PBMC в конечной концентрации 2,5 мМ и конечной плотности клеток $0,5 \times 10^7$ клеток/мл в D-3ФР. Затем клетки инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Для прекращения реакции мечения добавляли 4 мл инактивированной тепловой обработкой FBS и клетки промывали три раза средой для Т-клеток. Затем в каждую лунку круглодонных 96-луночных планшетов для суспензионных клеток (фирма Greiner bio-one, cellstar, каталожный № 650185) добавляли в соотношении 2:1 1×10^5 смесь покоящихся меченных eFluor670 человеческих PBMC и $0,5 \times 10^5$ немеченных активированных человеческих PBMC.

Клетки окрашивали в течение 120 мин при 4°C в темноте в 50 мкл/лунку холодного (4°C) FACS-буфера, содержащего в полученных титровании количествах конструкции антител к OX40. После трех промывок избыточным количеством FACS-буфера клетки окрашивали в течение 45 мин при 4°C в темноте, используя 25 мкл/лунку холодного (4°C) FACS-буфера, содержащего смесь флуоресцентно меченого антитела к человеческому CD4 (клон RPA-T4, IgG1k мыши, фирма BioLegend, каталожный № 300532), антитела к человеческому CD8 (клон RPA-T8, IgG1k мыши, фирма BioLegend, каталожный № 3010441) и конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) F(ab')₂-фрагмента козьего IgG против человеческого IgG, Fcy-специфического AffiniPure (фирма Jackson ImmunoResearch, каталожный № 109 096 098).

И, наконец, содержимое планшетов ресуспендировали, используя по 90 мкл/лунку FACS-буфера, содержащего 0,2 мкг/мл DAPI (фирма Santa Cruz Biotec, каталожный № Sc-3598) и данные получали в этот же день с использованием проточного цитометра с 5 лазерами LSR-Fortessa (фирма BD Bioscience, с программой DIVA).

Как продемонстрировано на фиг. 48А и 48Б, конструкция FAP-OX40L не связывалась с покоящимися человеческими CD4⁺-Т-клетками или CD8⁺-Т-клетками, негативными по OX40. В противоположность этому, конструкция FAP-OX40L связывалась с активированными CD8⁺- или CD4⁺-Т-клетками, которые экспрессировали OX40. Связывание с CD4⁺-Т-клетками оказалось существенно более сильным по сравнению с CD8⁺-Т-клетками. Активированные человеческие CD8⁺-Т-клетки могли экспрессировать только часть от уровней OX40, обнаруженных на активированных CD4⁺-Т-клетках. Уровни экспрессии OX40 зависели от кинетических особенностей и силы стимуляции и при создании изобретения условия оптимизировали для экспрессии OX40 на CD4⁺-Т-клетках, но не на CD8⁺-Т-клетках. Таким образом, на CD8-Т-клетках индуцировалась лишь незначительная экспрессия OX40. Величина EC₅₀, характеризующая связывание с OX40-позитивными CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками, составляла 0,15 нМ.

15.4. Активация NFκB в HeLa-клетках, экспрессирующих человеческий OX40 и репортерный ген NFκB-люциферазы.

Агонистическое связывание OX40 с его лигандом индуцирует передачу сигналов в прямом направлении посредством активации ядерного фактора каппа В (NFκB) (A.D. Weinberg и др., J. Leukoc. Biol. 75(6), 2004, сс. 962-972). Рекомбинантную репортерную линию клеток HeLa_hOx40_NFκB_Luc1 создавали для экспрессии человеческого OX40 на их поверхности. Она несла также репортерную плазмиду, содержащую ген люциферазы под контролем чувствительного к NFκB энхансерного сегмента. Стимуляция OX40 индуцирует зависящую от дозы активацию NFκB, который транслируется в ядро, в котором он связывается с чувствительным к NFκB энхансером репортерной плазмиды, повышая экспрессию белка люциферазы. Люцифераза катализирует окисление люциферина, что приводит к образованию оксилуциферина, испускающего свет. Это можно оценивать количественно с помощью люминометра. Таким образом, анализировали способность различных анти-OX40 молекул индуцировать активацию NFκB в репортерных клетках HeLa_hOx40_NFκB_Luc1 в качестве меры биологической активности.

Прикрепленные клетки HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 собирали, используя буфер для диссоциации клеток (фирма Invitrogen, каталожный № 13151-014), в течение 10 мин при 37°C. Клетки однократно промывали D-3ФР и плотность клеток доводили до $1,33 \times 10^5$ в среде для анализа, содержащей MEM (фирма Invitrogen, каталожный № 22561-021), 10 об.% инактивированной тепловой обработкой FBS, 1 мМ пируват натрия и 1 об.% заменимых аминокислот. Клетки высевали с плотностью $0,2 \times 10^5$ клеток на лунку в стерильный белый плоскодонный 96-луночный планшет для культуры ткани с крышкой (фирма Greiner bio-one, каталожный № 655083) и выдерживали в течение ночи при 37°C в инкубаторе (Hera Cell 150) в атмосфере с 5% CO₂.

На следующий день HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 стимулировали в течение 5 ч, добавляя среду для анализа, содержащую в полученных титровании количествах FAP-Ox40L или отрицательный контроль E. Для тестирования воздействия перекрестной гипер-сшивки антител к Ox40 добавляли 25 мкл/лунку среды, содержащей в качестве вторичного антитела F(ab')₂-фрагмент козьего IgG против человеческого IgG, Fcγ-специфический (фирма Jackson ImmunoResearch, каталожный № 109 096 098) в соотношении 1:2 (2-кратное превышение количества вторичного антитела относительно первичного антитела). После инкубации супернатант аспирировали и планшеты промывали два раза D-3ФР. Количественное определение испускаемого света осуществляли с использованием системы для анализа люциферазы 100 и репортерного лизирующего буфера (оба фирмы Promega, каталожный № E4550 и каталожный № E3971) согласно инструкциям производителя. В целом, метод состоял в следующем: клетки лизировали в течение 10 мин при -20°C путем добавления 30 мкл на лунку 1-кратного лизирующего буфера. Клетки подвергали оттаиванию в течение 20 мин при 37°C, после чего добавляли 90 мкл на лунку реагента для анализа люциферазы. Испускание света немедленно оценивали количественно с помощью ридера для микропланшетов SpectraMax M5/M5e (фирма Molecular Devices, США), используя продолжительность интегрирования 500 мс, без какого-либо фильтра для учета всех длин волн. Относительные единицы испускаемого света (URL) корректировали с учетом исходной люминесценции клеток HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 и строили график зависимости от логарифма концентрации первичного антитела, используя программу Prism4 (фирма GraphPad Software, США). Кривые аппроксимировали на основе заложенного в программу сигмоидального дозового ответа.

На фиг. 49 представлены данные, демонстрирующие, что ограниченная зависящая от дозы NFkB-активация индуцировалась уже при добавлении FAP-Ox40L (левый график) к репортерной линии клеток. Перекрестная гипер-сшивка FAP-Ox40L с помощью античеловеческих IgG-специфических вторичных антител повышала индукцию опосредуемой NFkB активации люциферазы в зависимости от концентрации (правый график).

Далее при создании изобретения тестировали способность FAP-Ox40L активировать NFkB на основе перекрестной гипер-сшивки конструкций при использовании линий FAP-клеток опухоли.

Тестируемая линия опухолевых клеток представляла собой линию NIH/3T3-huFAP, клон 39. NIH/3T3-huFAP, клон 39 создавали путем трансфекции линии клеток фибробластов мышинных эмбрионов NIH/3T3 (ATCC CRL-1658) экспрессионным вектором pETR4921 для экспрессии huFAP при селекции пурамицином в концентрации 1,5 мкг/мл. Экспрессию FAP на поверхности количественно оценивали с помощью набора Quikkit (фирма Dako, каталожный № K0078) согласно инструкциям производителя. Первичное антитело, применяемое для определения экспрессии FAP на клеточной поверхности, представляло собой перекрестно реактивный человеческий/мышинный клон F11-24 (мышинный IgG1, фирма Calbiochem, каталожный № OP188). Уровень экспрессии на поверхности NIH/3T3-huFAP клон 39 составлял примерно 90000 huFAP на клетку.

Согласно описанному выше методу прикрепленные клетки HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 культивировали в течение ночи при плотности клеток $0,2 \times 10^5$ клеток на лунку и стимулировали в течение 5 ч средой для анализа, содержащей в полученном титровании количестве FAP-Ox40L. Для тестирования влияния перекрестной гипер-сшивки в результате связывания с присутствующим на клеточной поверхности FAP совместно культивировали 25 мкл/лунку среды, содержащей FAP⁺-клетки опухоли NIH/3T3-huFAP, клон 39, в соотношении 3:1 (содержание на лунку FAP⁺-клеток опухоли в три раза выше, чем репортерных клеток). Активированный NFkB количественно оценивали, измеряя испускание света с помощью системы для анализа люциферазы 100 и репортерного лизирующего буфера (оба фирмы Promega, каталожный № E4550 и каталожный № E3971).

Как продемонстрировано на фиг. 50, присутствие экспрессирующих FAP опухолевых клеток значительно повышало индукцию опосредуемой NFkB активации люциферазы, когда добавляли FAP-Ox40L. Определяли площадь под кривой для соответствующих представленных кривых дозовой зависимости в качестве маркера агонистической способности каждой конструкции. Как продемонстрировано на фиг. 50Б, присутствие на клеточной поверхности FAP гарантировало более высокий уровень перекрестной сшивки и в результате более выраженную агонистическую активность FAP-Ox40L, чем добавление Fc-специфического вторичного антитела.

15.5. Опосредуемая OX40 костимуляция субоптимально индуцированных TCR покоящихся человеческих PBMC и перекрестная гипер-сшивка с помощью FAP, присутствующего на клеточной поверхности.

В примере 15.4 было продемонстрировано, что добавление FAP⁺-клеток опухоли может приводить к сильному повышению активности NFκB, индуцируемой нацеленным на FAP OX40L, в человеческих OX40-позитивных репортерных линиях клеток посредством выраженной олигомеризации рецепторов OX40. Кроме того, при создании изобретения тестировали конструкции FAP-OX40L в присутствии клеток NIH/3T3-huFAP, клон 39, в отношении их способности поддерживать субоптимальную стимуляцию TCR покоящихся PBMC-клеток.

Препараты человеческих PBMC содержали (1) покоящиеся OX40-негативные CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки и (2) антигенпрезентирующие клетки, несущие различные молекулы Fcγ-рецептора на своей поверхности, например В-клетки и моноциты. Антитело к человеческому CD3 человеческого IgG1-изотипа может связываться посредством своей Fc-области с присутствующими молекулами Fcγ-рецептора и опосредовать пролонгированную активацию TCR на покоящихся OX40-негативных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетках. Затем эти клетки в течение нескольких часов начинали экспрессировать OX40. Функциональные соединения - агонисты OX40 могут передавать сигнал через рецептор OX40, присутствующий на активированных CD8⁺- и CD4⁺-Т-клетках, и поддерживать опосредуемую TCR стимуляцию.

Покоящиеся меченные CFSE человеческие PBMC стимулировали в течение 5 дней взятым в субоптимальной концентрации антителом к CD3 в присутствии подвергнутых облучению клеток FAP⁺-NIH/3T3-huFAP, клон 39 и FAP-OX40L в полученных титровании количествах. Анализировали воздействия на выживание и пролиферацию Т-клеток, осуществляя с помощью проточной цитометрии мониторинг общего количества клеток и концентрации CFSE в живых клетках.

Собирали клетки мышинных эмбриональных фибробластов NIH/3T3-huFAP, клон 39 (см. пример 15.4) с использованием буфера для диссоциации клеток (фирма Invitrogen, каталожный № 13151-014) в течение 10 мин при 37°C. Клетки однократно промывали D-3ФР. Клетки NIH/3T3-huFAP, клон 39 культивировали при плотности $0,2 \times 10^5$ клеток/лунку в среде для Т-клеток в стерильном круглом 96-луночном планшете для культуры ткани (фирма TPP, каталожный № 92097) в течение ночи в инкубаторе (Hera Cell 150) при 37°C и в атмосфере, содержащей 5% CO₂. На следующий день клетки облучали в рентгеновском облучателе дозой 4500 рад для предупреждения последующего избыточного разрастания человеческих PBMC под влиянием опухолевых клеток.

Человеческие PBMC выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла согласно процедуре, описанной в примере 15.3. Затем клетки при плотности клеток 1×10^6 клеток/мл метили CFSE с использованием CFDA-SE (фирма Sigma-Aldrich, каталожный № 2188) в конечной концентрации 50 нМ в течение 10 мин при 37°C. После этого клетки дважды промывали избытком D-3ФР, содержащим FBS (10 об.%). Меченые клетки выдерживали в среде для Т-клеток при 37°C в течение 30 мин. Затем удаляли неконвертированный CFDA-SE, осуществляя две дополнительные стадии промывки D-3ФР. Меченные CFSE покоящиеся человеческие PBMC добавляли в каждую лунку при плотности $0,5 \times 10^5$ клеток/лунку. Добавляли антитело к человеческому CD3 (клон V9, человеческий IgG1, описанный у Rodrigues и др., Int J. Cancer Suppl. 7, 1992, сс. 45-50 и в US 6054297) до конечной концентрации 20 нМ и добавляли FAP-OX40L в указанных концентрациях. Клетки активировали в течение 5 дней при 37°C и в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в инкубаторе (Hera Cell 150). Затем окрашивали поверхность клеток конъюгированными с флуоресцентным красителем антителами к человеческому CD4 (клон RPA-T4, фирма BioLegend, каталожный № 300532) и CD8 (клон RPA-T8, фирма BioLegend, каталожный № 3010441) в течение 20 мин при 4°C. После осуществления стадии промывки FACS-буфером клетки ресуспендировали в 85 мкл/лунку FACS-буфера и анализировали с использованием проточного цитометра Fortessa с 5 лазерами (фирма BD Bioscience, программа DIVA).

Как продемонстрировано на фиг. 51, перекрестная гипер-сшивка конструкций FAP-OX40L в результате присутствия клеток NIH/3T3-huFAP клон 39 выраженно усиливала пролиферацию (см. графики, озаглавленные как "события", на верхней панели) и выживание (см. графики, озаглавленные как "пролиферация", на нижней панели) стимулированных TCR человеческих CD4⁺-и CD8⁺-Т-клеток. Агонистическое действие FAP-OX40L было менее выраженным в отношении CD8⁺-Т-клеток, чем в отношении CD4⁺-Т-клеток, что согласуется с более низким уровнем экспрессии OX40 на человеческих CD8⁺-Т-клетках.

Процитированные ссылки.

Ascierto P.A., E. Simeone, M. Sznol, Y.X. Fu и I. Melero. Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies, Semin. Oncol. 37, 2010, сс. 508-516.

Aggarwal B.B., Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword, Nat. Rev. Immunol. 3(9), 2003, сс. 745-756.

Banner D. и др. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation, Cell 73, 1993, сс. 431-445.

Bodmer J., Schneider P. и Tschoop J., The molecular architecture of the TNF superfamily, Trends in Biochemical Sciences 27(1), 2002, сс. 19-26.

Broil K., Richter G., Pauly S., Hofstaedter F. и Schwarz H., CD137 expression in tumor vessel walls, High correlation with malignant tumors. Am. J. Clin. Pathol. 115, 2001, сс. 543-549.

Buechele C., Baessler T., Schmiedel B.J., Schumacher C.E., Grosse-Hovest L., Rittig K. и Salih H.R., 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia, *Eur. J. Immunol.* 42, 2012, cc. 737-748.

Choi B.K., Kim Y.H., Kwon P.M., Lee S.C., Kang S.W., Kim M.S., Lee M.J. и Kwon B.S., 4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells, *J. Immunol.* 182, 2009, cc. 4107-4115.

Cuadros C., Dominguez A.L., Lollini P.L., Croft M., Mittler R.S., Borgstrom P. и Lustgarten J., Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic tumors in combination with anti-OX40 and anti-4-1BB monoclonal antibodies induces T cell-mediated protective immunity in Her-2/neu transgenic mice, *Int J Cancer* 116, 2005, cc. 934-943.

Curran M.A., Kim M., Montalvo W., Al-Shamkhani A. и Allison J.P., Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production, *PLoS One* 6, e19499, 2011.

Diehl L., van Mierlo G.J., den Boer A.T., van der Voort E., Fransen M., van Bostelen L., Krimpenfort P., Melief C.J., Mittler R., Toes R.E. и Offringa R., In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway? *J. Immunol.* 168, 2002, cc. 3755-3762.

Dubrot J., Milheiro F., Alfaro C., Palazon A., Martinez-Forero I., Perez-Gracia J.L., Morales-Kastresana A., Romero-Trejejo J.L., Ochoa M.C., Hervás-Stubbs S. и др., Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ, *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 2010, cc. 1223-1233.

Futagawa T., Akiba H., Kodama T., Takeda K., Hosoda Y., Yagita H. и Okumura K., Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells, *Int. Immunol.* 14, 2002, cc. 275-286.

Guo Z., Cheng D., Xia Z., Luan M., Wu L., Wang G. и Zhang S., Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer, *J. Transl. Med.* 11, 2013, c. 215.

Heinisch I.V., Daigle I., Knopfli B. и Simon H.U., CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 30, 2000, cc. 3441-3446.

Hornig N., Kermer V., Frey K., Diebolder P., Kontermann R.E., Mueller D., Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy, *J. Immunother.* 35, 2011, cc. 418-429.

Ju S.A., Cheon S.H., Park S.M., Tam N.Q., Kim Y.M., An W.G. и Kim B.S., Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice, *Int. J. Cancer* 122, 2008, cc. 2784-2790.

Kienzle G. и von Kempis J., CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int. Immunol.* 12, 2000, cc. 73-82.

Kim D.H., Chang W.S., Lee Y.S., Lee K.A., Kim Y.K., Kwon B.S. и Kang C.Y., 4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* 180, 2008, cc. 2062-2068.

Kim Y.H., Choi B.K., Oh H.S., Kang W.J., Mittler R.S. и Kwon B.S., Mechanisms involved in synergistic anticancer effects of anti-4-1BB and cyclophosphamide therapy. *Mol. Cancer. Ther.* 8, 2009, cc. 469-478.

Kwon B.S. и Weissman S.M., cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1989, cc. 1963-1967.

Lee H., Park H.J., Sohn H.J., Kim J.M. и Kim S.J., Combinatorial therapy for liver metastatic colon cancer: dendritic cell vaccine and low-dose agonistic anti-4-1BB antibody co-stimulatory signal. *J. Surg. Res.* 169, e43-50, 2011.

Levitsky V., de Campos-Lima P.O., Frisan T. и Masucci M.G., The clonal composition of a peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time. *J. Immunol.* 161, 1998, cc. 594-601.

Li F. и Ravetch J.V., Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science* 333, 2011, cc. 1030-1034.

Lin W., Voskens C.J., Zhang X., Schindler D.G., Wood A., Burch E., Wei Y., Chen L., Tian G., Tamada K. и др., Fc-dependent express of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. *Blood* 112, 2008, cc. 699-707.

Melero I., Johnston J.V., Shufford W.W., Mittler R.S. и Chen L., NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol.* 190, 1998, cc. 167-172.

Melero I., Shufford W.W., Newby S.A., Aruffo A., Ledbetter J.A., Hellstrom K.E., Mittler R.S. и Chen L., Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat. Med.* 3, 1997, cc. 682-685.

Merchant A.M., Zhu Z., Yuan J.Q., Goddard A., Adams C.W., Presta L.G. и Carter P., An efficient route to human bispecific IgG? *Nat. Biotechnol.* 16, 1998, cc. 677-681.

Morales-Kastresana A., SanMamed M.F., Rodriguez I., Palazon A., Martinez-Forero I., Labiano S., Hervás-Stubbs S., Sangro B., Ochoa C., Rouzaut A. и др., Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic hepatocellular carcinoma mouse model. *Clin. Cancer. Res.* 19, (2013), cc.

6151-6162.

Mueller D., Frey K., Kontermann R.E., A novel antibody-4-1BB1 fusion protein for targeted costimulation in cancer immunotherapy, *J. Immunother.* 31, 2008, cc. 714-722.

Murillo O., Dubrot J., Palazon A., Arina A., Azpilikueta A., Alfaro C., Solano S., Ochoa M.C., Berasain C., Gabari I. и др., In vivo depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. *Eur. J. Immunol.* 39, 2009, cc. 2424-2436.

Narazaki H., Zhu Y., Luo L., Zhu G. и Chen L., CD137 agonist antibody prevents cancer recurrence: contribution of CD137 on both hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood* 115, 2010, cc. 1941-1948.

Nishimoto H., Lee S.W., Hong H., Potter K.G., Maeda-Yamamoto M., Kinoshita T., Kawakami Y., Mittler R.S., Kwon B.S., Ware C.F. и др., Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor, *Blood* 106, 2005, cc. 4241-4248.

Olofsson P.S., Soderstrom L.A., Wagsater D., Sheikine Y., Ocaya P., Lang F., Rabu C., Chen L., Rudling M., Aukrust P. и др., CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 117, 2008, cc. 1292-1301.

Palazon A., Teixeira A., Martinez-Forero I., Hervás-Stubbs S., Roncal C., Penuelas I., Dubrot J., Morales-Kastresana A., Perez-Gracia J.L., Ochoa M.C. и др., Agonist anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes, *Cancer Res.* 71, 2011, cc. 801-811.

Schwarz H., Valbracht J., Tuckwell J., von Kempis J. и Lotz M., ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood*, 85, 1995, cc. 1043-1052.

Shao Z. и Schwarz H., CD 137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction, *J. Leukoc. Biol.* 89, 2011, cc. 21-29.

Shi W. и Siemann D.W., Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment, *Anticancer Res.* 26, 2006, cc. 3445-3453.

Simeone E. и Ascierto P.A., Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD 137, and anti-PD1, *J. Immunotoxicol.* 9, 2012, cc. 241-247.

Snell L.M., Lin G.H., McPherson A.J., Moraes T.J. и Watts T.H., T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 244, 2011, cc. 197-217.

Stagg J., Loi S., Divisekera U., Ngiew S.F., Duret H., Yagita H., Teng M.W. и Smyth M.J., Анти-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 2011, cc. 7142-7147.

Teng M.W., Sharkey J., McLaughlin N.M., Exley M.A. и Smyth M.J., CD1d-based combination therapy eradicates established tumors in mice. *J. Immunol.* 183, 2009, cc. 1911-1920.

von Kempis J., Schwarz H. и Lotz M., Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin, *Osteoarthritis Cartilage* 5, 1997, cc. 394-406.

Wei H., Zhao L., Li W., Fan K., Qian W., Hou S., Wang H., Dai M., Hellstrom I., Hellstrom K.E. и Guo Y., Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. *PLoS One* 8, e84927, 2013.

Wilcox R.A., Chapoval A.I., Gorski K.S., Otsuji M., Shin T., Flies D.B., Tamada K., Mittler R.S., Tsuchiya H., Pardoll D.M. и Chen L., Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells, *J. Immunol.* 168, 2002, cc. 4262-4267.

Wilcox R.A., Tamada K., Flies D.B., Zhu G., Chapoval A.I., Blazar B.R., Kast W.M. и Chen L., Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8⁺ cytolytic T lymphocytes in vivo. *Blood* 103, 2004, cc. 177-184.

Zhang N., Sadun R.E., Arias R.S., Flanagan M.L., Sachsman S.M., Nien Y., Khawli L.A., Hu P., Epstein A.L., Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors, *Clin. Cancer Res.* 13, 2007, cc. 2758-2767.

Zhang X., Voskens C.J., Sallin M., Maniar A., Montes C.L., Zhang Y., Lin W., Li G., Burch E., Tan M. и др., CD137 promotes proliferation and survival of human B cells, *J. Immunol.* 184, 2010, cc. 787-795.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предназначенная для лечения рака, и которая содержит:

(а) по меньшей мере одну Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, выбранным из группы, состоящей из: фибробласт-активирующий белок (FAP), ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), карциноэмбриональный антиген (CEA), CD19, CD20 и CD33;

(б) первый и второй полипептиды, которые связаны друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит CH1- или CL-домен и второй полипептид, который содержит CL- или CH1-домен соответственно, при этом второй полипептид связан с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменом, и где первый полипептид содержит два эктодомена, представителя семейства лигандов TNF, выбранных из 4-1

BBL, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 375, или из OX40L, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, которые связаны друг с другом и с CH1- или CL-доменом пептидным линкером и где второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF, выбранного из 4-1 BBL, включающего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 375, или OX40L, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, которые связаны друг с другом и с CH1- или CL-доменом указанного полипептида;

(в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

2. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предназначенная для лечения рака, и которая содержит:

(а) по меньшей мере одну Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, выбранным из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), карциноэмбриональный антиген (CEA), CD19, CD20 и CD33,

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит CH3-домен и второй полипептид содержит CH3-домен соответственно, и при этом первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF, выбранных из 4-1 BBL, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 375, или OX40L, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, которые связаны друг с другом и с С-концом CH3-домена пептидным линкером, и при этом второй полипептид содержит только один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF, выбранного из 4-1 BBL, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 375, или из OX40L, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, которые связаны пептидным линкером с С-концом CH3-домена указанного полипептида; и

(в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

3. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF, предназначенная для лечения рака, которая содержит:

(а) по меньшей мере одну Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, выбранного из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), карциноэмбриональный антиген (CEA), CD19, CD20 и CD33;

(б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью, где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит VH-CL- или VL-CH1-домен и второй полипептид содержит VL-CH1-домен или VH-CL-домен соответственно, при этом второй полипептид связан с первым полипептидом дисульфидной связью между CH1- и CL-доменом и при этом первый полипептид содержит два эктодомена представителя семейства лигандов TNF, выбранных из 4-1 BBL, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 375, или из OX40L, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, которые соединены друг с другом и с VH или VL пептидным линкером, и при этом второй полипептид содержит один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF, выбранного из 4-1 BBL, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 375, или OX40L, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, соединенный через пептидный линкер с VL или VH указанного полипептида; и

(в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

4. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-3, в которой представитель семейства лигандов TNF представляет собой 4-1BBL, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374.

5. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-4, в которой эктодомен представителя семейства лигандов TNF содержит аминокислотную последо-

вательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 96.

6. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-5, в которой эктодомен представителя семейства лигандов TNF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

7. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-4, которая содержит:

(а) по меньшей мере одну Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, выбранным из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), карциноэмбриональный антиген (CEA), CD19, CD20 и CD33 и (б) первый и второй полипептиды, которые сцеплены друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

8. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-7, где молекула содержит одну Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, выбранным из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), карциноэмбриональный антиген (CEA), CD19, CD20 и CD33.

9. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-8, где антиген клетки-мишени представляет собой фибробласт-активирующий белок (FAP).

10. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-9, в которой Fab-молекула, обладающая способностью специфически связываться с FAP, содержит VH-домен, который содержит: (I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 100, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 101, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 102, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 103, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 104, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 105.

11. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-10, в которой Fab-молекула, обладающая способностью специфически связываться с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107.

12. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-11, в которой Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG, прежде всего Fc-домен IgG1 или Fc-домен IgG4.

13. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-12, в которой Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1, содержащий аминокислотные замены в положениях 234 и 235 (EU-нумерация) и/или 329 (EU-нумерация).

14. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1 или 3-13, где антигенсвязывающая молекула содержит

первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, обе включающие Fab-молекулу, которая обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени,

первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слитый на его С-конце с помощью второго пептидного линкера со второй тяжелой или легкой цепью, и

второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF, слитого на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера со второй легкой или тяжелой цепью соответственно.

15. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1 и 4-14, в которой первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на его С-конце с помощью второго пептидного линкера с CH1-доменом, который является частью тяжелой цепи, а второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF, слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CL-доменом, который является частью легкой цепи.

16. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1 или 4-14, в которой первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов

TNF, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на его С-конце с помощью второго пептидного линкера с CL-доменом, который является частью тяжелой цепи, а второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF, слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с CH1-доменом, который является частью легкой цепи.

17. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.3-14, в которой первый пептид, содержащий два эктодомена представителя семейства лигандов TNF, которые соединены друг с другом с помощью первого пептидного линкера, слит на его С-конце с помощью второго пептидного линкера с VH-доменом, который является частью тяжелой цепи, а второй пептид, содержащий один эктодомен указанного представителя семейства лигандов TNF, слит на его С-конце с помощью третьего пептидного линкера с VL-доменом, который является частью легкой цепи.

18. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.15-17, в которой в CL-домене, примыкающем к представителю семейства лигандов TNF, аминокислота в положении 123 (EU-нумерация) заменена на аргинин (R) и аминокислота в положении 124 (EU-нумерация) заменена на лизин (K), и в которой в CH1, примыкающем к представителю семейства лигандов TNF, аминокислоты в положении 147 (EU-нумерация) и в положении 213 (EU-нумерация) заменены на глутаминовую кислоту (E).

19. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1 или 3-18, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(а) первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, обе образующие Fab-молекулу, которая обладает способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени;

(б) вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, и

вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

20. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1 и 3-15, где антигенсвязывающая молекула, содержащая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с FAP, содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или

первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107;

(II) вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 113; и

(III) вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 114.

21. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1, или 3-14, или 16, где антигенсвязывающая молекула, включающая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с FAP, содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или

первую тяжелую цепь, содержащую VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и первую легкую цепь, содержащую VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107;

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 173; и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 174.

22. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1, или 4-14, или 16, или 21, включающая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с FAP, в которой антигенсвязывающая молекула выбрана из группы состоящей из:

а) молекулы, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116;

б) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118;

в) молекулу, которая содержит две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 125, первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124;

г) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120;

д) молекулу, которая содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 173, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 174; и

е) молекулу, которая содержит две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127.

23. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1, или 4-14, или 16, или 21, или 22, включающая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с FAP, в которой антигенсвязывающая молекула содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

24. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по п.2, где молекула содержит две Fab-молекулы, обладающие способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени, выбранным из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), карциноэмбриональный антиген (CEA), CD19, CD20 и CD33.

25. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по п.24, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; или

(II) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125; или

(III) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125.

26. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-8, или 12-19, или 22, где антиген клетки-мишени представляет собой CD19.

27. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-8, или 12-19, или 24, или 26, в которой Fab-молекула, обладающая способностью специфически связываться с CD19, содержит VH-домен, который содержит: (I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195 или SEQ ID NO: 252, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 253, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197 или SEQ ID NO: 254, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198 или SEQ ID NO: 249, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199 или SEQ ID NO: 250, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200 или SEQ ID NO: 251.

28. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-8, или 12-19, или 24, или 26, или 27, в которой Fab-молекула, обладающая способностью специфически связываться с CD19, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, или в которой фрагмент, обладающий способностью специфически связываться с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 358.

29. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1, или 4-8, или 12-19, или 26-28, включающая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с CD19, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, или

первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последователь-

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

34. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1, или 4-8, или 26-30, или 32, включающая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с CD19, где антигенсвязывающая молекула включает первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 306, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

35. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-8, или 12-19 или 22, где антиген клетки-мишени представляет собой CEA.

36. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-8, или 12-19, или 22, или 35, в которой Fab-молекула, обладающая способностью специфически связываться с CEA, содержит VH-домен, который содержит (I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 321, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 322, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 323, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 325, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326.

37. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-8, или 12-19, или 22, или 35, или 36, в которой Fab-молекула, обладающая способностью специфически связываться с CEA, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330.

38. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1, или 3-8, или 12-19, или 35-37, включающая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с CEA, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330;

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 113; и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 114.

39. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1, или 3-8, или 12-19, или 35-37, включающая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с CEA, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330;

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 173; и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 174.

40. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.2, или 4-8, или 35-37, включающая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с CEA, где антигенсвязывающая молекула содержит:

(I) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334; или

(II) первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334.

41. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1, или 4-8, или 12-19, или 35-39, включающая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с CEA, где антигенсвязывающая молекула включает первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 333, и первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

42. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-3, или 9-18, или 24, или 26-28, или 35-37, где представителем семейства лигандов TNF является OX40L, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54.

43. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-3, или 8-18, или 24, или 26-28, или 35-37, или 42, в которой эктодомен представителя семейства лигандов TNF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

44. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-3, или 8-18, или 24, или 26-28, или 35-37, или 42, или 43, которая содержит:

(а) по меньшей мере одну Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени; и

(б) первый и второй полипептиды, сцепленные друг с другом дисульфидной связью,

где антигенсвязывающая молекула отличается тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 371 или SEQ ID NO: 372 и тем, что второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54.

45. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-3, или 8-18, или 24, или 42-44, где антиген клетки-мишени представляет собой фибробласт-активирующий белок (FAP), а Fab-молекула, обладающая способностью специфически связываться с FAP, содержит VH-домен, который содержит (I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 100, (II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 101, и (III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 102, и VL-домен, который содержит (IV) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 103, (V) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 104, и (VI) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 105.

46. Антигенсвязывающая молекула, содержащая тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-3, или 8-18, или 24, или 42-45, где антигенсвязывающая молекула, включающая Fab-молекулу, обладающую способностью специфически связываться с FAP, содержит:

(I) первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или

первую тяжелую цепь, которая содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и первую легкую цепь, которая содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107;

(II) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 355; и

(III) вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 356.

47. Выделенный полинуклеотид, который кодирует антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, по одному из пп.1-46.

48. Экспрессионный вектор, который содержит выделенный полинуклеотид по п.47.

49. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по п.47 или вектор по п.48.

50. Способ получения антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-46, включающий стадии, на которых:

(I) культивируют клетку-хозяина по п.49 в условиях, пригодных для экспрессии антигенсвязывающей молекулы; и

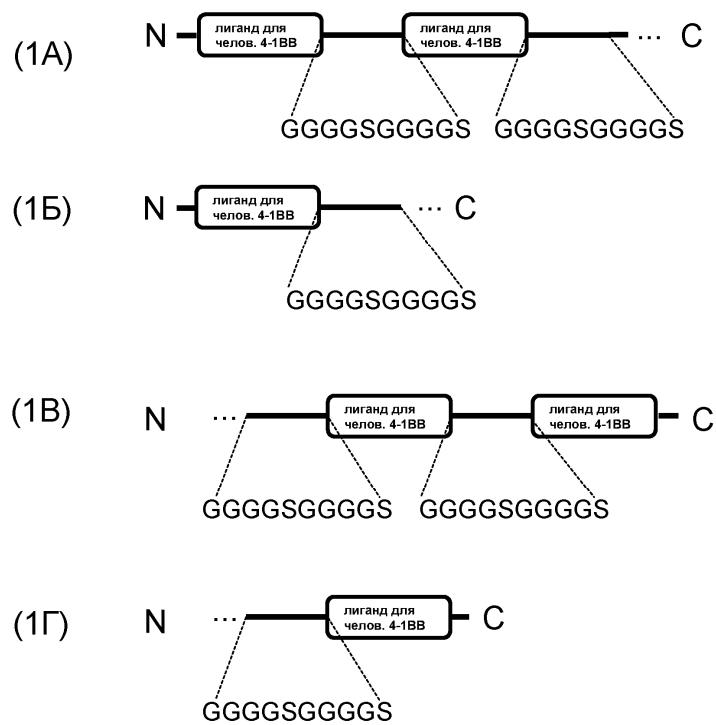
(II) выделяют антигенсвязывающую молекулу.

51. Фармацевтическая композиция для лечения рака, которая содержит антигенсвязывающую молекулу, содержащую тримерный лиганд семейства TNF, по одному из пп.1-46 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

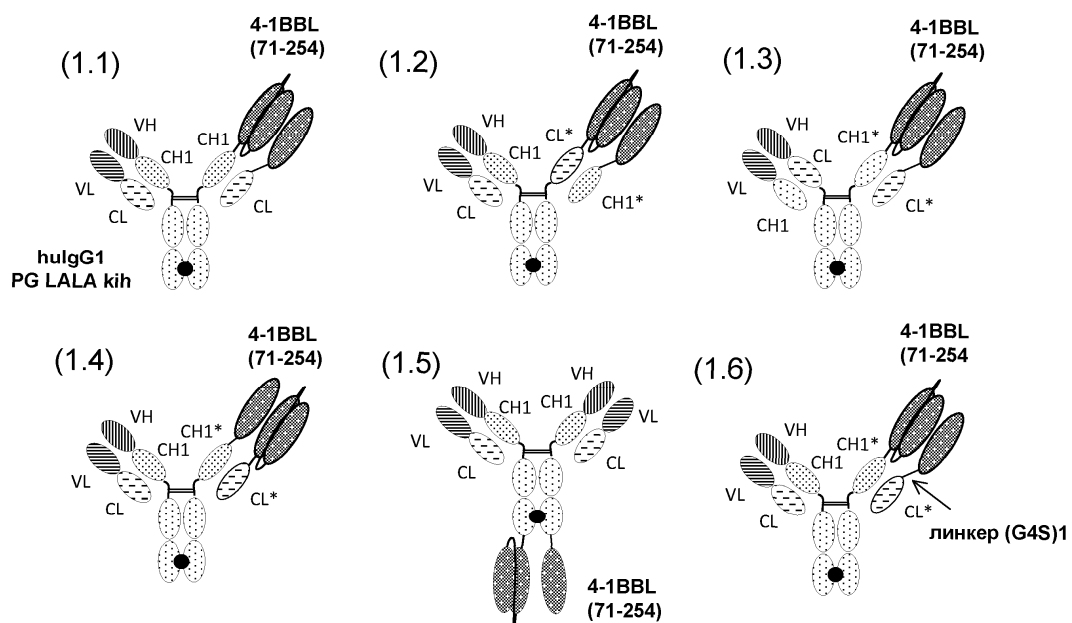
52. Применение фармацевтической композиции по п.51 в качестве лекарственного средства при лечении рака.

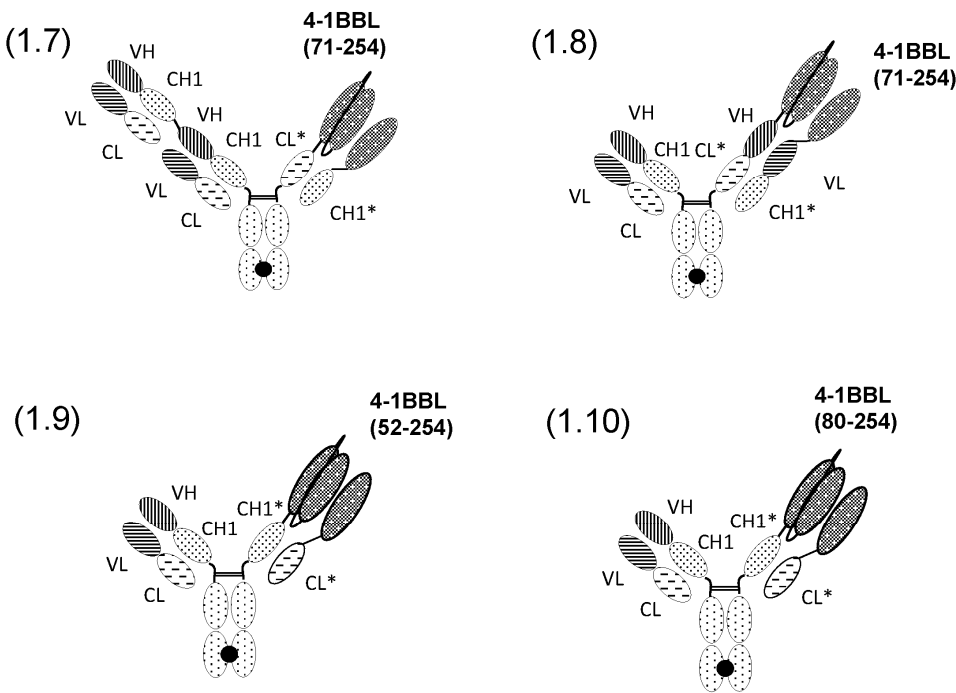
53. Применение антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-46 в качестве лекарственного средства при лечении рака.

54. Применение антигенсвязывающей молекулы, содержащей тримерный лиганд семейства TNF по одному из пп.1-46, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака.

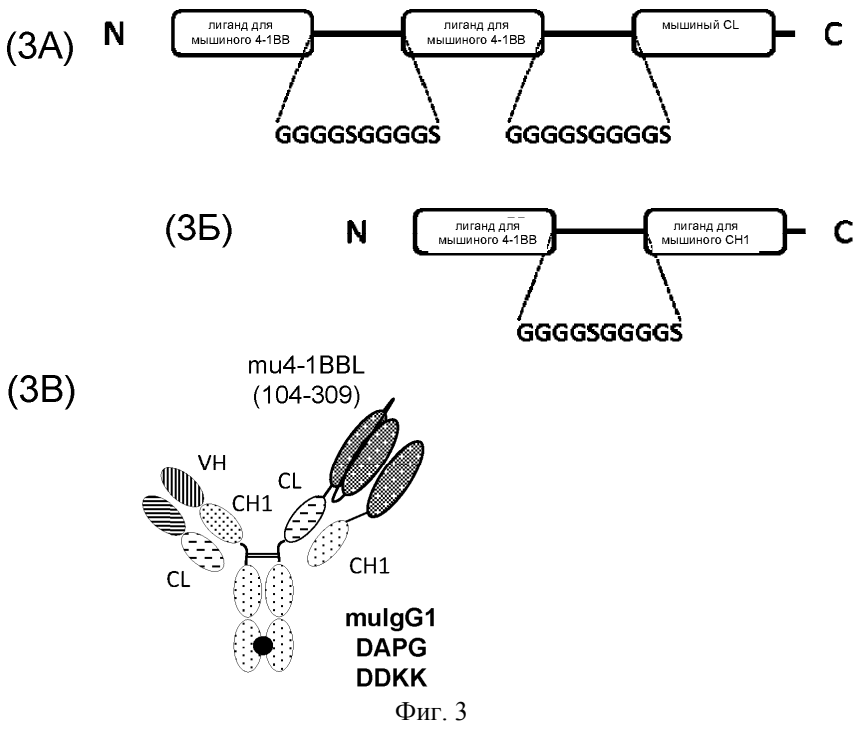


Фиг. 1

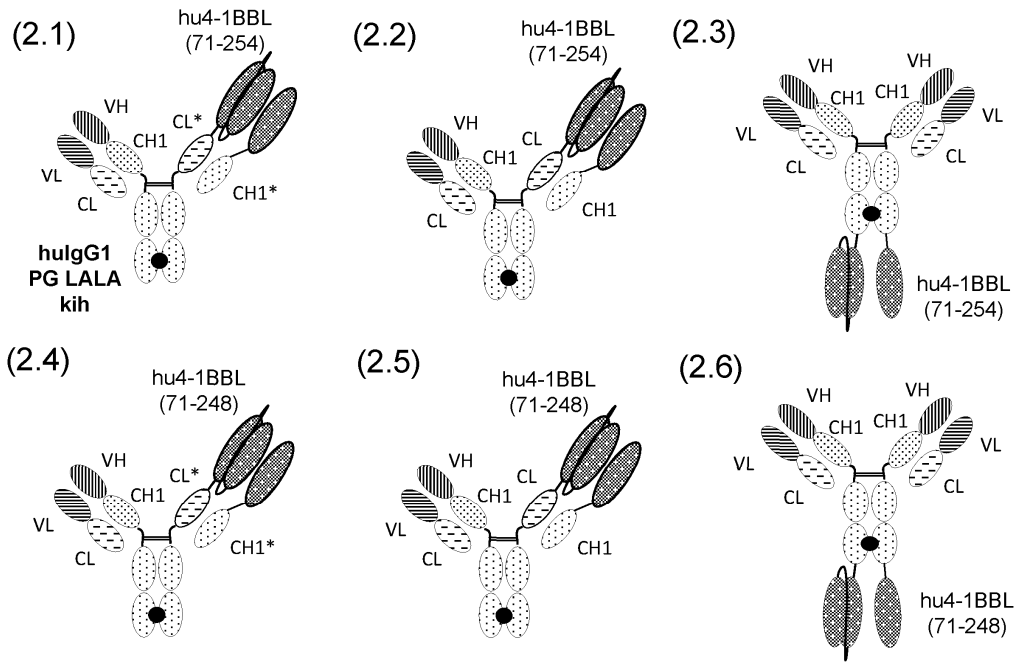




Фиг. 2



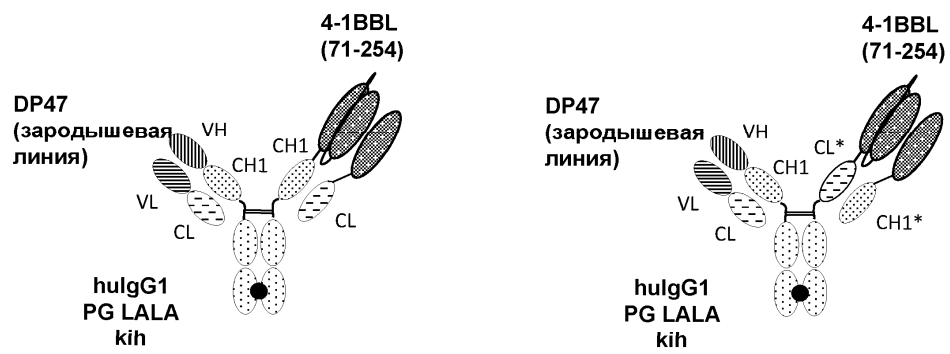
Фиг. 3



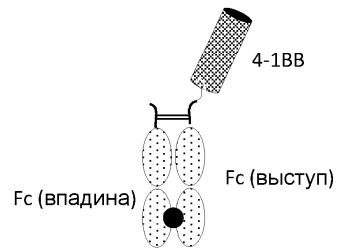
Фиг. 4

(5A)

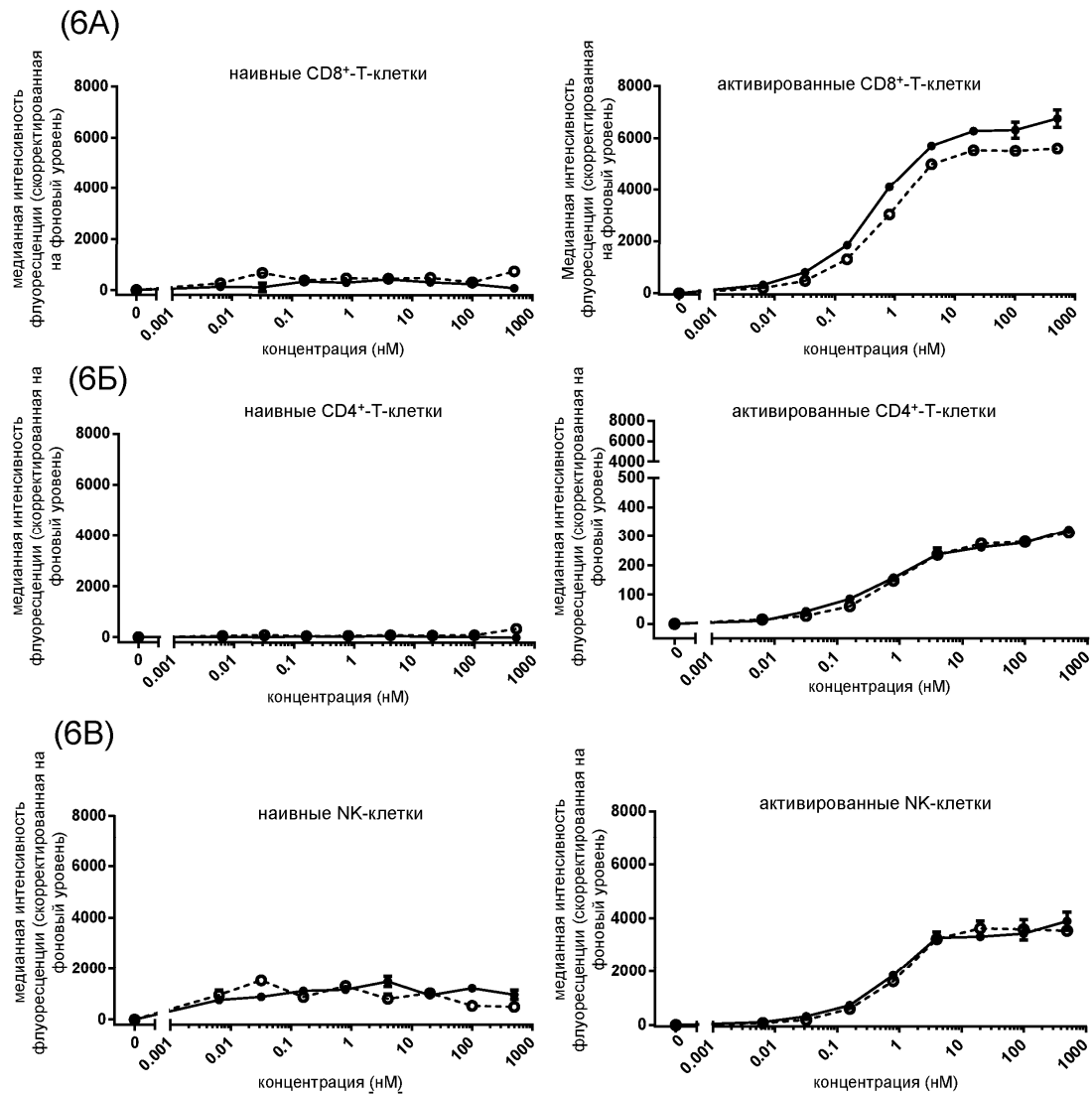
(5Б)



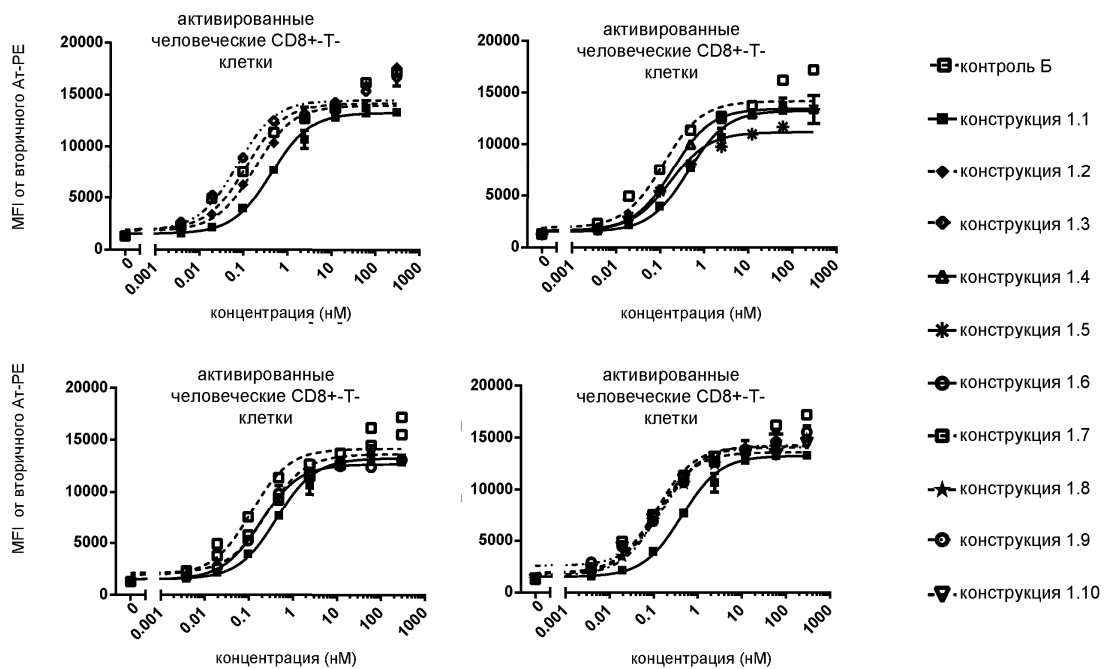
(5B)



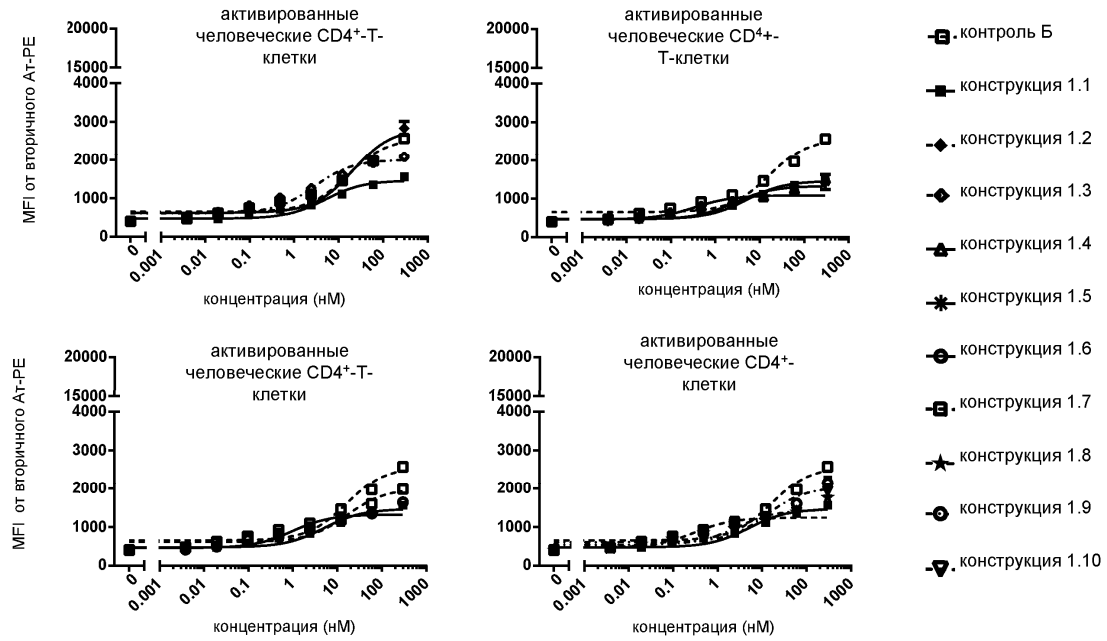
Фиг. 5



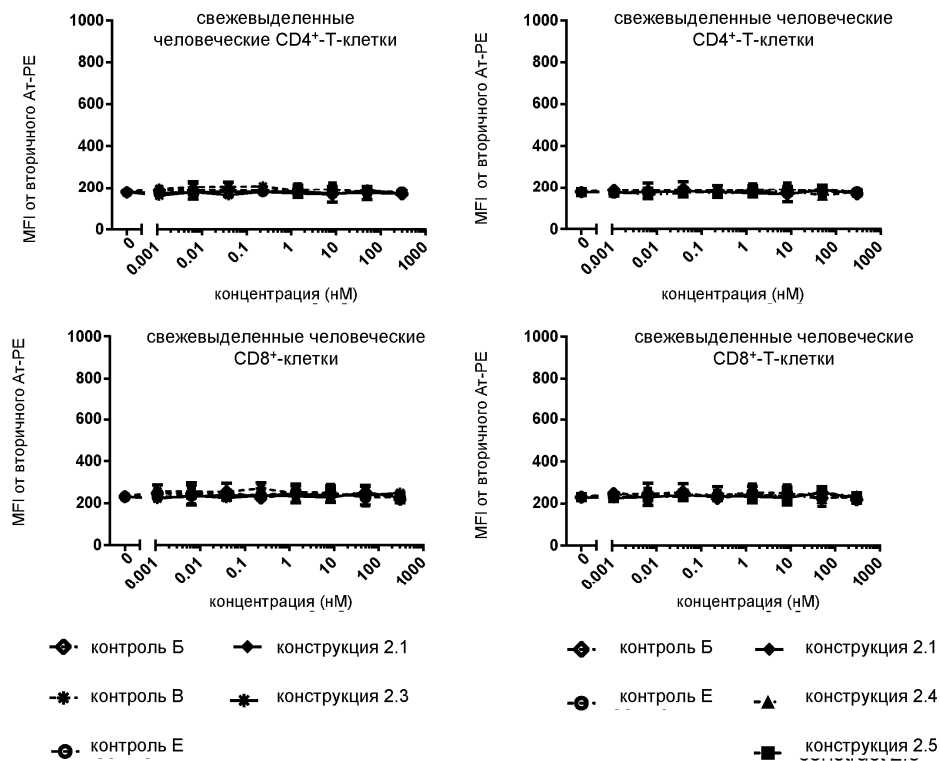
Фиг. 6



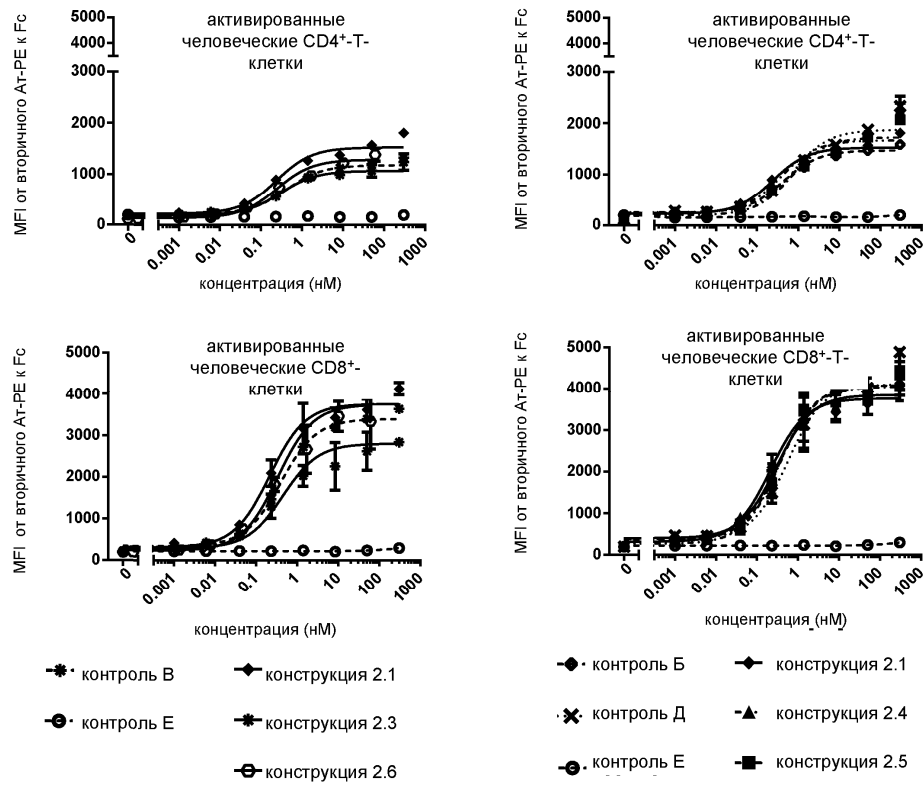
Фиг. 7А



Фиг. 7Б

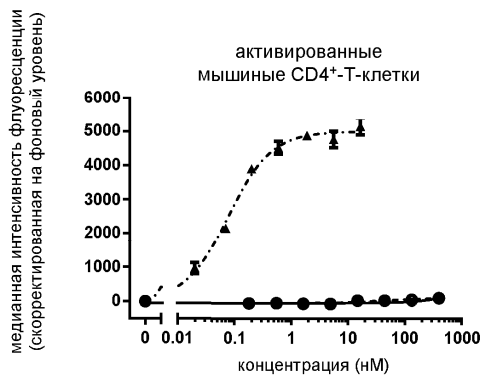


Фиг. 8А

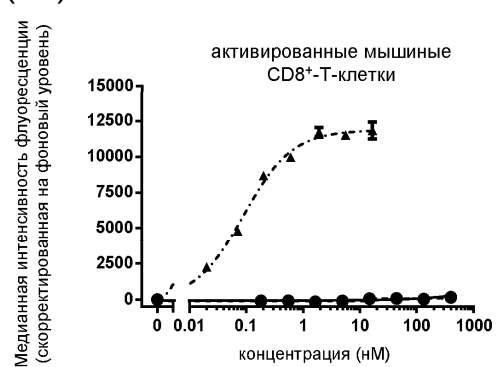


Фиг. 8Б

(9А)

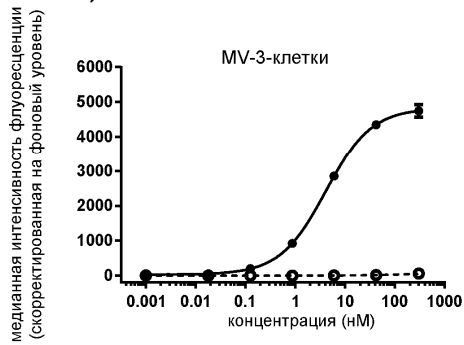


(9Б)

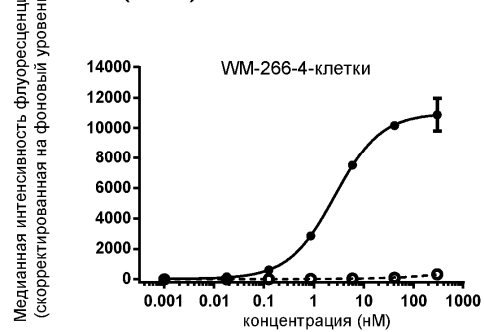


Фиг. 9

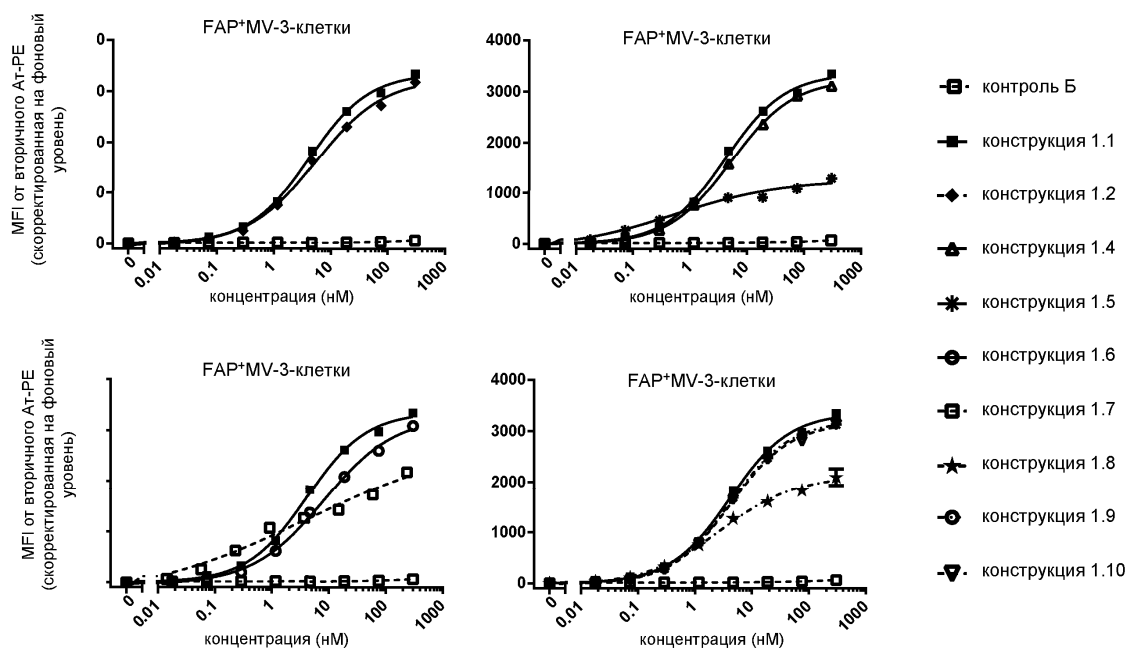
(10А)



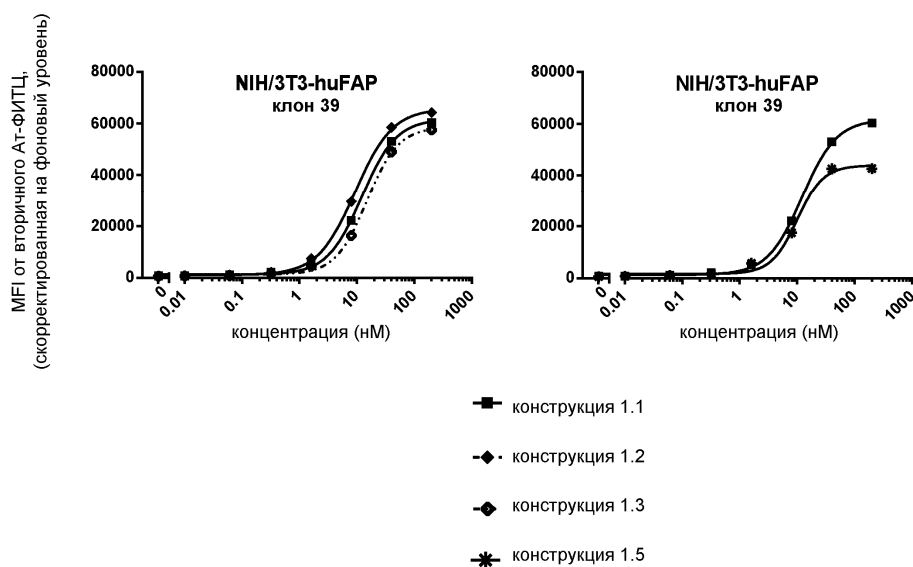
(10Б)



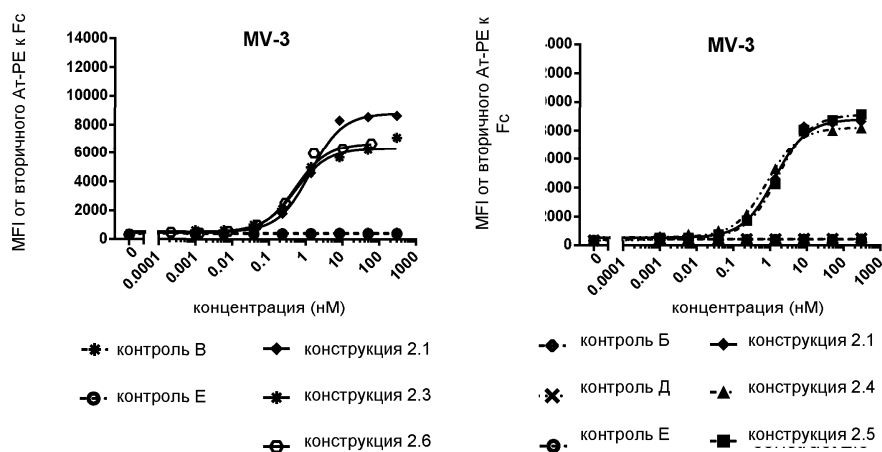
Фиг. 10



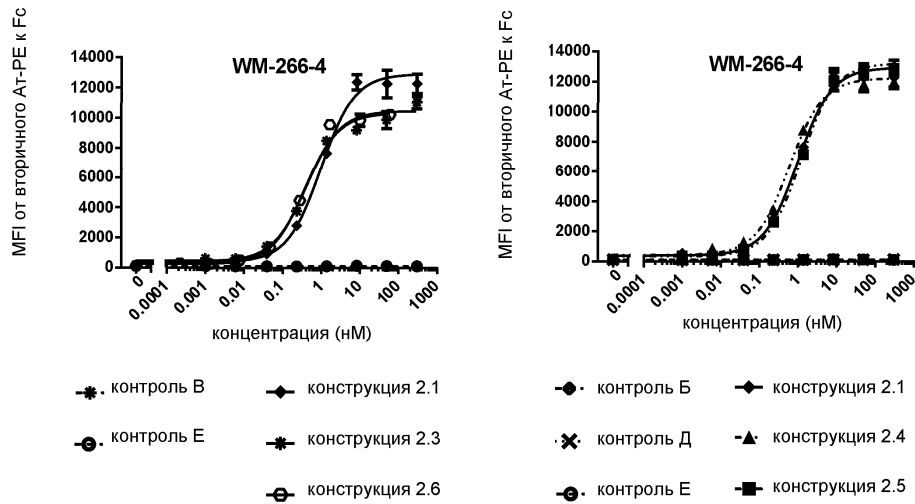
Фиг. 11А



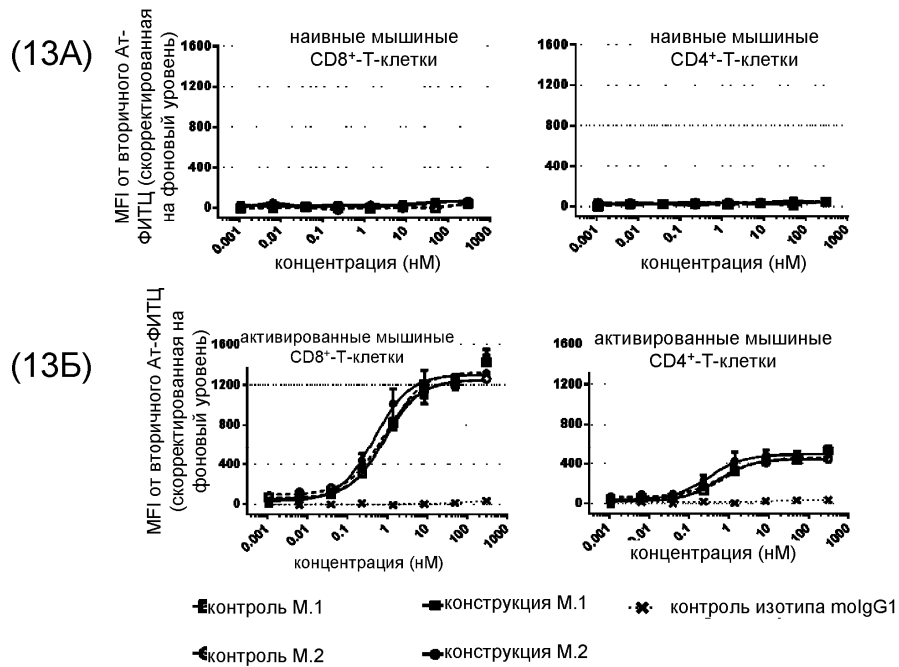
Фиг. 11Б



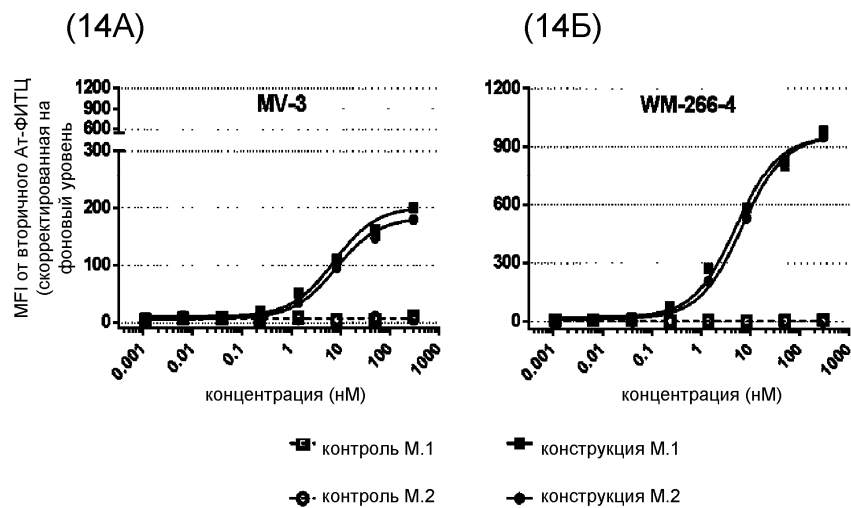
Фиг. 12А



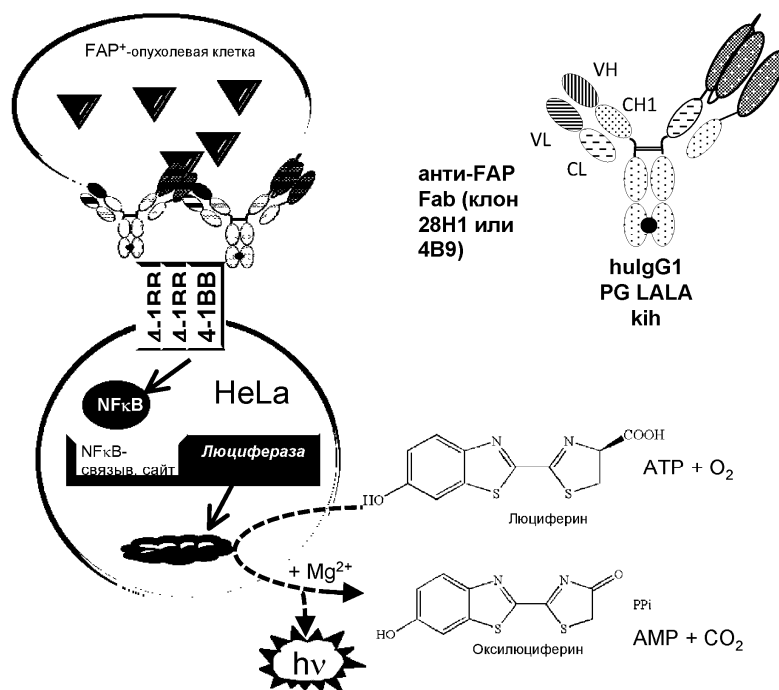
Фиг. 12Б



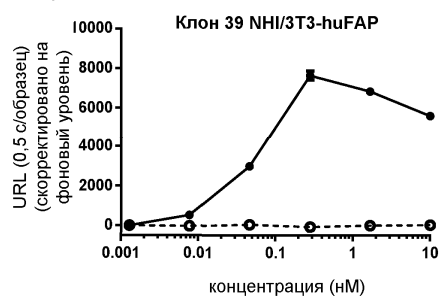
Фиг. 13



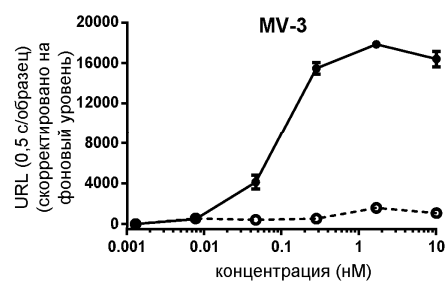
Фиг. 14



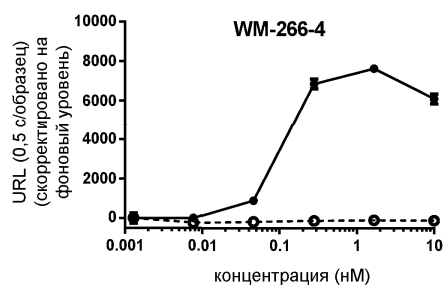
(16A)



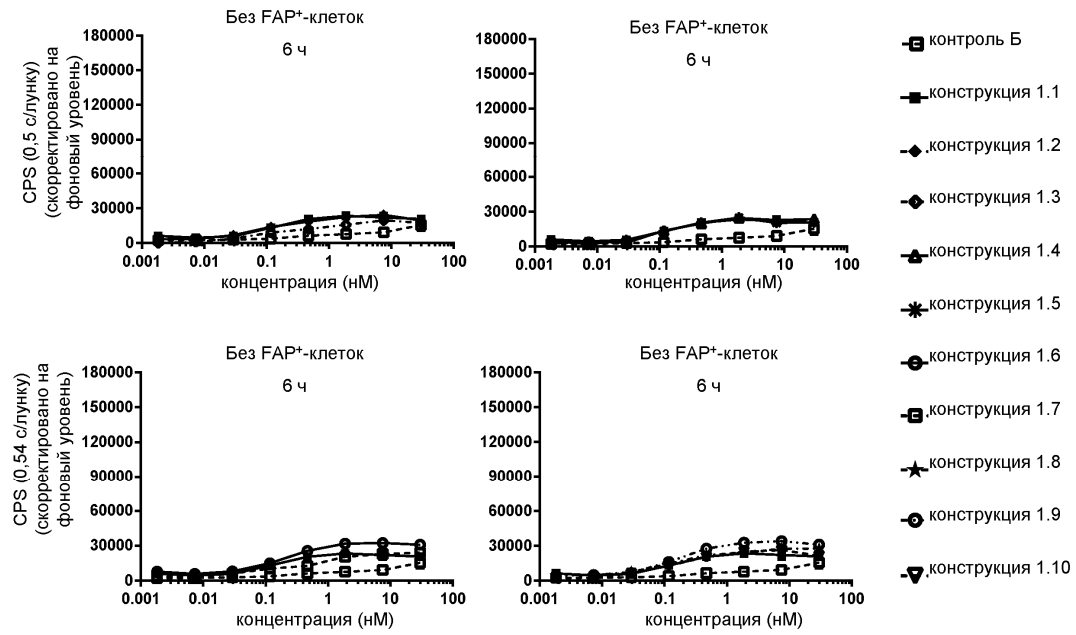
(16Б)



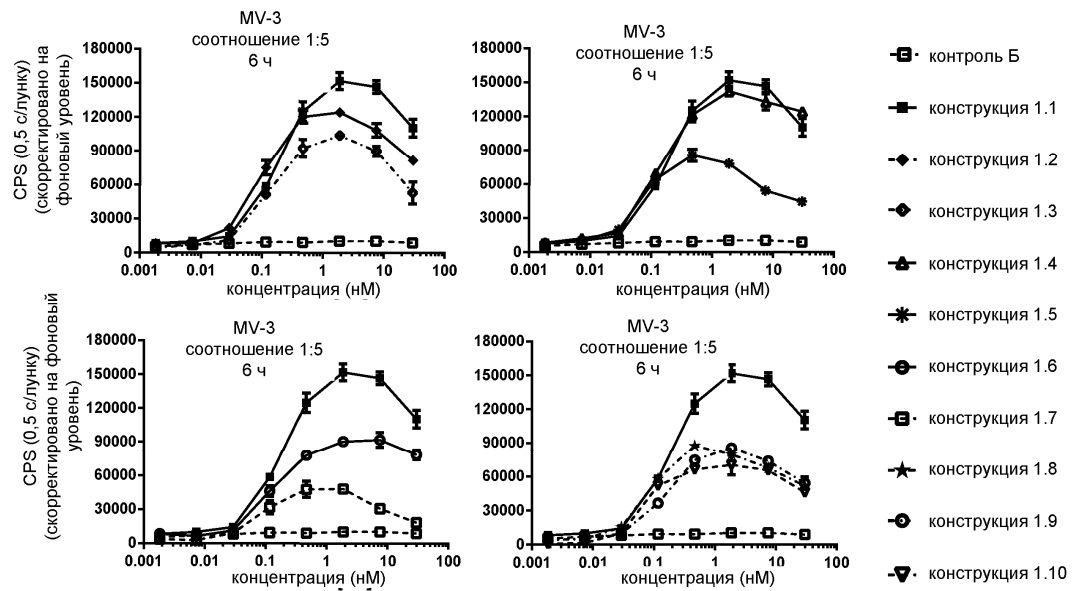
(16В)



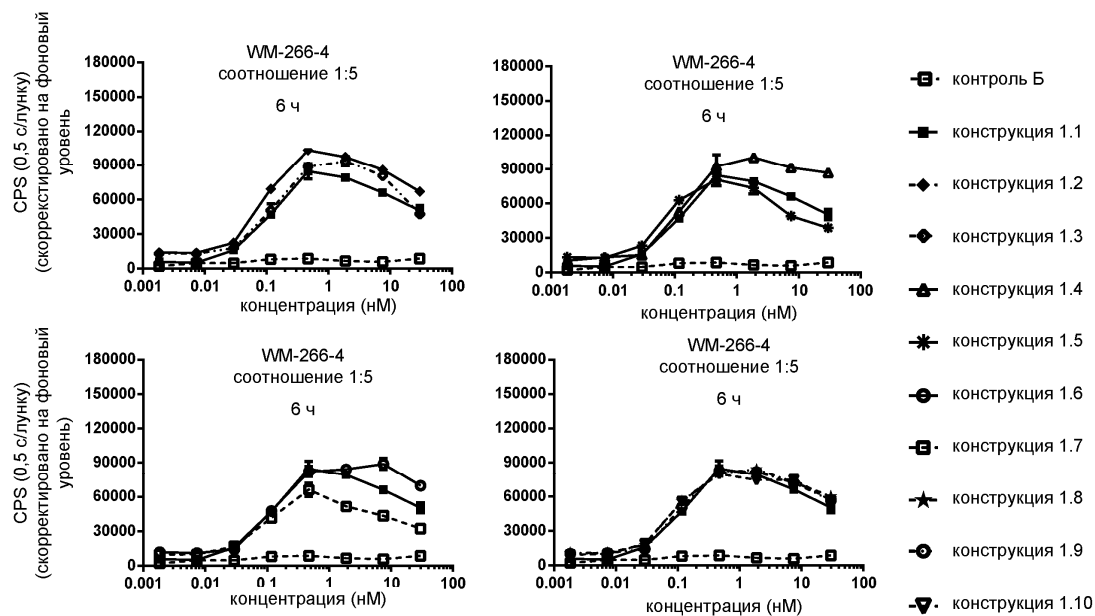
Фиг. 16



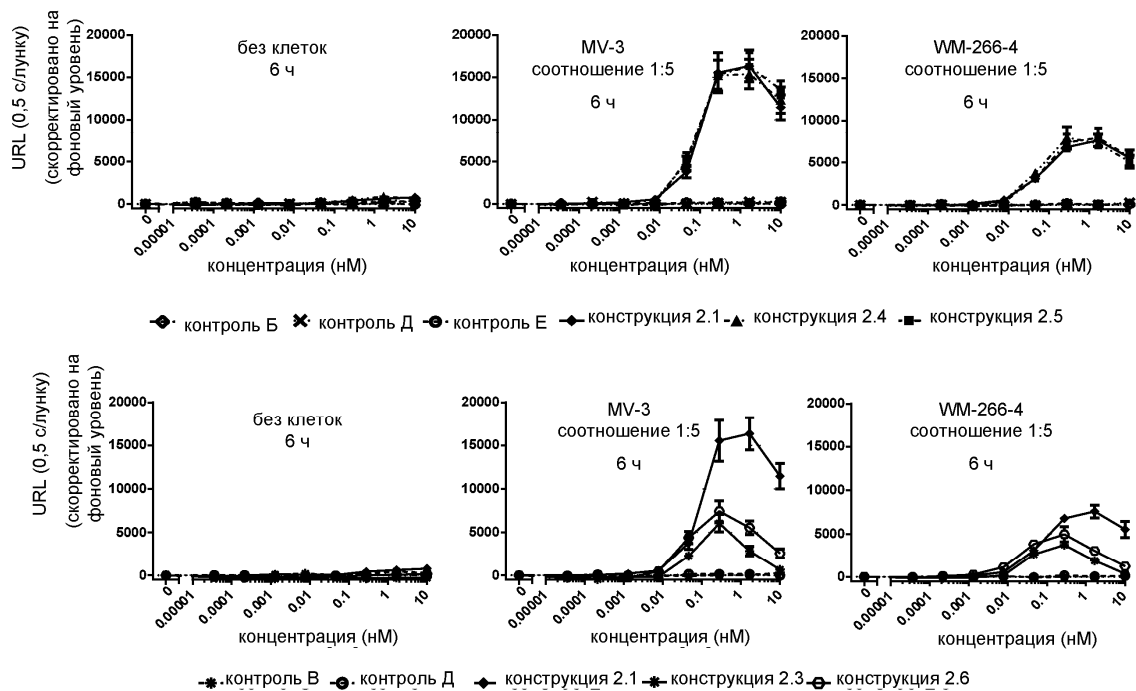
Фиг. 17А



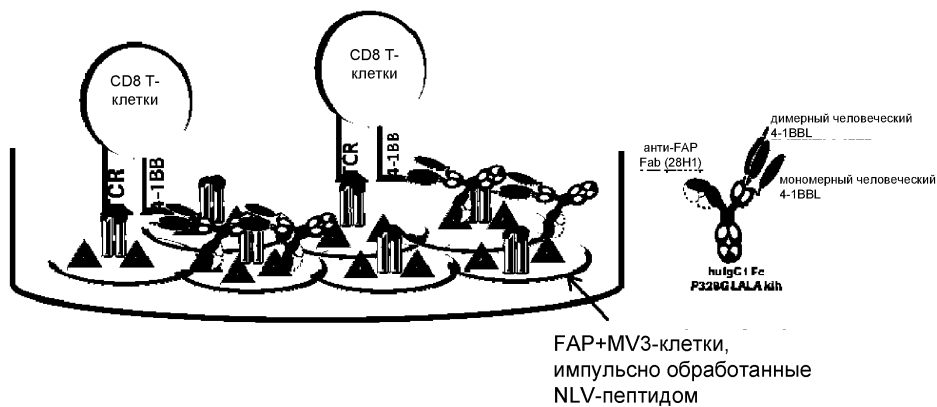
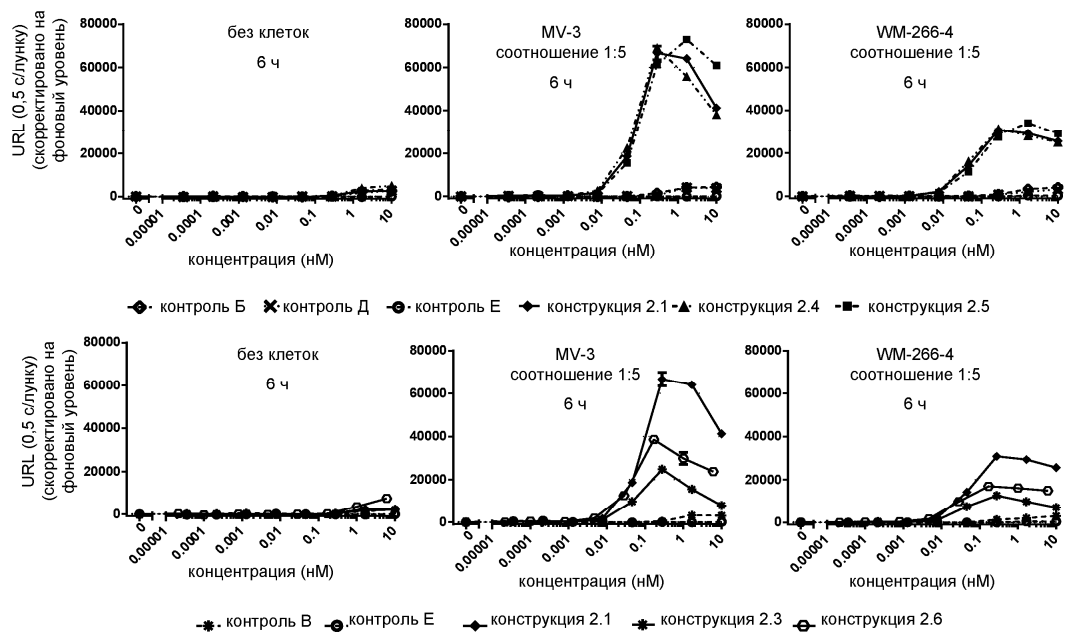
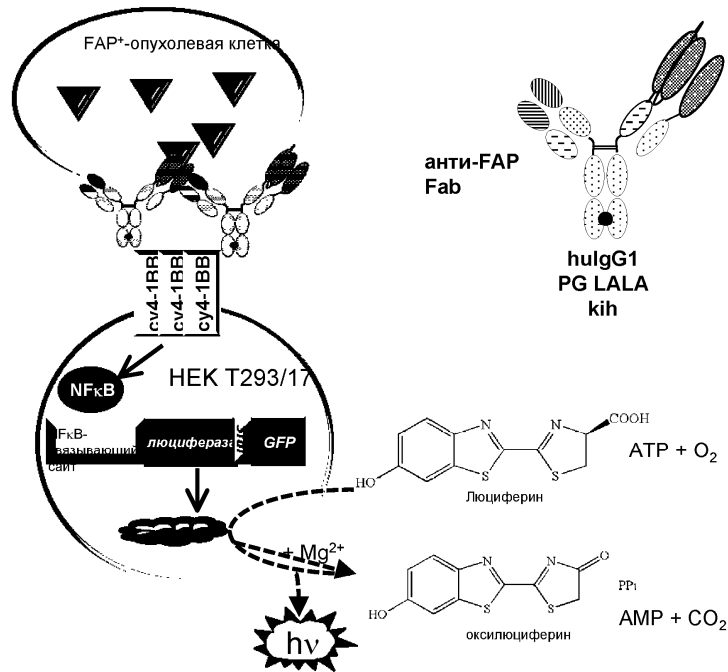
Фиг. 17Б



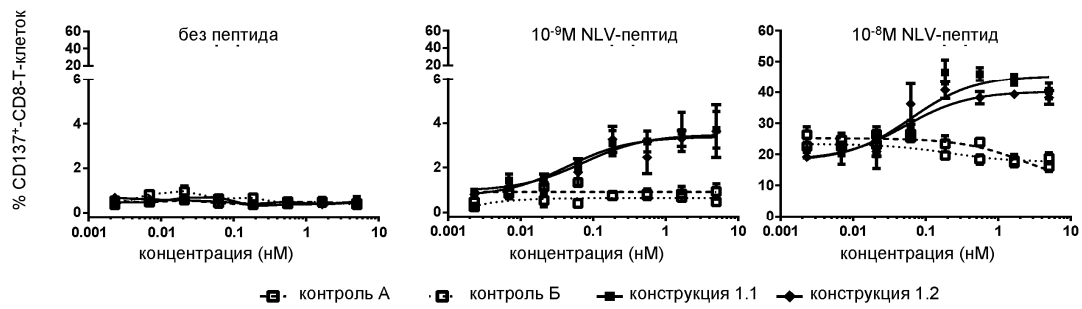
ФИГ. 17В



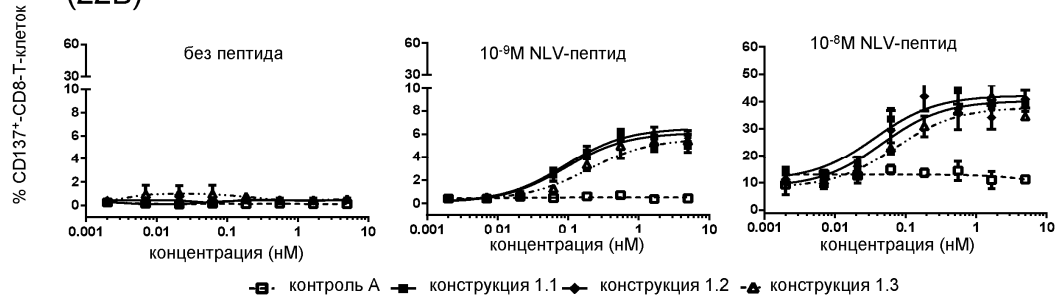
ФИГ. 18



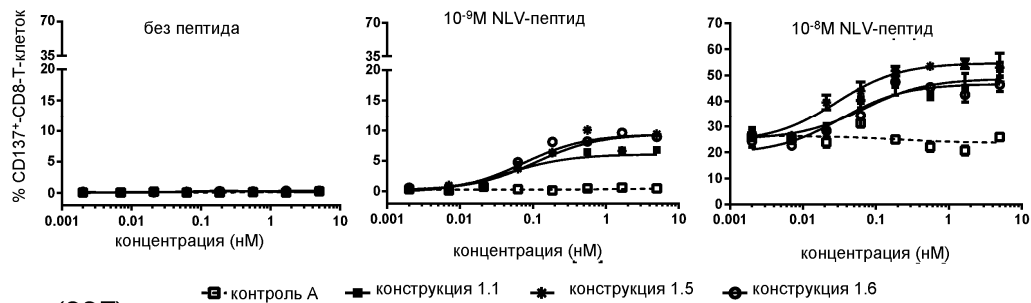
(22A)



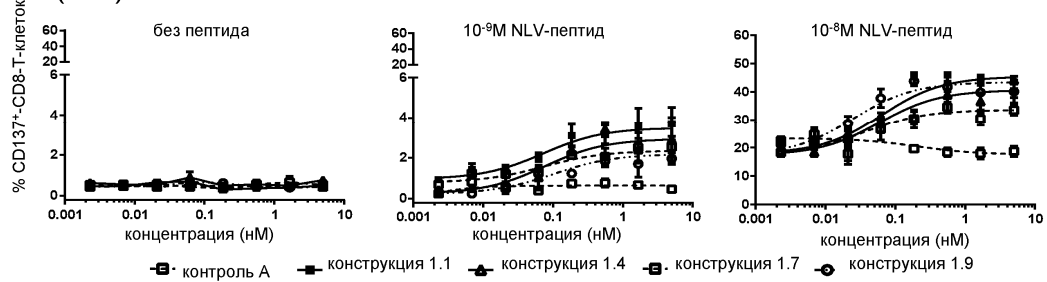
(22Б)



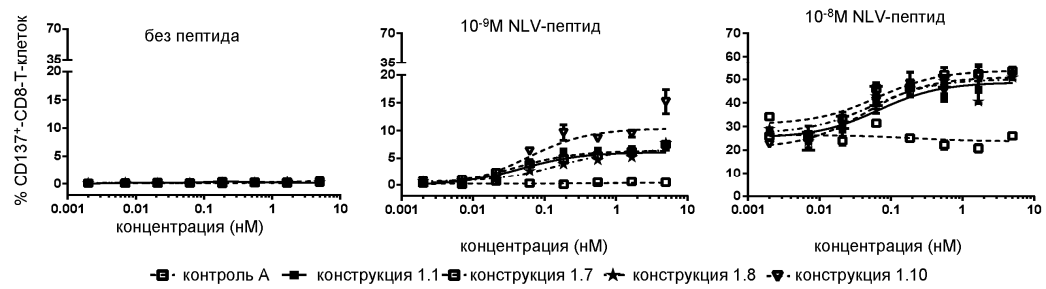
(22В)



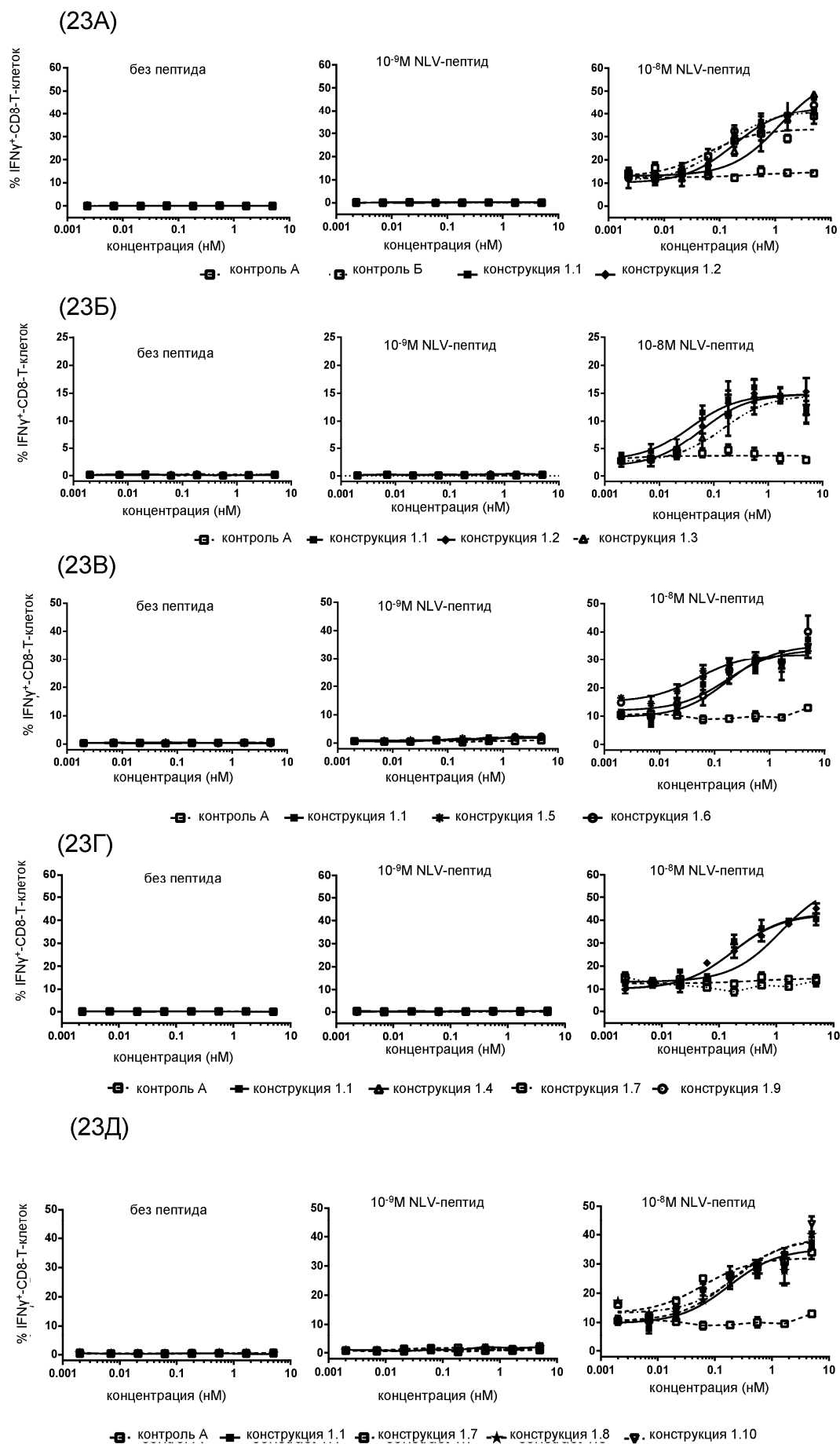
(22Г)



(22Д)

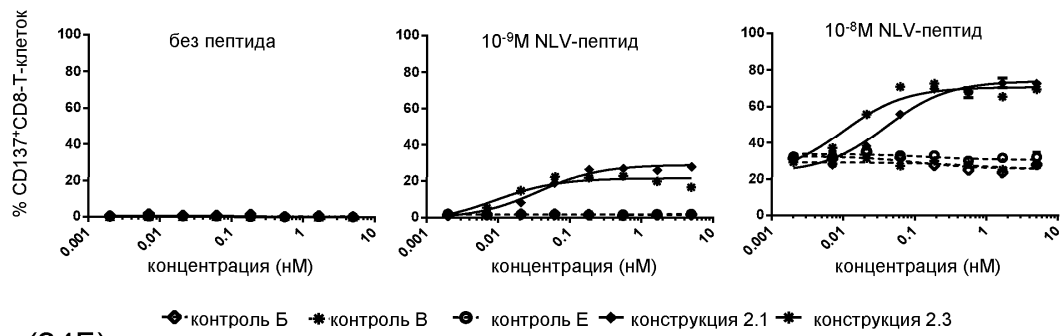


Фиг. 22

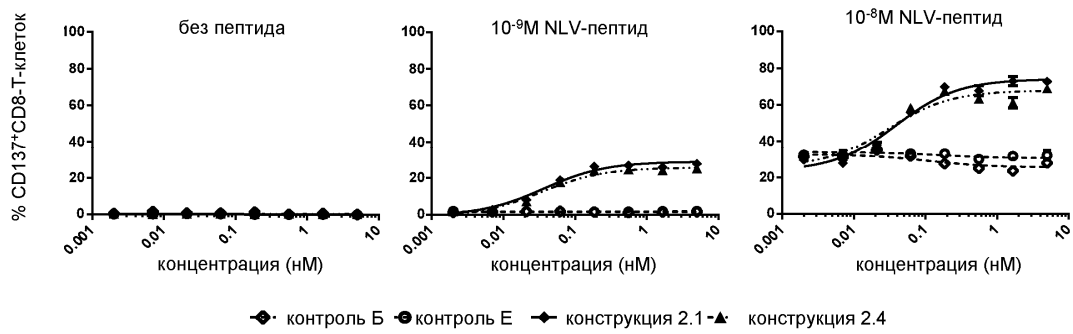


Фиг. 23

(24A)

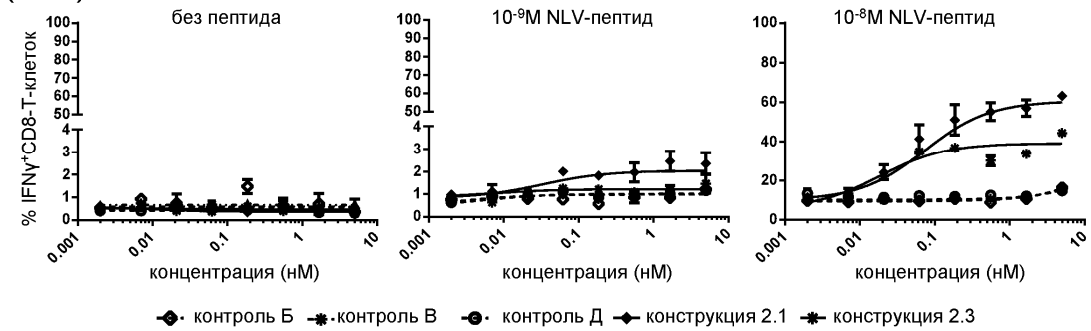


(24Б)

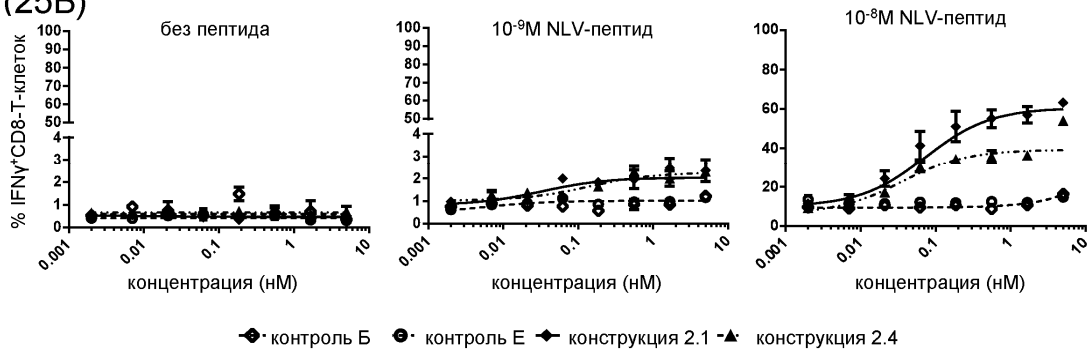


Фиг. 24

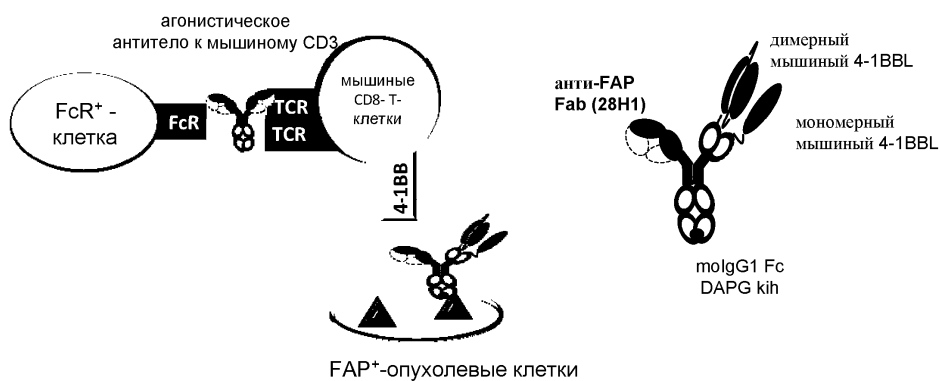
(25A)



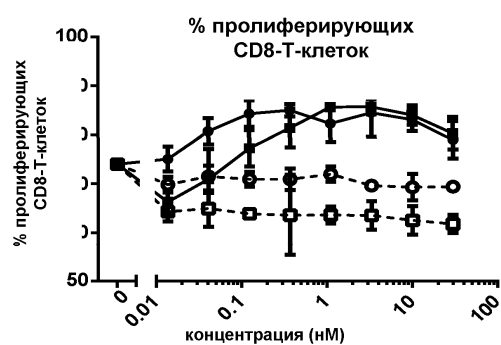
(25Б)



Фиг. 25

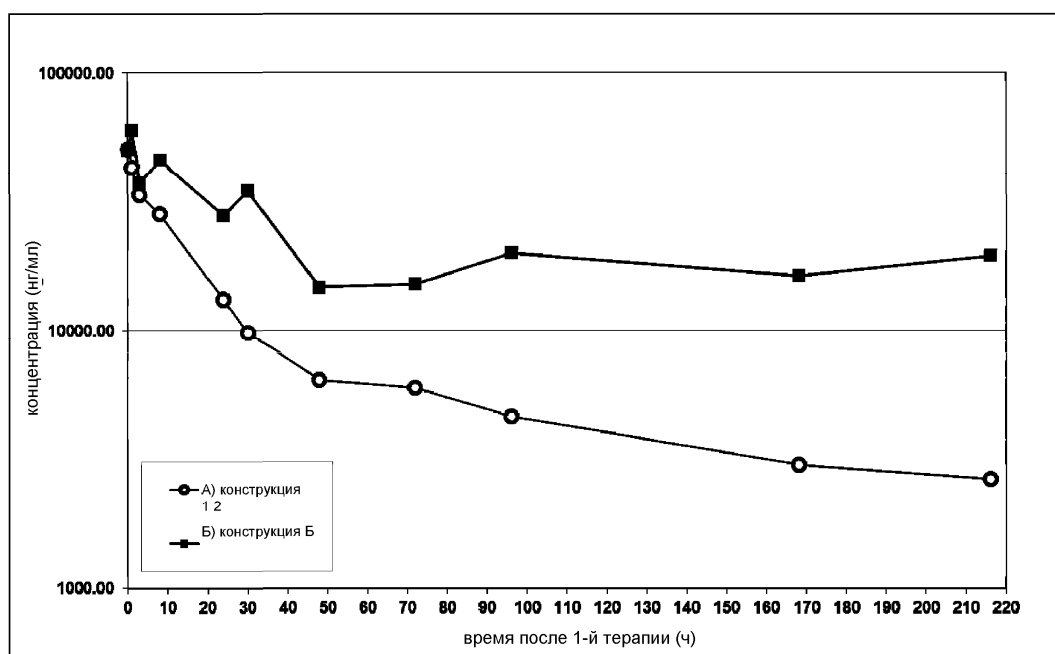


Фиг. 26

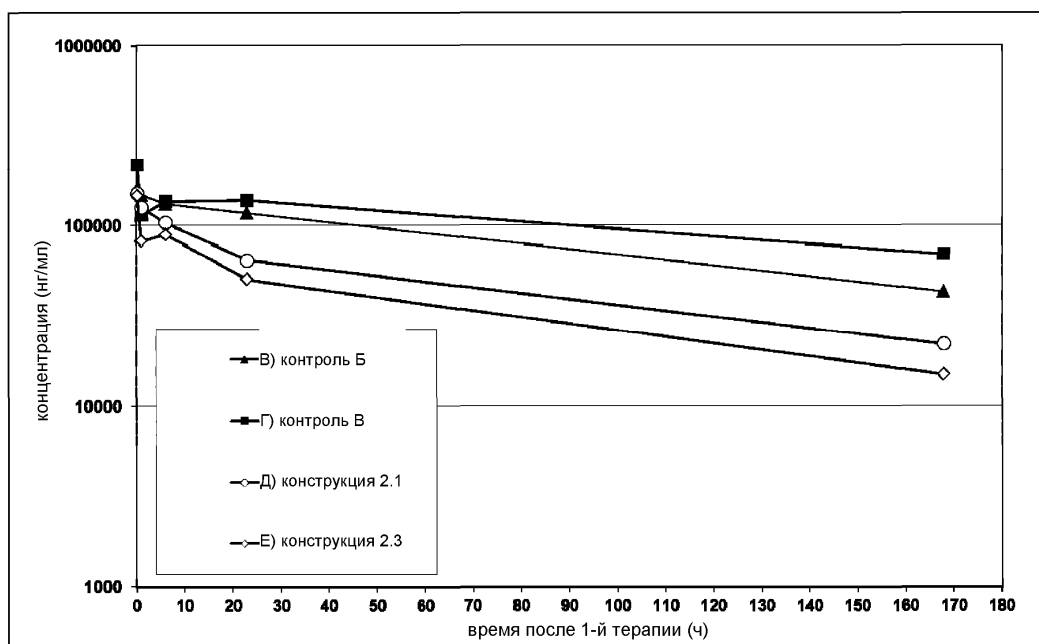


□ контроль M.1 ■ конструкция M.1
 ○ контроль M.2 ● конструкция M.2

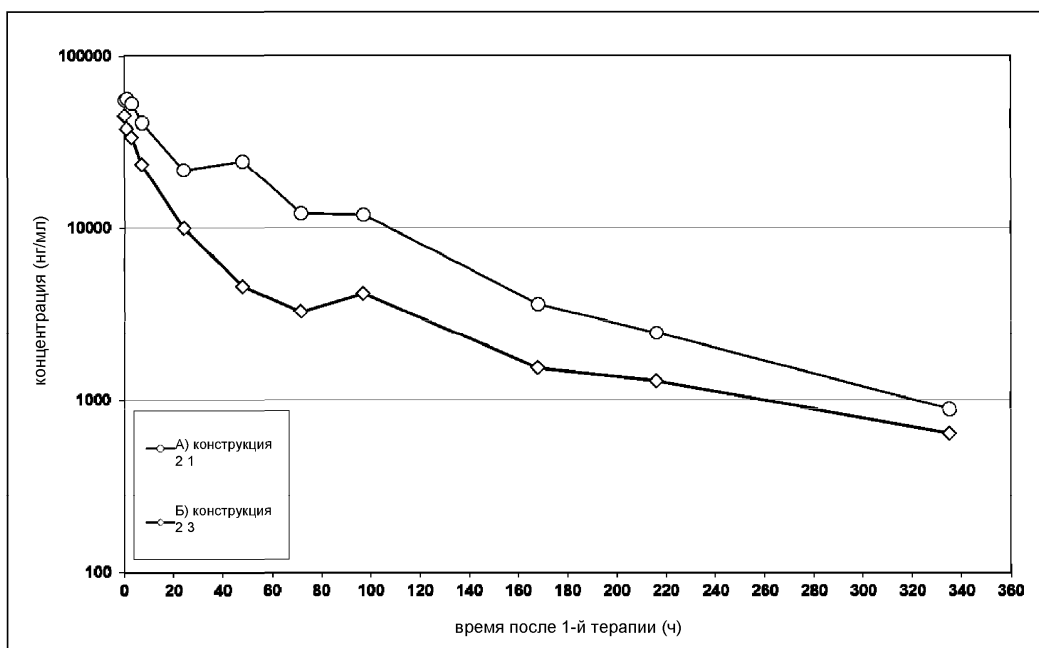
Фиг. 27



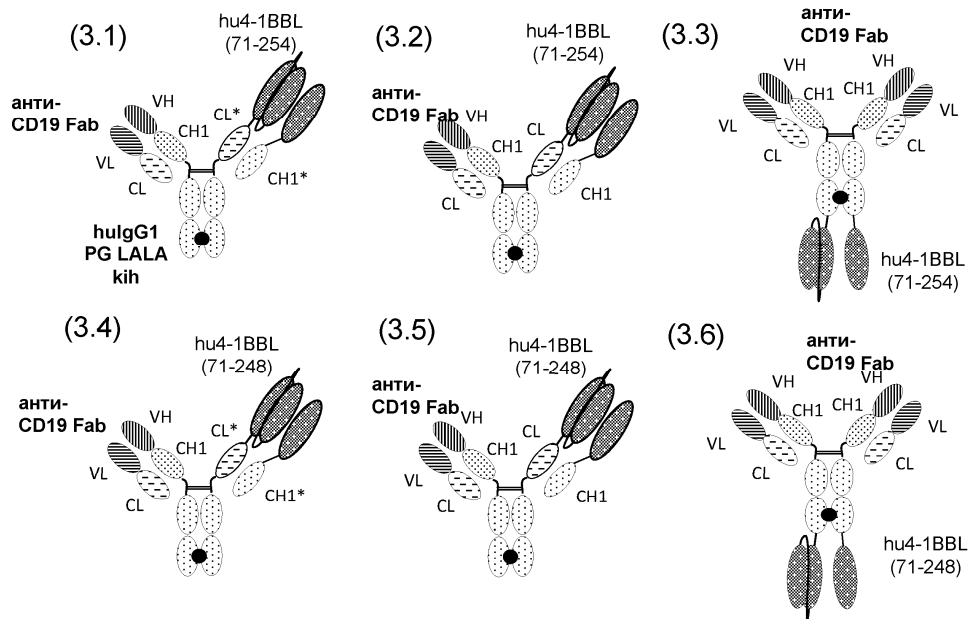
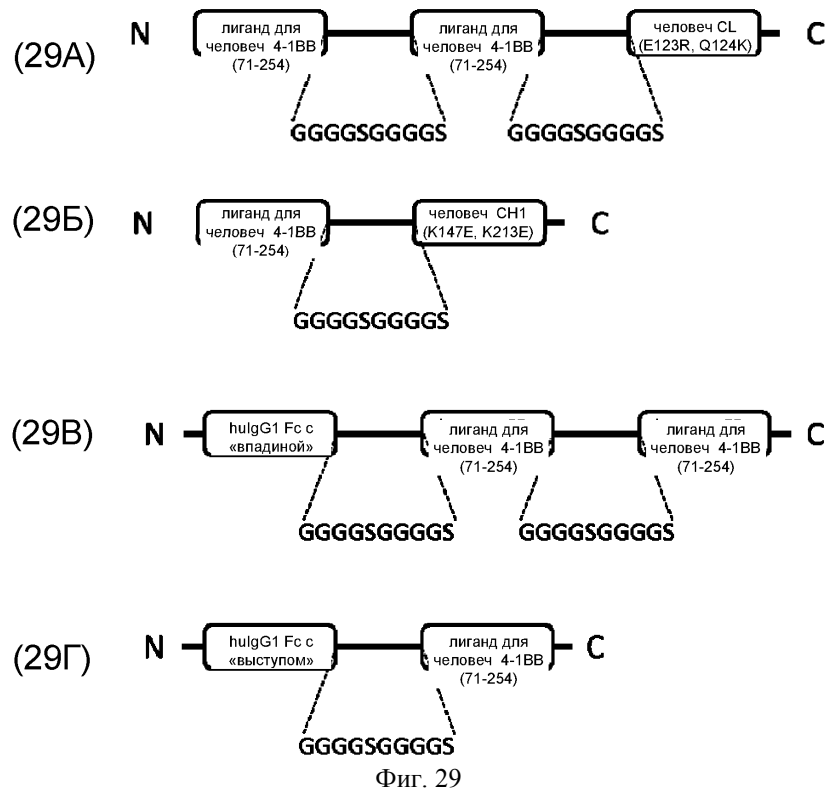
Фиг. 28А



Фиг. 28Б



Фиг. 28В



CDR согласно системе нумерации Кэбота

[illegible]

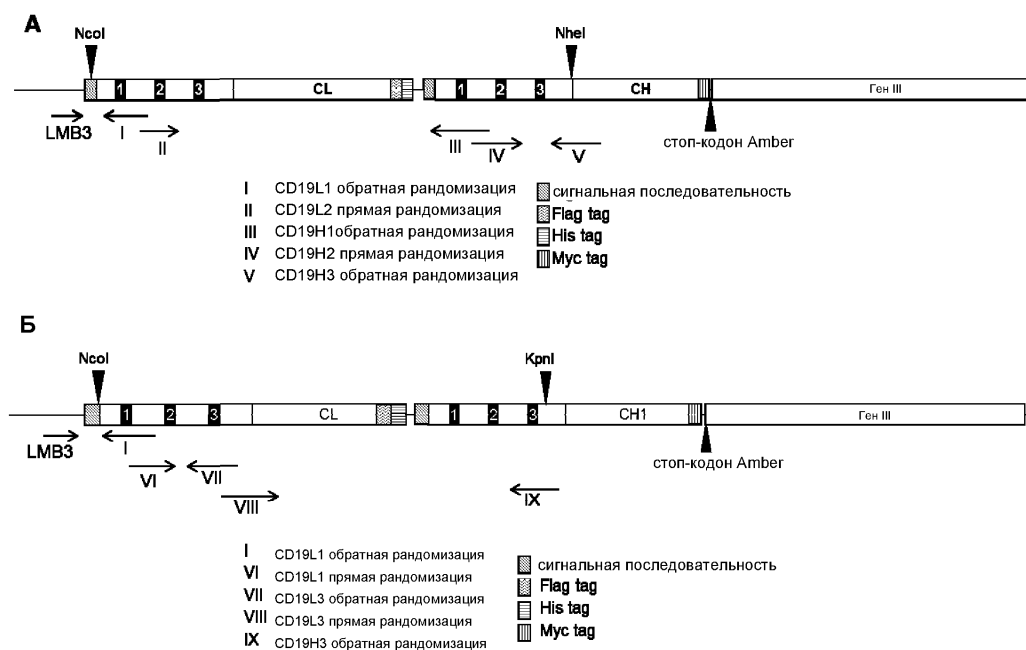
последовательность VL 8B8

[illegible]

последовательность VN 8B8

X обозначает
рандомизированные
положения

ФИГ. 31А

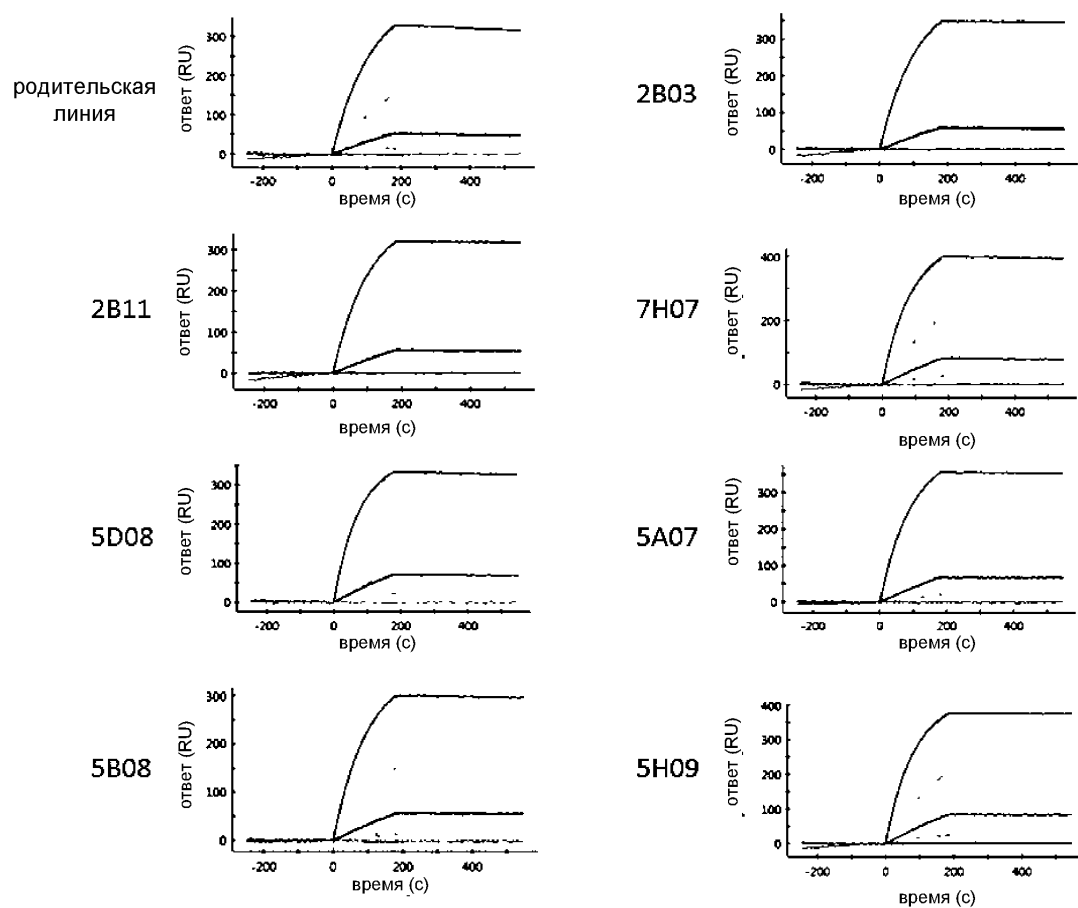


ФИГ. 31Б

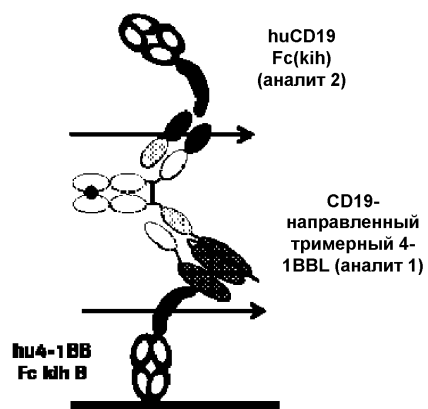
	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD19 LC	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCSQSQLENSNGNTYLMWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSSVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCOLQTHVPFYTFGGQTKLIEIK		
5H09	.S.T.	.	.IDY.V.
7H07	.T.T.	.	.A.I.
2B03	.T.T.	.	.
2B11	.T.T.T.	.	.LED.
5A07	.T.T.	.	.PG.Y.G.
5B08	.T.T.	.	.DSY.N.
5D08	.T.T.	.	.E.

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD19 HC	QQVLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDIYMIVRQAPGGGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCASTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS		
5H09	.	.	.
7H07	.	.	.E
2B03	.T.	.	.PD
2B11	.	.	.PQ
5A07	.	.	.
5B08	.	.	.PQ
5D08	.	.	.E

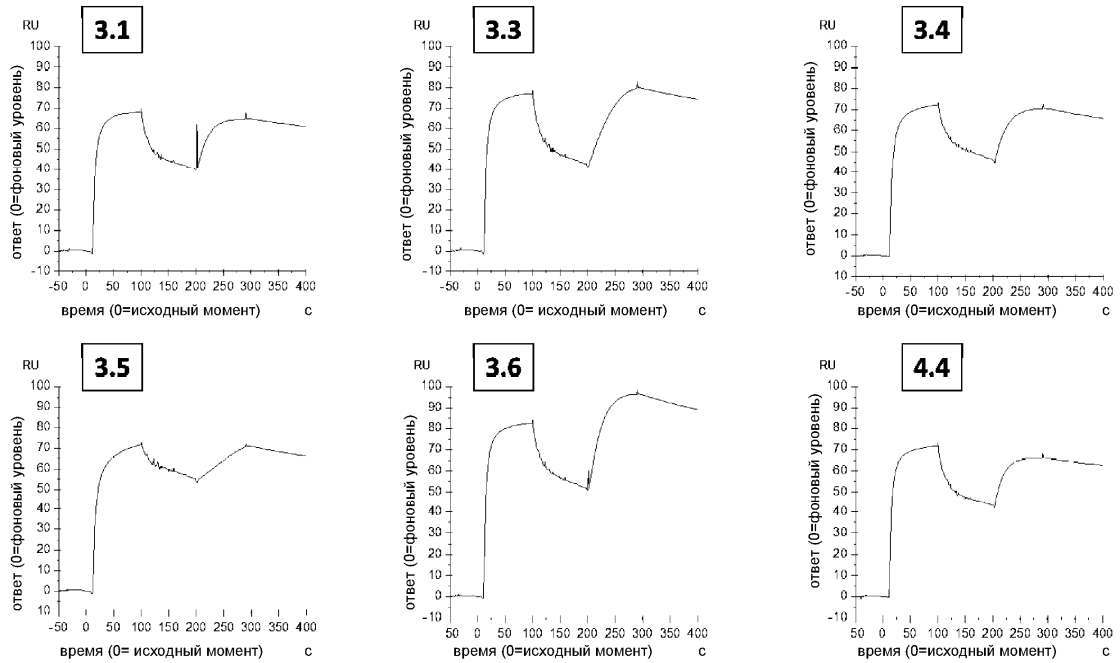
ФИГ. 32



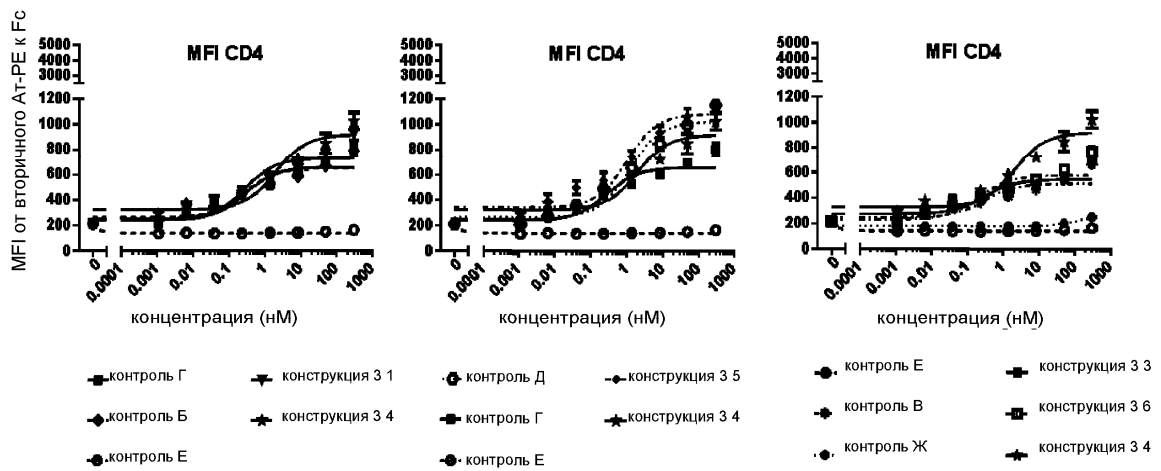
Фиг. 33



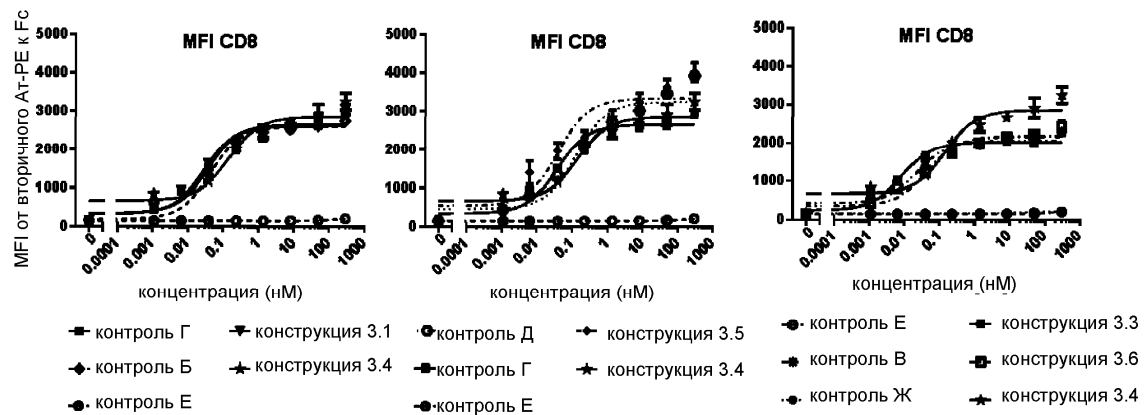
Фиг. 34



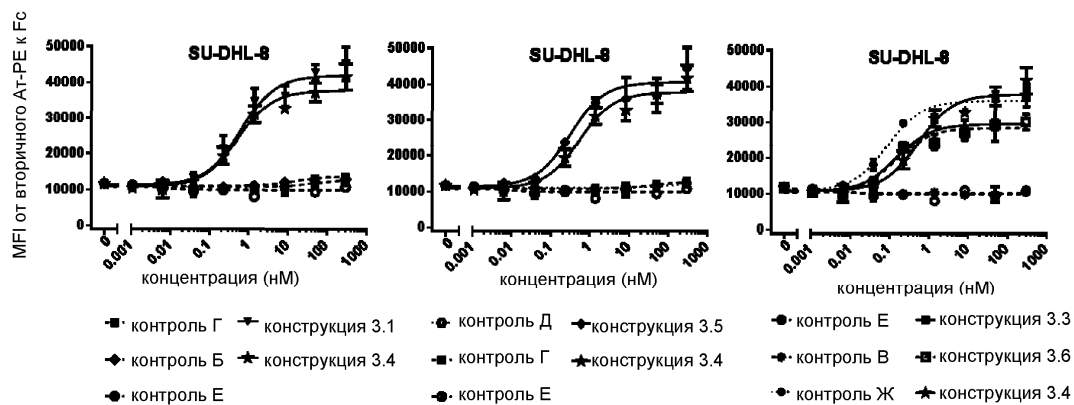
Фиг. 35



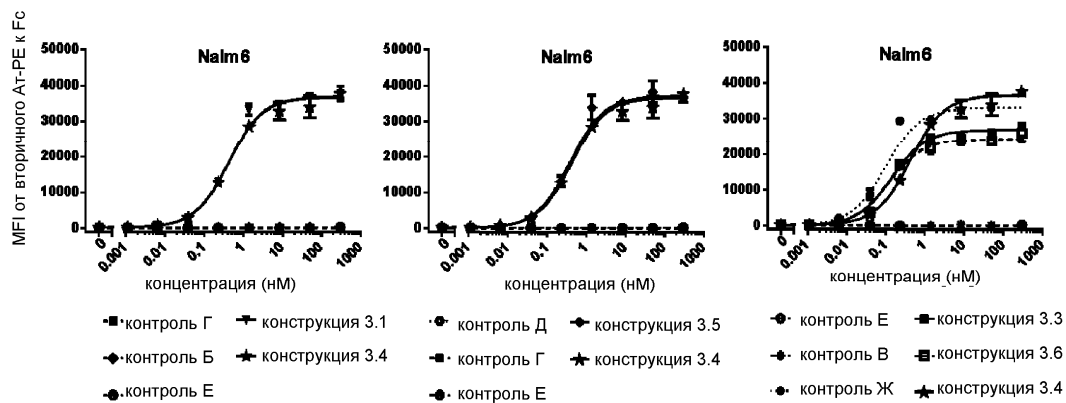
Фиг. 36А



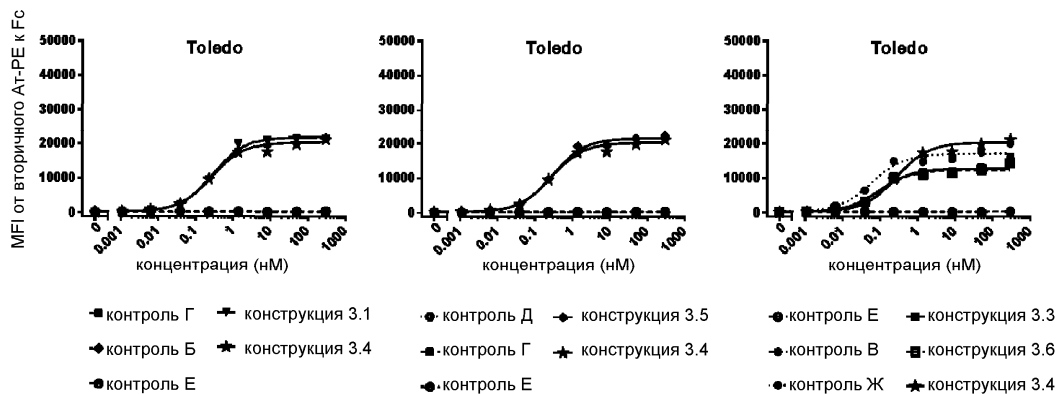
Фиг. 36Б



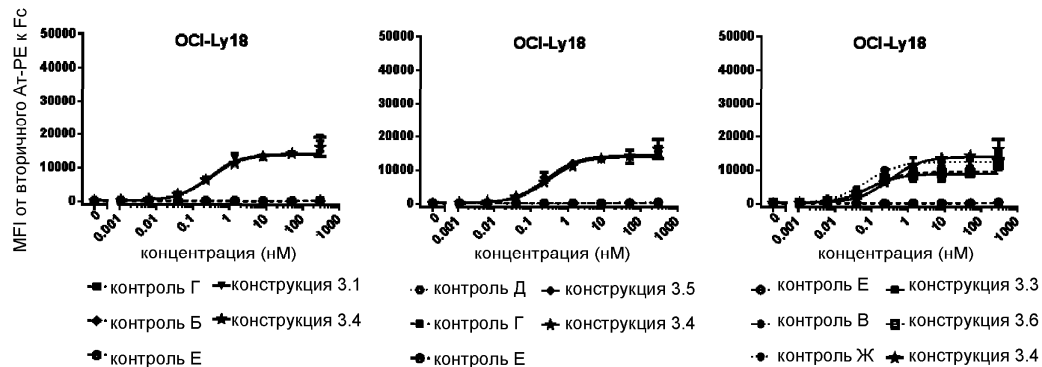
Фиг. 37А



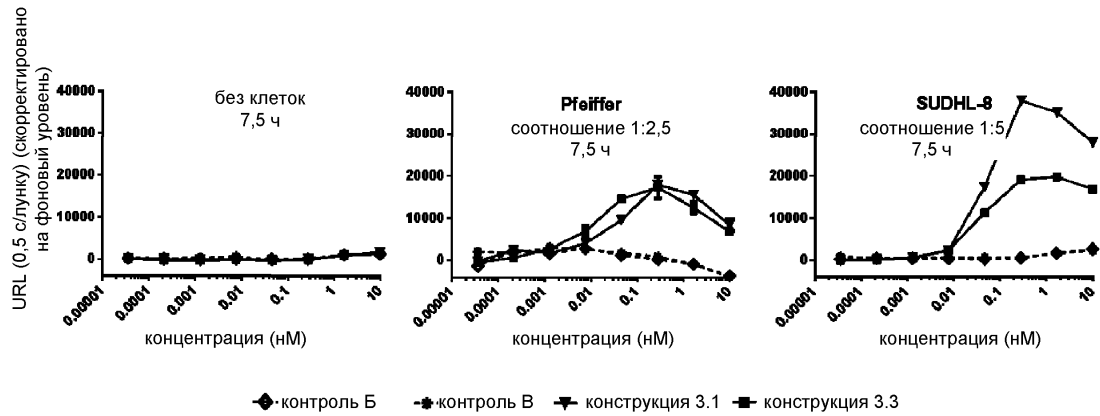
Фиг. 37Б



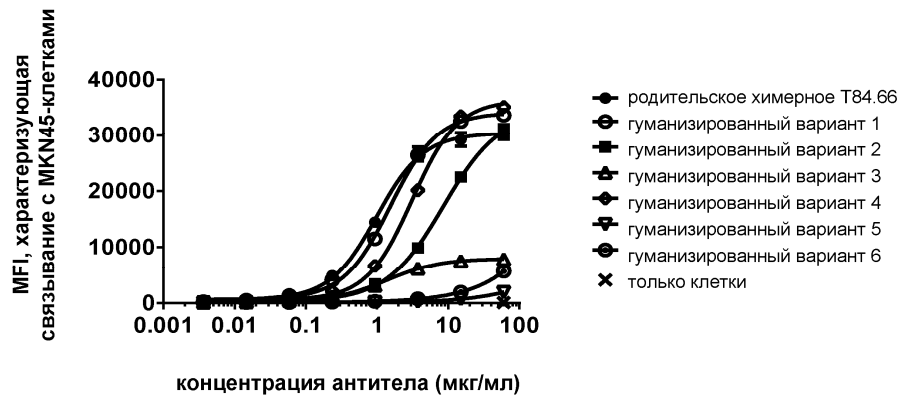
Фиг. 37В



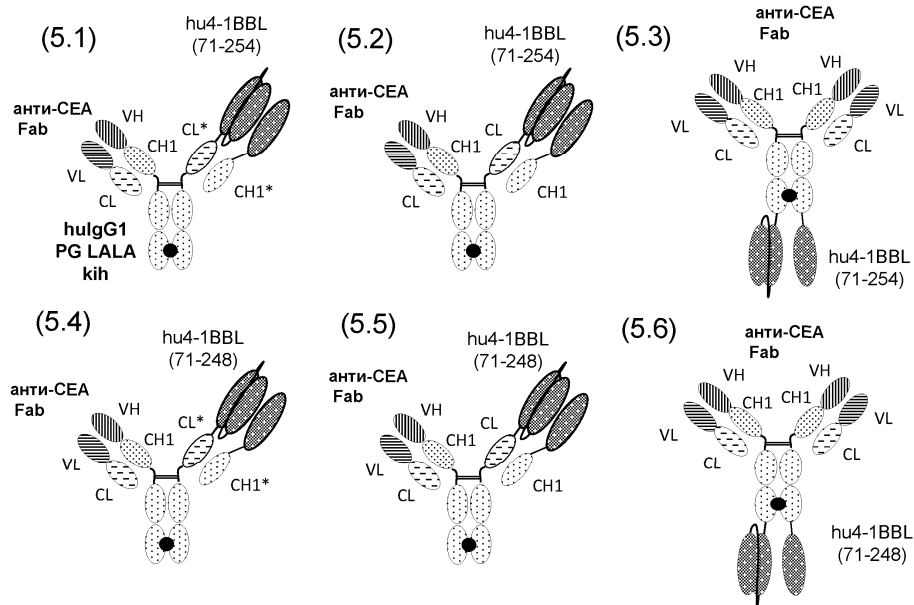
Фиг. 37Г



Фиг. 38

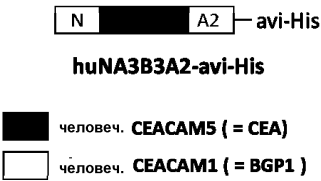


Фиг. 39

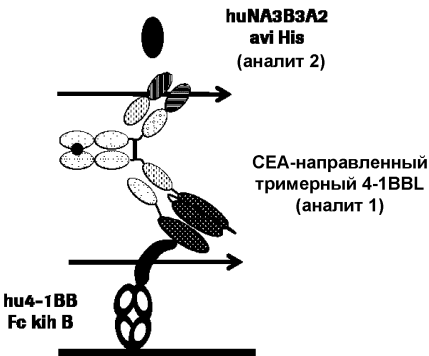


Фиг. 40

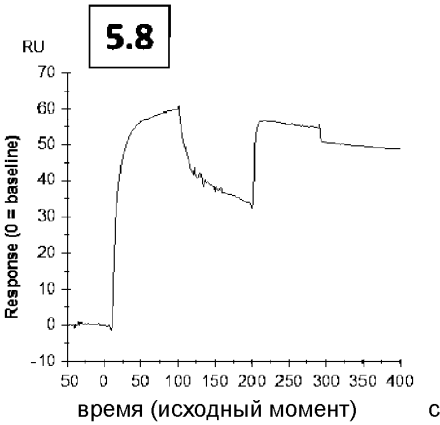
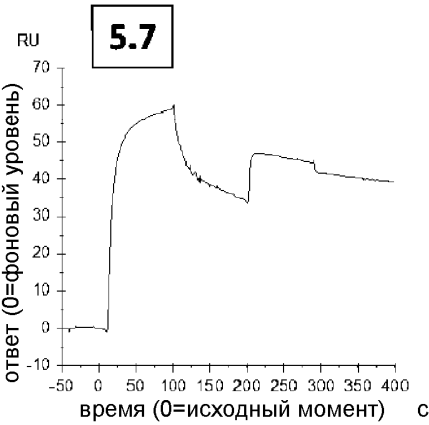
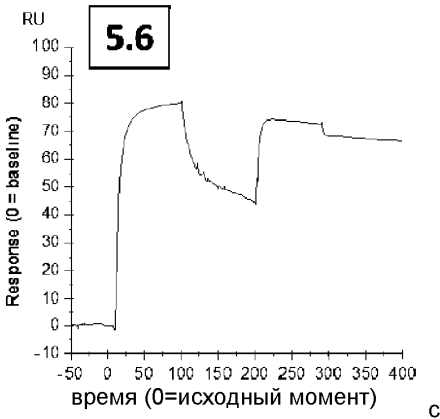
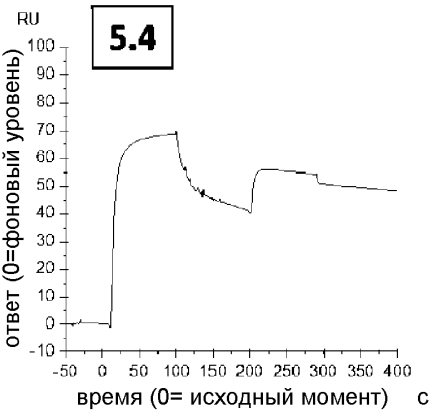
(41A)



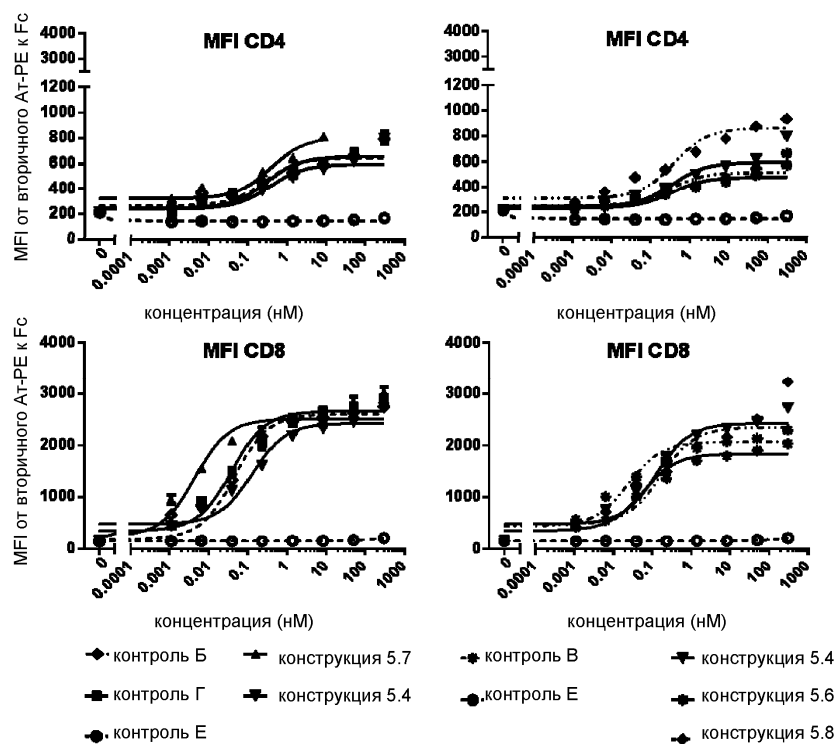
(41Б)



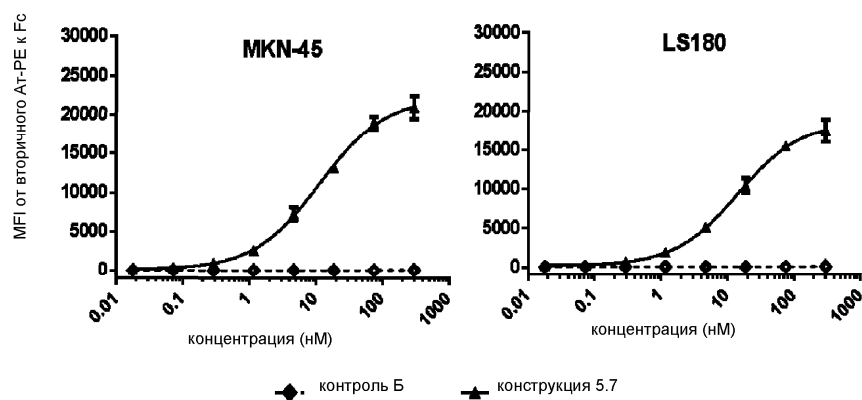
Фиг. 41



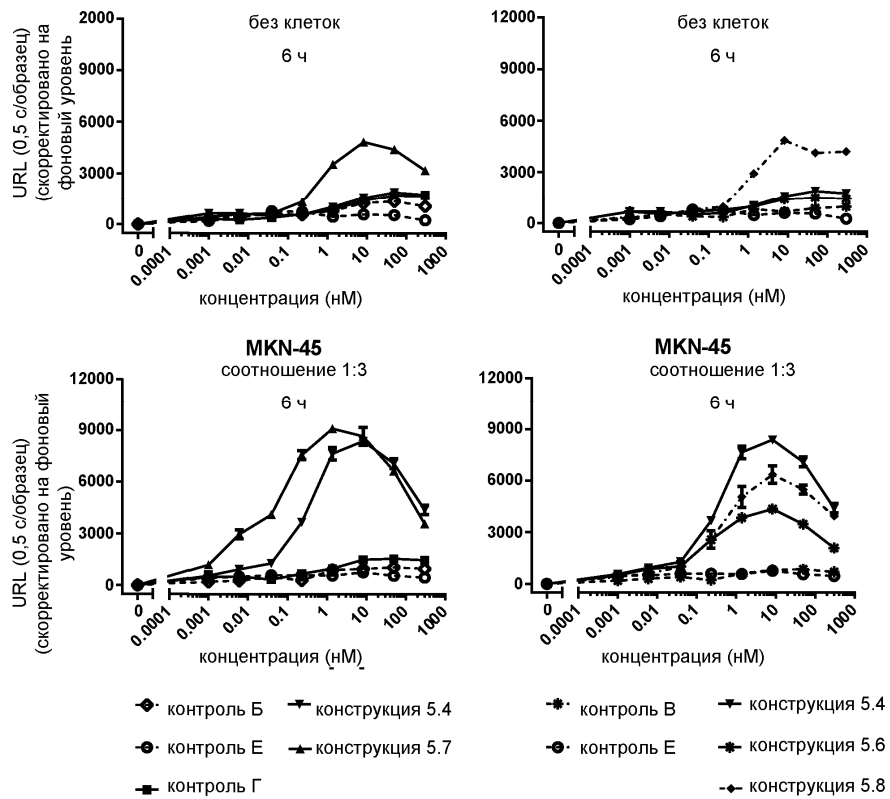
Фиг. 42



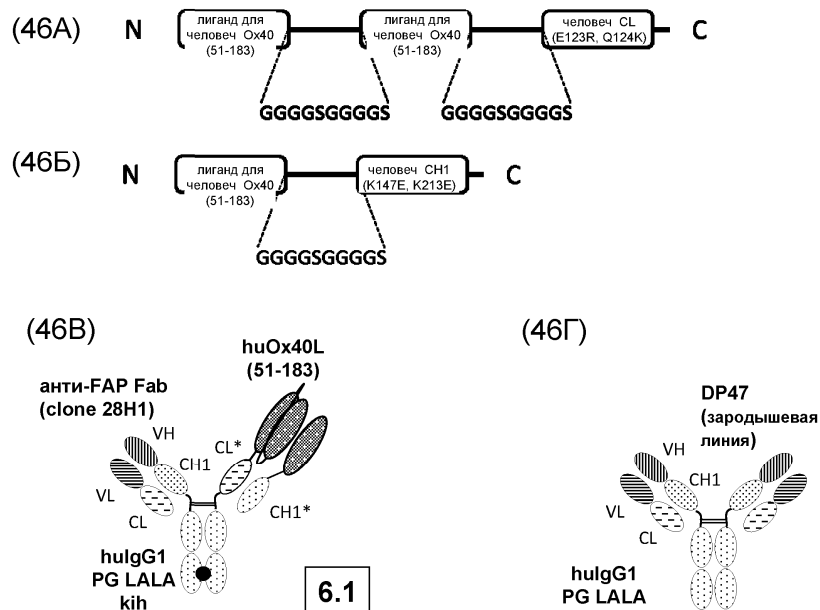
Фиг. 43



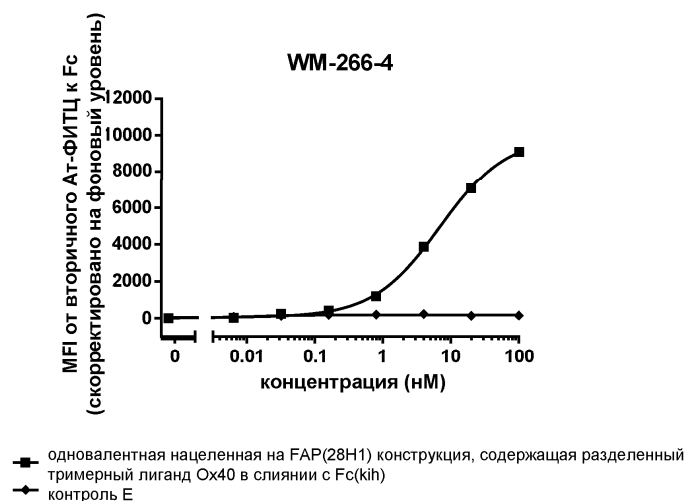
Фиг. 44



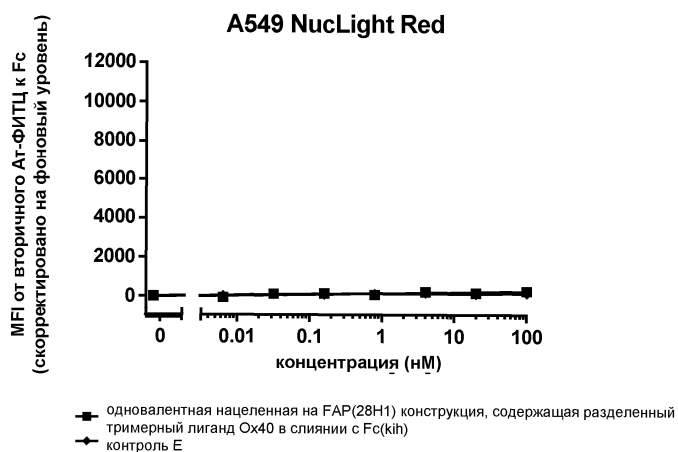
ФИГ. 45



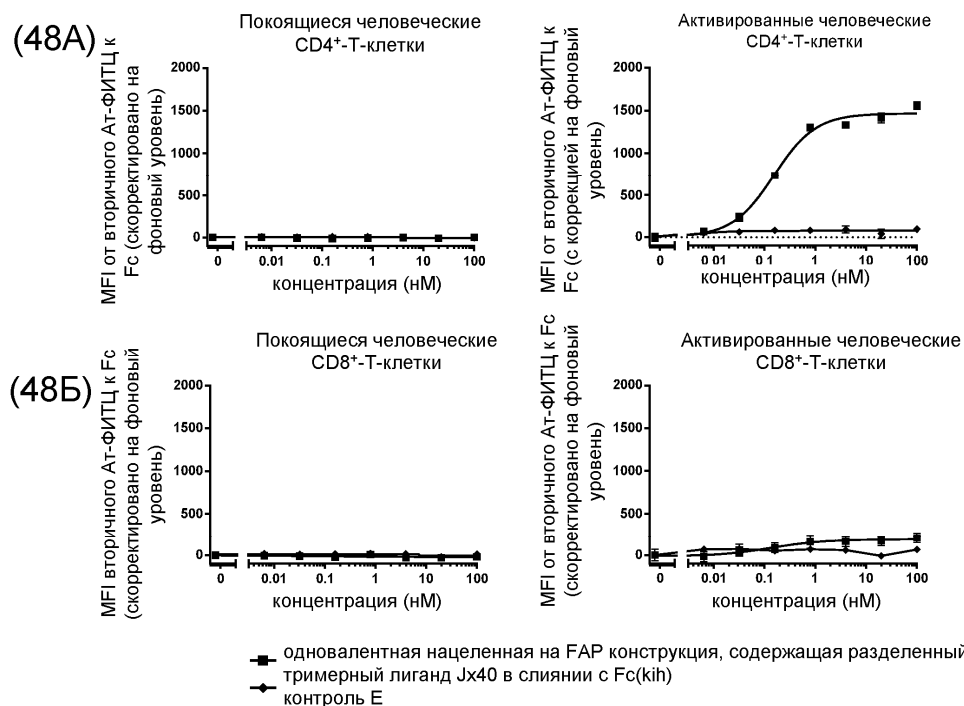
ФИГ. 46



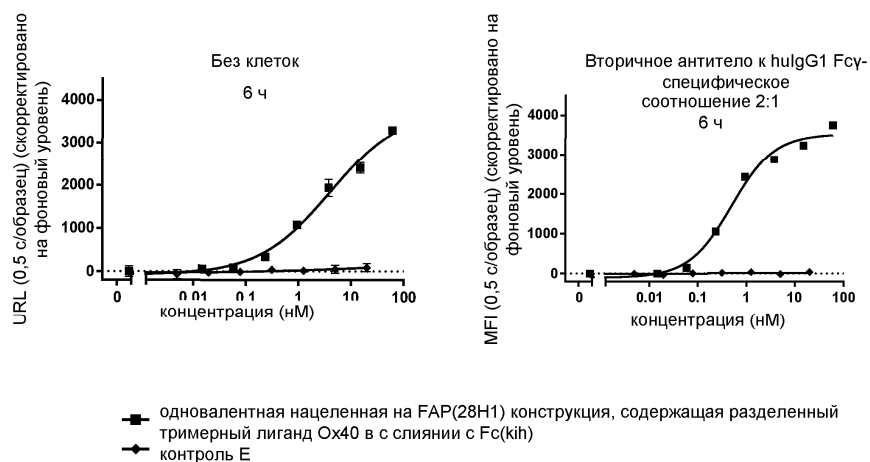
Фиг. 47А



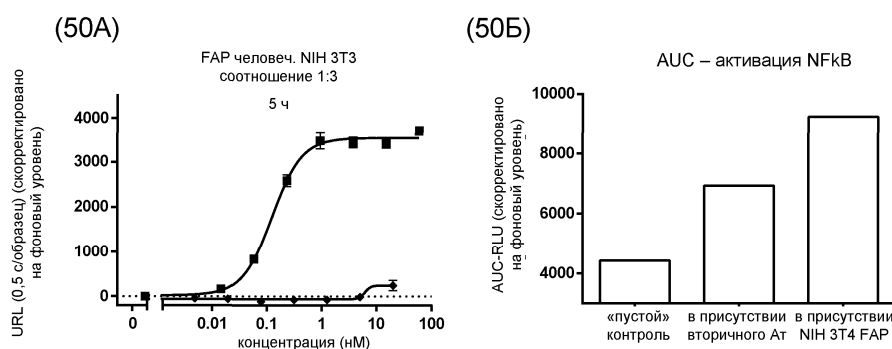
Фиг. 47Б



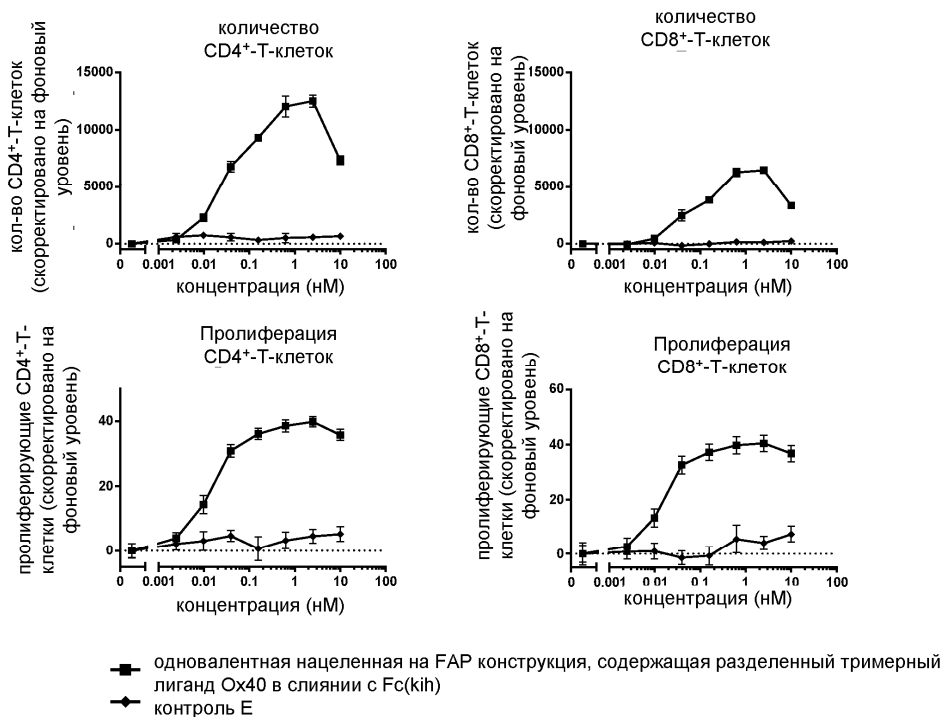
Фиг. 48



Фиг. 49



Фиг. 50



Фиг. 51



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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