

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092907** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2021.04.13

(51) Int. Cl. *C07K 14/705* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.05.28

(54) **МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ИХ  
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ**

(31) 62/677,137

(32) 2018.05.28

(33) US

(86) PCT/US2019/034186

(87) WO 2019/231920 2019.12.05

(71) Заявитель:

**ДРАГОНФЛАЙ ТЕРАПЬЮТИКС,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Чан Грегори П., Чеунг Энн Ф., Ду  
Цзыньянь, Фэллон Дэниел, Гринберг  
Ася, Хани Уилльям, О'Нил Стивен,  
Вэй Ронни, Лунде Брэдли М., Принц  
Бьянка (US)**

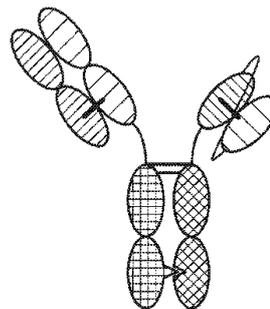
(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) В изобретении предложены усовершенствования антител с одноцепочечным варибельным фрагментом (scFv), мультиспецифических связывающих белков, фармацевтических композиций, содержащих такие белки, и терапевтических способов с использованием таких белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака.

Нацеленный на NK-клетки  
FAB

Нацеленный на опухоль  
scFv



(F3'-формат)

202092907

A1

A1

202092907

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566091EA/085

### МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ИХ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/677137, поданной 28 мая 2018 г., раскрытие которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки для всех целей.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[2] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 28 мая 2019 г., называется DFY-049WO\_SL\_ST25.txt и имеет размер 340 101 байт.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[3] В изобретении предложено усовершенствования антител с одноцепочечным переменным фрагментом (scFv) и мультиспецифического связывающего белка, фармацевтических композиций, содержащих такие белки, и терапевтических способов с использованием таких белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] Рак продолжает оставаться серьезной проблемой для здоровья, несмотря на значительные научно-исследовательские разработки и достижения, о которых сообщается в литературе по лечению данного заболевания. Некоторые из наиболее часто диагностируемых видов рака включают рак простаты, рак молочной груди и рак легких. Рак простаты является наиболее распространенной формой рака у мужчин. Рак молочной груди остается основной причиной смерти женщин. Современные методы лечения этих видов рака не эффективны для всех пациентов и/или могут иметь серьезные нежелательные побочные эффекты. Другие типы рака также по-прежнему сложно лечить с помощью существующих терапевтических методов.

[5] Иммуноterapia рака желательна, поскольку она высокоспецифична и может способствовать разрушению раковых клеток с использованием собственной иммунной системы пациента. Слитые белки, такие как биспецифические активаторы Т-клеток, представляют собой описанные в литературе виды иммунотерапии рака, которые связываются с опухолевыми клетками и Т-клетками для облегчения разрушения опухолевых клеток. В литературе описаны антитела, которые связываются с определенными ассоциированными с опухолью антигенами, и с определенными иммунными клетками. См., Например,, WO 2016/134371 и WO 2015/095412.

[6] Натуральные киллеры (NK) являются компонентом врожденной иммунной системы и составляют примерно 15% циркулирующих лимфоцитов. NK-клетки проникают практически во все ткани и изначально характеризовались своей способностью эффективно

убивать опухолевые клетки без необходимости предварительной сенсibilизации. Активированные НК-клетки убивают клетки-мишени способами, аналогичными цитотоксическим Т-клеткам, - *т.е.*, с помощью цитолитических гранул, содержащих перфорин и гранзимы, а также с помощью метаболического пути рецепторов смерти. Активированные НК-клетки также секретируют воспалительные цитокины, такие как IFN- $\gamma$  и хемокины, которые способствуют привлечению других лейкоцитов в ткань-мишень.

[7] НК-клетки отвечают на сигналы через множество активирующих и ингибирующих рецепторов на своей поверхности. Например, когда НК-клетки сталкиваются со здоровыми аутологичными клетками, их активность ингибируется за счет активации иммуноглобулиноподобных рецепторов киллерных клеток (KIR). Альтернативно, когда НК-клетки встречают чужеродные или раковые клетки, они активируются через свои активирующие рецепторы (*например*, NKG2D, NCR, DNAM1). НК-клетки также активируются константной областью некоторых иммуноглобулинов через рецепторы CD16 на их поверхности. Общая чувствительность НК-клеток к активации зависит от суммы стимулирующих и ингибирующих сигналов. NKG2D представляет собой трансмембранный белок типа II, который экспрессируется практически всеми натуральными клетками-киллерами, где NKG2D служит активирующим рецептором. NKG2D также находится на Т-клетках, где он действует как костимулирующий рецептор. Способность модулировать функцию НК-клеток через NKG2D полезна в различных терапевтических контекстах, включая злокачественные новообразования.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[8] В одном аспекте настоящее изобретение предлагает усовершенствование одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), который связан с константным доменом антитела через шарнирную последовательность. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser. В некоторых других вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser и Thr-Lys-Gly. ScFv может включать переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления ScFv связывает NKG2D или ассоциированный с опухолью антиген. Шарнирная последовательность обеспечивает гибкость связывания с антигеном-мишенью.

[9] В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи образует дисульфидный мостик с переменным доменом легкой цепи. Например, дисульфидный мостик может быть образован между остатком C44 переменного домена тяжелой цепи и остатком C100 переменного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи связан с переменным доменом легкой цепи через гибкий линкер, такой как (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:427). В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи расположен на N-конце переменного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи расположен на C-конце переменного домена легкой цепи.

[10] В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела, связанный с scFv, способен связываться с CD16. В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела включает домен CH2 и домен CH3 антитела IgG, например, антитела IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления мутации вводятся в константный домен антитела, чтобы сделать возможной гетеродимеризацию с другим константным доменом антитела. Например, если константный домен антитела происходит из константного домена IgG1 человека, константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439. В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается одной или более заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

[11] В другом аспекте настоящее изобретение относится к белку, который содержит scFv, связанный с константной областью антитела, описанной выше. В некоторых вариантах осуществления белок включает первый антигенсвязывающий сайт, который включает scFv, связанный с константным доменом антитела; второй антигенсвязывающий сайт, который может принимать формат Fab или scFv, описанный в данном документе; и второй константный домен антитела, связанный со вторым антигенсвязывающим сайтом. В некоторых вариантах осуществления белок является мультиспецифическим, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, вторые антигенсвязывающие сайты связывают ассоциированный с опухолью антиген, а константные области антитела связывают CD16.

[12] В некоторых других вариантах осуществления белок является мультиспецифическим, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает ассоциированный с опухолью антиген, второй антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, а константные области антитела связывают CD16. Константная область антитела, связанная с scFv, может гетеродимеризоваться со второй константной областью антитела. Мультиспецифические связывающие белки в этих вариантах осуществления связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на натуральных клетках-киллерах, и с ассоциированным с опухолью антигеном на раковых клетках. Такие белки могут задействовать более одного типа NK-активирующих рецепторов и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления белки

могут агонизировать НК-клетки у человека. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать НК-клетки у людей и/или у других видов, таких как грызуны и/или яванские макаки.

[13] В другом аспекте настоящее изобретение предлагает мультиспецифический связывающий белок, и этот белок содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ассоциированный с опухолью антиген; второй антигенсвязывающий сайт, который связывает тот же ассоциированный с опухолью антиген, что и первый антигенсвязывающий сайт; третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; и константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. Любой из антигенсвязывающих сайтов может принимать форму Fab или scFv, таких как описанные выше. Предложенный в данном документе мультиспецифический связывающий белок обеспечивает бивалентное взаимодействие с ассоциированным с опухолью антигеном, тем самым стабилизируя ассоциированный с опухолью антиген на поверхности раковых клеток и усиливая цитотоксичность НК-клеток по отношению к раковым клеткам.

[14] В некоторых вариантах осуществления изобретения бивалентное вовлечение ассоциированных с опухолью антигенов мультиспецифическими связывающими белками обеспечивает более сильное связывание мультиспецифических связывающих белков с раковыми клетками, тем самым способствуя более сильному цитотоксическому ответу НК-клеток в отношении раковых клеток, особенно в отношении раковых клеток, экспрессирующих низкий уровень ассоциированного с опухолью антигена.

[15] В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические связывающие белки включают в себя часть Fc-домена антитела, достаточную для связывания CD16, где Fc-домен антитела содержит шарнир и домен CH2 и/или аминокислотные последовательности по меньшей мере на 90% идентичные аминокислотной последовательности 234-332 антитела IgG человека. В константный домен антитела можно ввести мутации, чтобы сделать возможной гетеродимеризацию с другим константным доменом антитела. Например, если константный домен антитела происходит из константного домена IgG1 человека, константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439.

[16] В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается одной или более заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F,

K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

[17] Описанный выше сайт связывания ассоциированного с опухолью антигена может быть сайтом, который связывается с любым ассоциированным с опухолью антигеном, например, ANO1, BCMA, EpCAM, CAIX, CEA, CCR4, CD2, CD123, CD133, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CLAUDIN-18.2, DLL3, EGFR/ERBB1, GD2, IGF1R, HER2, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSMA, мезотелином, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, TROP2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, PD1, 5T4, GPNMB, FR-альфа, PAPP-A, FLT3, GPC3, CXCR4, ROR1, ROR2, HLA-E, PD-L1, VLA4, CD44, CD13, CD15, CD47, CLL1, CD81, CD23, CD79a, CD79b, CD80, CRLF2, SLAMF7, CD138, CA125, NaPi2b, нектин4, ADAM8, ADAM9, SLC44A4, CA19-9, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, ULRA 1, LILRA2, LILRA3, ULRA4, LILRA5 и ULRA6, CCR8, CD7, CTLA4, CX3CR1, ENTPD1, HAVCR2, IL-1R2, PDCD1LG2, TIGIT, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, GEM, NT5E, TNFRSF18, MUC1, P-кадгерин, плексином-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, erbB-3, EDNRB, Tyrp1, CD14, CD163, CSF3R, Siglec-9, ITGAM, VISTA, B7-H4 (VTCN1), CCR1, LRRC25, PTAFR, SIRPB1, TLR2, TLR4, CD300LB, ATP1A3, CCR5, MUC1 (или MUC1-C), плексином-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, AXL, EDNRB, OLR1 и TYRP1.

[18] В другом аспекте настоящее изобретение предлагает белок, содержащий: (a) антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; (b) фрагмент антигенсвязывающего T-клеточного рецептора (TCR); и (c) константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой мультиспецифический связывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент TCR, который связывает ассоциированный с опухолью антиген (ТАА).

[19] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой Fab-фрагмент, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой одноцепочечный фрагмент TCR (scTCR). В некоторых вариантах осуществления фрагмент scTCR связан с полипептидной цепью константной области антитела через шарнир, содержащий Ala-Ser. В некоторых вариантах осуществления шарнир дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly.

[20] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой внеклеточный фрагмент TCR. В некоторых вариантах осуществления scFv связан с полипептидной цепью константной области антитела через шарнир, содержащий Ala-Ser. В некоторых вариантах осуществления шарнир дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly.

[21] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой Fab-фрагмент, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой

внклеточный фрагмент TCR.

[22] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок дополнительно содержит дополнительный антигенсвязывающий фрагмент TCR, который связывает тот же антиген, что и антигенсвязывающий фрагмент TCR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR и дополнительный антигенсвязывающий фрагмент TCR представляют собой внеклеточные фрагменты TCR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR и дополнительный антигенсвязывающий фрагмент TCR представляют собой фрагменты scTCR.

[23] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифического связывающего белка, который содержит scFv, scFv включает переменный домен тяжелой цепи, связанный с переменным доменом легкой цепи через гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит  $(G_4S)_4$ . В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен тяжелой цепи, расположенный на N-конце или C-конце переменного домена легкой цепи.

[24] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, и причем переменный домен тяжелой цепи образует дисульфидный мостик с переменным доменом легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления дисульфидный мостик образован между Cys в положении 44 в переменном домене тяжелой цепи и Cys в положении 100 в переменном домене легкой цепи, причем положения определены по нумерации Кабат. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт, содержащий такой дисульфидный мостик, представляет собой scFv.

[25] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт связывается с NKG2D у человека.

[26] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид из ассоциированного с опухолью антигена, презентованного главным комплексом гистосовместимости (MHC).

[27] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид ELAVL4, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 425, презентованный HLA-A\*02:01:48. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 351, и переменный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 352. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 351 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 353) переменного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит

вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 352 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 354) вариабельного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 349, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 350.

[28] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид инсулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426, презентованный HLA-A\*02:01:48. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 357, и вариабельный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 358. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 357 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 359) вариабельного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 358 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 360) вариабельного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 355, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 356.

[29] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид TERT, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 340, презентованный HLA-A\*02:01:48. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 363, и вариабельный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 364. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 363 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 365) вариабельного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 364 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 366) вариабельного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления

антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 361, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 362.

[30] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид ERBB2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341, презентованный HLA-A\*02. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 430, и переменный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 431. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 430 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 367) переменного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 431 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 368) переменного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 428, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 429.

[31] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид WT1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, презентованный HLA-A\*02. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 434, и переменный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 435. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 434 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 369) переменного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 435 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 370) переменного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 432, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 433.

[32] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR

связывает пептид WT1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, презентованный HLA-A\*02. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 438, и переменный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 439. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 438 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 371) переменного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 439 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 372) переменного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 436, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 437.

[33] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид MAGE-A3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 343, презентованный HLA-A1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 375, и переменный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 376. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 375 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 377) переменного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 376 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 378) переменного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 373, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 374.

[34] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид MART1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 381, и переменный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID

NO: 382. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 381 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 383) переменного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 382 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 384) переменного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 379, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 380.

[35] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид BIRC5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 346, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 442, и переменный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 443. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 442 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 389) переменного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 443 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 390) переменного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 440, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 441.

[36] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид BIRC5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 346, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 444, и переменный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 445. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 444 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID

NO: 391) вариабельного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 445 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 392) вариабельного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 385, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 386.

[37] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид PRAME, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 347, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 395, и вариабельный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 396. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 395 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 397) вариабельного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 396 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 398) вариабельного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 393, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 394.

[38] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид PRAME, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 347, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 401, и вариабельный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 402. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 401 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 403) вариабельного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 402 и/или включает

аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 404) переменного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 399, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 400.

[39] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид PRAME, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 347, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 407, и переменный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 408. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 407 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 409) переменного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 408 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 410) переменного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 405, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 406.

[40] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид NY-ESO-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 348, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 413, и переменный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 414. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 413 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 415) переменного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 414 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 416) переменного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 411, и аминокислотную последовательность бета-

цепи, приведенную в SEQ ID NO: 412.

[41] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид NY-ESO-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 348, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 418, и вариабельный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 414. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 418 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 415) вариабельного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 414 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 416) вариабельного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 417, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 412.

[42] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид NY-ESO-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 348, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 421, и вариабельный домен бета-цепи, относящийся к SEQ ID NO: 422. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 421 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\alpha$  (SEQ ID NO: 423) вариабельного домена альфа-цепи. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичный SEQ ID NO: 422 и/или включает аминокислотную последовательность, идентичную последовательности CDR3 $\beta$  (SEQ ID NO: 424) вариабельного домена бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит аминокислотную последовательность альфа-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 419, и аминокислотную последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 420.

[43] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид SSX2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий

фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, включающий последовательность CDR3 $\alpha$ , приведенную в SEQ ID NO: 387. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен бета-цепи, включающий последовательность CDR3 $\beta$ , приведенную в SEQ ID NO: 388.

[44] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок содержит константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, где константная область антитела или ее часть, достаточная для связывания CD16, содержит шарнирную область и домен CH2 антитела IgG1 человека. В определенных вариантах осуществления константная область антитела или ее часть, достаточная для связывания CD16, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека. В константный домен антитела можно ввести мутации, чтобы сделать возможной гетеродимеризацию с другим константным доменом антитела. Например, если константный домен антитела происходит из константного домена IgG1 человека, константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439. В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается одной или более заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

[45] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных полипептидов или белков, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D (также называемый «сайтом связывания NKG2D»), сайт связывания NKG2D может включать переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:1, такой что имеет аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:1, и/или включает в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:307), CDR2 (SEQ ID NO:4) и CDR3 (SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:308) из SEQ ID NO:1. Переменный домен тяжелой цепи, связанный с SEQ ID NO:1, может быть соединен с множеством переменных доменов легкой цепи для образования NKG2D-связывающего сайта. Например, сайт связывания NKG2D, который включает переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:1, может дополнительно включать переменный домен легкой цепи, выбранный из любой

из последовательностей, относящихся к SEQ ID NO: 2, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 и 43. Например, сайт связывания NKG2D включает в себя переменный домен тяжелой цепи с аминокислотными последовательностями по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичными SEQ ID NO:1, и переменный домен легкой цепи с аминокислотными последовательностями по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичными любой последовательности, выбранной из SEQ ID NO:2, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 и 43.

[46] Альтернативно сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:44, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:48. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:44 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:45 или SEQ ID NO:309), CDR2 (SEQ ID NO:46) и CDR3 (SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:310) из SEQ ID NO:44. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:48 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:49), CDR2 (SEQ ID NO:50) и CDR3 (SEQ ID NO:51) из SEQ ID NO:48.

[47] В других вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:52, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:56. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:52 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:53 или SEQ ID NO:311), CDR2 (SEQ ID NO:54) и CDR3 (SEQ ID NO:55 или SEQ ID NO:312) из SEQ ID NO:52. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:56 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:57), CDR2 (SEQ ID NO:58) и CDR3 (SEQ ID NO:59) из SEQ ID NO:56.

[48] Альтернативно, сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, связанный с SEQ ID NO:60, и переменный домен легкой цепи, связанный с SEQ ID NO:61, такие что имеют аминокислотные последовательности по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичные SEQ ID NO:60 и по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичные SEQ ID NO:61, соответственно.

[49] В другом варианте осуществления сайт связывания NKG2D может включать переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 62, и переменный домен

легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 66, например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:62 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные CDR1 (SEQ ID NO:63), CDR2 (SEQ ID NO:64) и CDR3 (SEQ ID NO:65) из SEQ ID NO:62. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:66 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:67), CDR2 (SEQ ID NO:68) и CDR3 (SEQ ID NO:69) из SEQ ID NO:66.

[50] Сайт связывания NKG2D в некоторых вариантах осуществления может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:70, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:74. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:70 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:313), CDR2 (SEQ ID NO:72) и CDR3 (SEQ ID NO:73 или SEQ ID NO:314) из SEQ ID NO:70. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:74 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:75), CDR2 (SEQ ID NO:76) и CDR3 (SEQ ID NO:77) из SEQ ID NO:74.

[51] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:78, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:82. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:78 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:79 или SEQ ID NO:315), CDR2 (SEQ ID NO:80) и CDR3 (SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:316) из SEQ ID NO:78. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:82 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:83), CDR2 (SEQ ID NO:84) и CDR3 (SEQ ID NO:85) из SEQ ID NO:82.

[52] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:86, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:90. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90%

(например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:86 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:87 или SEQ ID NO:317), CDR2 (SEQ ID NO:88) и CDR3 (SEQ ID NO:89 или SEQ ID NO:318) из SEQ ID NO:86. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:90 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:91), CDR2 (SEQ ID NO:92) и CDR3 (SEQ ID NO:93) из SEQ ID NO:90.

[53] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:94, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:98. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:94 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:95 или SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96) и CDR3 (SEQ ID NO:97 или SEQ ID NO:320) из SEQ ID NO:94. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:98 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100) и CDR3 (SEQ ID NO:101) из SEQ ID NO:98.

[54] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:102, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:106. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:102 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:103 или SEQ ID NO:313), CDR2 (SEQ ID NO:104) и CDR3 (SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:321) из SEQ ID NO:102. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:106 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:107), CDR2 (SEQ ID NO:108) и CDR3 (SEQ ID NO:109) из SEQ ID NO:106.

[55] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:322, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:98. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным

SEQ ID NO:322 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:95 или SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96) и CDR3 (SEQ ID NO:323 или SEQ ID NO:324) из SEQ ID NO:322. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:98 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100) и CDR3 (SEQ ID NO:101) из SEQ ID NO:98.

[56] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:325, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:98. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:325 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:95 или SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96) и CDR3 (SEQ ID NO:326 или SEQ ID NO:327) из SEQ ID NO:325. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:98 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100) и CDR3 (SEQ ID NO:101) из SEQ ID NO:98.

[57] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:328, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:98. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:328 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:95 или SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96) и CDR3 (SEQ ID NO:329 или SEQ ID NO:330) из SEQ ID NO:328. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:98 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100) и CDR3 (SEQ ID NO:101) из SEQ ID NO:98.

[58] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:331, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:98. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:331 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные

последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:95 или SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96) и CDR3 (SEQ ID NO:332 или SEQ ID NO:333) из SEQ ID NO:331. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:98 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100) и CDR3 (SEQ ID NO:101) из SEQ ID NO:98.

[59] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:334, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:98. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:334 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:95 или SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96) и CDR3 (SEQ ID NO:335 или SEQ ID NO:336) из SEQ ID NO:334. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:98 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100) и CDR3 (SEQ ID NO:101) из SEQ ID NO:98.

[60] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:337, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO:98. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:337 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:95 или SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96) и CDR3 (SEQ ID NO:338 или SEQ ID NO:339) из SEQ ID NO:337. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO:98 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100) и CDR3 (SEQ ID NO:101) из SEQ ID NO:98.

[61] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, связанный с SEQ ID NO:110, и переменный домен легкой цепи, связанный с SEQ ID NO:111, такие что имеют аминокислотные последовательности по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичные SEQ ID NO:110 и по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичные SEQ ID NO:111, соответственно. В некоторых вариантах осуществления сайт

связывания NKG2D может включать в себя вариабельный домен тяжелой цепи, связанный с SEQ ID NO:112, и вариабельный домен легкой цепи, связанный с SEQ ID NO:113, такие что имеют аминокислотные последовательности по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичные SEQ ID NO:112 и по меньшей мере на 90% (*например*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичные SEQ ID NO:113, соответственно.

[62] Также предложены составы, содержащие любой из белков, описанных в настоящем документе; клетки, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, экспрессирующих белки, и способы усиления гибели опухолевых клеток с использованием белков.

[63] В другом аспекте изобретения предложен способ лечения рака у пациента. Способ включает в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящем документе. Рак, подлежащий лечению, может включать острый миелоидный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз, В-клеточную лимфому, рак мочевого пузыря, рак молочной груди, колоректальный рак, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, рак пищевода, саркомы Юинга, фолликулярную лимфому, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, опухоли стромы желудочно-кишечного тракта, глиобластомы, рак головы и шеи, меланомы, мезотелиомы, множественные миеломы, миелодиспластический синдром, почечно-клеточную карциному, нейробластомы, немелкоклеточный рак легких, нейроэндокринные опухоли, рак яичников и рак поджелудочной железы, рак простаты, саркомы, мелкоклеточный рак легких, Т-клеточную лимфому, рак яичка, карциному вилочковой железы, рак щитовидной железы, уротелиальный рак, злокачественные заболевания, инфильтрованные миелоидными клетками-супрессорами, злокачественные заболевания, инфильтрованные Т-регуляторными клетками, злокачественные заболевания с накоплением внеклеточного матрикса, злокачественные заболевания с высокими уровнями реактивной стромы и злокачественные заболевания с неоангиогенезом.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[64] **На ФИГ. 1А-1С** проиллюстрированы три типичных формата мультиспецифического связывающего белка, который включает scFv, связанный с константной областью/доменом антитела через шарнир. **ФИГ. 1А** показывает триспецифическое антитело (TriNKET), которое содержит нацеленный на опухоль scFv или одноцепочечный фрагмент TCR (scTCR), нацеленный на NKG2D Fab, и константную область/домен гетеродимеризованного антитела («домен CD»), который связывает CD16. Формат антитела называется в данном документе F3'-TriNKET. **ФИГ. 1В** представляет собой антитело, которое содержит scFv, нацеленный на NKG2D, Fab, нацеленный на опухоль, или внеклеточный фрагмент TCR, и константную область гетеродимеризованного антитела. Формат антитела называется в данном документе F3-TriNKET. **ФИГ. 1С** представляет собой антитело, которое содержит scFv, нацеленный на NKG2D, scFv,

нацеленный на опухоль, или фрагмент scTCR, и константную область гетеродимеризованного антитела. В некоторых иллюстративных TriNKET мутации гетеродимеризации в домене CD, связанном с антигенсвязывающим сайтом, который связывает NKG2D, включают K360E и K409W; мутации гетеродимеризации на противоположном CD включают Q347R, D399V и F405T.

[65] **На ФИГ. 2А** показано триспецифическое антитело (TriNKET), где первый антигенсвязывающий сайт или антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает ассоциированный с опухолью антиген (такой как показанный в данном документе ВСМА) или его пептид, презентованный главным комплексом гистосовместимости (МНС); второй антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D; и константная область гетеродимеризованного антитела связывает CD16. В некоторых иллюстративных TriNKET мутации гетеродимеризации в домене CD, связанном с антигенсвязывающим сайтом, который связывает NKG2D, включают K360E и K409W; мутации гетеродимеризации на противоположном CD включают Q347R, D399V и F405T.

[66] **На ФИГ. 2В-2С** показано триспецифическое антитело (TriNKET), где первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт или первый антигенсвязывающий фрагмент TCR и второй антигенсвязывающий фрагмент TCR связывают один и тот же ассоциированный с опухолью антиген (такой как показанный в данном документе ВСМА) или тот же пептид из опухоли-ассоциированного антигена, презентованный тем же МНС; третий сайт связывания антигена связывает NKG2D; и константная область гетеродимеризованного антитела связывает CD16. Эти форматы антител упоминаются в данном документе как F4-TriNKET. В некоторых иллюстративных TriNKET мутации гетеродимеризации в домене CD, связанном с антигенсвязывающим сайтом, который связывает NKG2D, включают K360E и K409W; мутации гетеродимеризации на противоположном CD включают Q347R, D399V и F405T. **На ФИГ. 2В** показано, что первые два антигенсвязывающих сайта представлены в формате Fab. **На ФИГ. 2С** показано, что первые два антигенсвязывающих сайта представлены в формате scFv.

[67] **На ФИГ. 3А-3С** показаны результаты ускоренного исследования стабильности, проведенного при 37 °С, в котором было установлено, что F3'-TriNKET стабилен в течение 4 недель.

[68] **На ФИГ. 4** показано, что очищенный F3'-TriNKET был стабилен при низком уровне pH.

[69] **На ФИГ. 5А и ФИГ. 5В** показано, что очищенный F3'-TriNKET был стабилен после 5 циклов замораживания-оттаивания, независимо от pH (на ФИГ. 5А показаны циклы замораживания-оттаивания в PBS, а на ФИГ. 5В показаны циклы замораживания-оттаивания в цитрате при pH 5,5).

[70] **На ФИГ. 6** показаны столбчатые графики условий принудительной деградации, в которых F3'-TriNKET оставался стабильным.

[71] **На ФИГ. 7** показано связывание F3'-TriNKET-HER2 или трастузумаба с

клетками HER2+ Colo-201.

[72] **На ФИГ. 8** показано связывание моноклонального антитела F3'-TriNKET-CD33 или CD33 с CD33, экспрессируемым на клетках Molm-13.

[73] **На ФИГ. 9 и ФИГ. 10** показано опосредованную F3'-TriNKET-HER2 цитотоксичность в отношении клеточной линии 786-0 с низким уровнем HER2 и клеточной линии SkBr-3 с высоким уровнем HER2, соответственно.

[74] **На ФИГ. 11 и ФИГ. 12** показано опосредованную F3'-TriNKET-CD33 цитотоксичность по отношению к двум CD33-положительным клеточным линиям человека, EOL-1 и TNP-1, соответственно.

[75] **На ФИГ. 13А** показано, что связывание F3'-TriNKET-HER2 с FcγRIa аналогично герцептину.

[76] **На ФИГ. 13В** показано, что связывание F3'-TriNKET-HER2 с FcγRIIa аналогично герцептину. **ФИГ. 13С** показывает, что связывание F3'-TriNKET-HER2 с FcγRIIa 158V аналогично герцептину.

[77] **На ФИГ. 14А** показано, что связывание F3'-TriNKET-HER2, где связывающим агентом HER2 является scFv, с HER2 человека аналогично герцептину, при котором связывающими агентами HER2 являются Fab. **ФИГ. 14В** показывает, что связывание F3'-TriNKET-CD33, где связывающим агентом CD33 является scFv, с CD33 человека аналогично связыванию моноклонального антитела CD33, при котором связывающими агентами CD33 являются Fab.

[78] **На ФИГ. 15** показано, что двухступенчатая очистка F3-TriNKET-BCMA обеспечивает чистоту 99%.

[79] **На ФИГ. 16** показано одновременное вовлечение мишеней NKG2D и CD33 с высокой эффективностью посредством F3-TriNKET-CD33.

[80] **На ФИГ. 17** показано одновременное вовлечение мишеней NKG2D и BCMA с высокой эффективностью посредством F3-TriNKET-BCMA.

[81] **На ФИГ. 18А** показано, что формат F3-TriNKET стабилен как минимум на протяжении 14 дней. **ФИГ. 18В** показывает, что формат F3-TriNKET стабилен после удержания при низком pH. **ФИГ. 18С** показывает, что формат F3-TriNKET стабилен как минимум после 5 циклов замораживания-оттаивания.

[82] **На ФИГ. 19** представлены линейные графики, показывающие, что BCMA, нацеленный на F4-TriNKET, с различными доменами связывания NKG2D, усиливает лизис миеломных клеток KMS12-PE NK-клетками человека.

[83] **На ФИГ. 20** представлены линейные графики, показывающие, что BCMA, нацеленный на F4-TriNKET, с различными доменами связывания NKG2D, усиливает лизис миеломных клеток MM.1R NK-клетками человека.

[84] **На ФИГ. 21** представлены линейные графики, показывающие связывание F4-TriNKET, DuoBody-TriNKET и моноклонального антитела BCMA с миеломными клетками MM.1R.

[85] **На ФИГ. 22** представлены данные FACS, которые показывают, что инкубация

с F4-TriNKET со временем увеличивает экспрессию поверхностного ВСМА.

[86] **На ФИГ. 23** представлены линейные графики, показывающие, что F4-TriNKET стабилизирует поверхностный ВСМА.

[87] **На ФИГ. 24** представлены столбцовые графики, показывающие, что F4-TriNKET, нацеленный на ВСМА, со связывающим агентом A49 опосредует более сильное уничтожение миеломных клеток KMS12-PE при различных концентрациях в течение 30 часов, чем Duobody-TriNKET

[88] **На ФИГ. 25** представлены столбцовые графики, показывающие, что F4-TriNKET, нацеленный на ВСМА, со связывающим агентом A49 опосредует более сильное уничтожение миеломных клеток MM.1S при различных концентрациях в течение 30 часов, чем Duobody-TriNKET.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[89] Изобретение предлагает усовершенствование одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), который связан с константным доменом антитела через шарнирную последовательность. Шарнирная последовательность обеспечивает гибкость связывания scFv с антигеном. В данном изобретении также предложены мультиспецифические связывающие белки, которые включают один или более scFv, причем мультиспецифические связывающие белки связывают рецептор NKG2D и рецептор CD16 на натуральных клетках-киллерах, а также ассоциированный с опухолью антиген. В данном изобретении также предложены мультиспецифические связывающие белки, которые содержат два связанных с опухолью антигенсвязывающих сайта, связывающихся с одним и тем же ассоциированным с опухолью антигеном, и связывают рецептор NKG2D и рецептор CD16 на натуральных клетках-киллерах. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие такие мультиспецифические связывающие белки, и терапевтические способы, в которых используются такие мультиспецифические связывающие белки и фармацевтические композиции для таких целей, как лечение рака. Различные аспекты изобретения приведены в разделах ниже; однако аспекты изобретения, описанные в одном конкретном разделе, не ограничиваются каким-либо конкретным разделом.

[90] Для облегчения понимания настоящего изобретения ниже приведены определения для ряда терминов и выражений.

[91] В контексте настоящего документа формы единственного числа означают «один или более» и включают в себя форму множественного числа, если только контекст не предполагает иное.

[92] В контексте настоящего документа термины «субъект» и «пациент» относятся к организму, подлежащему лечению способами и композициями, описанными в настоящем документе. Такие организмы предпочтительно включают в себя без ограничения млекопитающих (*например*, мышей, обезьян, лошадей, крупного рогатого скота, свиней, собак, кошек и тому подобное) и более предпочтительно включают в себя людей.

[93] В контексте настоящего документа термин «антигенсвязывающий сайт»

относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. В антителах человека антигенсвязывающий сайт образован из аминокислотных остатков N-концевых вариабельных («V») областей тяжелой («H») и легкой («L») цепей. Три сильно различающихся участка внутри V-областей тяжелой и легкой цепей называются «гипервариабельными областями», которые расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как «каркасные области», или «FR». Таким образом, термин «FR» относится к аминокислотным последовательностям, которые встречаются в природе между и вблизи гипервариабельных областей в иммуноглобулинах. В молекуле антитела человека три гипервариабельные области легкой цепи и три гипервариабельные области тяжелой цепи расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связанного антигена, а три гипервариабельные области каждой из тяжелой и легкой цепи называются «определяющими комплементарность областями», или «CDR». У определенных животных, таких как верблюды и хрящевые рыбы, антигенсвязывающий сайт образован одной цепью антитела, обеспечивая «однодоменное антитело». Антигенсвязывающие участки могут существовать в интактном антителе, в антигенсвязывающем фрагменте антитела, которое сохраняет антигенсвязывающую поверхность, или в рекомбинантном полипептиде, таком как scFv, с использованием пептидного линкера для соединения вариабельного домена тяжелой цепи с вариабельным доменом легкой цепи в одном полипептиде.

[94] В контексте настоящего описания термины «фрагмент антигенсвязывающего T-клеточного рецептора» и «антигенсвязывающий фрагмент TCR» используются взаимозаменяемо и относятся к части T-клеточного рецептора (TCR), которая связывает родственный антиген. В  $\alpha\beta$  TCR человека антигенсвязывающий фрагмент TCR включает вариабельный домен альфа-цепи ( $V\alpha$ ) и вариабельный домен бета-цепи ( $V\beta$ ), каждый из которых содержит три области, определяющие комплементарность (CDR). Гипервариабельные петли, названные CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$ , занимают центральное положение для связывания пептида антигена; петли CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$ , CDR1 $\beta$  и CDR2 $\beta$ , кодируемые зародышевой линией, больше всего контактируют с MHC, который презентует пептид антигена. В  $\gamma\delta$  TCR человека антигенсвязывающий фрагмент TCR включает вариабельный домен гамма-цепи ( $V\gamma$ ) и вариабельный домен дельта-цепи ( $V\delta$ ), каждый из которых содержит три CDR.  $\gamma\delta$  TCR человека распознают антигены (*например*, пептид или липид), презентованные молекулами MHC или молекулами, относящимися к MHC (*например*, CD1, эндотелиальный рецептор белка C (EPCR), или связанную с полипептидом MHC класса I последовательность A (MICA)). Понятно, что другие белки, такие как F1-АТФаза, также могут презентовать антигены  $\gamma\delta$  TCR. Антигенсвязывающие фрагменты TCR могут существовать в интактном TCR, в сконструированном TCR, имеющем цепи TCR, связанные дисульфидной связью, в антигенсвязывающем фрагменте интактного или сконструированного TCR, который сохраняет антигенсвязывающую поверхность, или в

рекомбинантном полипептиде с переменными доменами TCR (*например*, V $\alpha$  и V $\beta$ ), соединенными пептидным линкером в едином полипептиде. Неограничивающие примеры антигенсвязывающего фрагмента TCR включают фрагмент TCR, содержащий переменные домены (*например*, V $\alpha$  и V $\beta$ ) и константные домены (*например*, C $\alpha$  и C $\beta$ ), но не имеющий связывающих областей, трансмембранных областей и цитоплазматических областей TCR, называемых в данном документе «внеклеточным фрагментом TCR», и переменные области TCR (*например*, V $\alpha$  и V $\beta$ ), соединенные пептидным линкером, называемые в данном документе «одноцепочечным фрагментом TCR (scTCR)».

[95] Термин «эффективное количество», в контексте настоящего изобретения, относится к количеству соединения (*например*, соединения по настоящему изобретению), достаточному для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество можно вводить за одно или более введений, применений или дозировок, и оно не ограничивается конкретным составом или путем введения. Термин «лечение», в контексте настоящего изобретения, включает в себя любой эффект, *например*, ослабление, уменьшение, модулирование, облегчение или устранение, которое приводит к улучшению состояния, заболевания, расстройства и т.п., или ослабление его симптома.

[96] В контексте настоящего документа термин «фармацевтическая композиция» относится к комбинации активного агента с носителем, инертным или активным, делаю композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

[97] Термин «фармацевтически приемлемый носитель», в контексте настоящего изобретения, относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, таких как забуференный фосфатом физиологический раствор, вода, эмульсии (*например*, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло) и различные типы смачивающих агентов. Композиции также могут содержать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов *см.*, *например*, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

[98] В тексте описания, где композиции описаны как имеющие, включающие в себя или содержащие конкретные компоненты, или где процессы и способы описаны как имеющие, включающие в себя или содержащие конкретные стадии, подразумевается, что дополнительно существуют композиции по настоящему изобретению, которые состоят по существу из или состоят из указанных компонентов, и что существуют процессы и способы по настоящему изобретению, которые состоят по существу из или состоят из указанных стадий процессинга.

[99] Как правило, композиции с указанием процента являются весовыми, если не указано иное. Кроме того, если переменная не сопровождается определением, то предыдущее определение переменной является превалирующим.

## **БЕЛКОВ**

[100] Настоящее изобретение предлагает усовершенствование одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), который связан с константным доменом антитела через

шарнирную последовательность. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser. В некоторых других вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser и Thr-Lys-Gly. ScFv может включать переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления ScFv связывает NKG2D или ассоциированный с опухолью антиген. Шарнирная последовательность обеспечивает гибкость связывания scFv с антигеном-мишенью.

[101] В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи образует дисульфидный мостик с переменным доменом легкой цепи для повышения стабильности scFv. Например, дисульфидный мостик может быть образован между остатком C44 переменного домена тяжелой цепи и остатком C100 переменного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи связан с переменным доменом легкой цепи через гибкий линкер. Может быть использован любой подходящий линкер, например, линкер (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>. В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи расположен на N-- конце переменного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи расположен на C-конце переменного домена легкой цепи.

[102] В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела, связанный с scFv, может происходить из константной области антитела любого вида, которое связывается с CD16. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области человеческого антитела, такой как константная область человеческого IgG1, константная область IgG2, константная область IgG3 или константная область IgG4. В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кот, мышь или лошадь. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела включает шарнир, домен CH2, домен CH3 и, необязательно, домен CH1. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела, которая включает шарнир, домен CH2, домен CH3 и, необязательно, домен CH1, происходит из антитела IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела включает аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.

[103] В Fc-домене связывание CD16 опосредовано шарнирной областью и доменом CH2. Например, в человеческом IgG1 взаимодействие с CD16 в первую очередь сосредоточено на аминокислотных остатках Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239 и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамин в домене CH2 (см. Sondermann *et al.*, Nature, 406 (6793):267-273). Основываясь на известных доменах, мутации могут быть выбраны для повышения или понижения аффинности связывания с CD16, например, используя библиотеки фагового дисплея или библиотеки выявляемых на

поверхности дрожжей кДНК, или могут быть сконструированы, основываясь на известной трехмерной структуре взаимодействия.

[104] В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела включает домен CH2 и домен CH3 антитела IgG, например, антитела IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления мутации вводятся в константный домен антитела, чтобы сделать возможной гетеродимеризацию с другим константным доменом антитела. Например, если константный домен антитела происходит из константного домена IgG1 человека, константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439. В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается одной или более заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

[105] Ниже перечислены примеры scFv, связанного с константной областью антитела, который также включает мутации, которые делают возможной гетеродимеризацию двух полипептидных цепей. В качестве примера используется scFv, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ) и вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ), из трастузумаба. Каждая последовательность представляет собой  $V_L-(G_4S)_4-V_H$ -шарнир (AS)-Fc, содержащий мутации гетеродимеризации (подчеркнуты).  $V_L$  и  $V_H$  содержат мостик  $44V_H-100V_L$  S-S (подчеркнут) и могут происходить от любого нацеленного на опухоль или связывающего NKG2D антитела. Ala-Ser (AS, подчеркнутый) включен в последовательность локтевидного шарнира, чтобы сбалансировать гибкость и оптимальную геометрию. В некоторых вариантах осуществления к последовательности AS на шарнире может быть добавлена дополнительная последовательность Thr-Lys-Gly. Линкер  $(G_4S)_4$  подчеркнут в последовательностях, перечисленных в абзаце ниже.

[106] Трастузумаб -scFv-Fc A1 и трастузумаб -scFv-Fc B1 могут предпочтительно спариваться и образовывать гетеродимер. Трастузумаб -scFv-Fc A2 и трастузумаб -scFv-Fc B2 могут предпочтительно спариваться и образовывать гетеродимер.

Трастузумаб -scFv-Fc A1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY  
SGVPSRFRSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT  
 NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW  
 GQGTLVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ  
 ID NO:303)

Трастузумаб -scFv-Fc B1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY  
 SGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT  
 NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW  
 GQGTLVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
 KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFFLYVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ  
 ID NO:304)

Трастузумаб -scFv-Fc A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY  
 SGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT  
 NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW  
 GQGTLVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
 KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ  
 ID NO:305)

Трастузумаб -scFv-Fc B2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY  
 SGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT

NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLYSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:306)

[107] В другом аспекте настоящее изобретение относится к белку, который содержит scFv, связанный с константной областью антитела, описанной выше. В некоторых вариантах осуществления белок включает первый антигенсвязывающий сайт, который включает scFv, связанный с константным доменом антитела; второй антигенсвязывающий сайт, который может принимать формат Fab или scFv; и второй константный домен антитела, связанный со вторым антигенсвязывающим сайтом. В некоторых вариантах осуществления белок является мультиспецифическим, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, вторые антигенсвязывающий сайты в форме Fab связывают ассоциированный с опухолью антиген, а константные области антитела связывают CD16 (упоминаемые в данном документе как F3-TriNKET, как показано на ФИГ. 1B). В некоторых других вариантах осуществления белок является мультиспецифическим, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает ассоциированный с опухолью антиген, второй антигенсвязывающий сайт в форме Fab связывает NKG2D, а константные области антитела связывают CD16 (упоминаемые в данном документе как F3'-TriNKET, как показано на ФИГ. 1A). Константная область антитела, связанная с scFv, гетеродимеризуется с константной областью антитела второго антигенсвязывающего сайта описанных в данном документе белков. Мультиспецифические связывающие белки, включая scFv, описанный в данном документе, могут принимать различные форматы, как показано на ФИГ. 1A-1C.

[108] Мультиспецифические связывающие белки могут связываться с клетками, экспрессирующими рецептор NKG2D, которые могут включать в себя без ограничения NK-клетки,  $\gamma\delta$  Т-клетки и CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  Т-клетки. При связывании с NKG2D мультиспецифические связывающие белки могут блокировать связывание природных лигандов, таких как ULBP6 и MICA, с NKG2D и активацию рецепторов NKG2D.

[109] Мультиспецифические связывающие белки связываются с клетками, экспрессирующими CD16, рецептором Fc на поверхности лейкоцитов, включая натуральные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки.

[110] При связывании с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на натуральных клетках-киллерах и ассоциированным с опухолью антигеном на раковых клетках, мультиспецифические связывающие белки могут взаимодействовать более чем с одним типом NK-активирующих рецепторов и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-

клетки у человека. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-клетки у людей и у других видов, таких как грызуны и яванские макаки.

[111] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мультиспецифический связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ассоциированный с опухолью антиген; второй антигенсвязывающий сайт, который связывает тот же ассоциированный с опухолью антиген, что и первый антигенсвязывающий сайт; третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; и константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. Любой из антигенсвязывающих сайтов может каждый принимать форму Fab или scFv. Иллюстративные форматы показаны на ФИГ. 2B-2C. Как  $V_H-V_L$ , так и  $V_L-V_H$  ориентации scFv являются вариантами осуществления настоящего изобретения.

[112] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт или второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с одним и тем же ассоциированным с опухолью антигеном, представляет собой scFv, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с одним и тем же ассоциированным с опухолью антигеном, представляют собой scFv, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт или второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с одним и тем же ассоциированным с опухолью антигеном, представляет собой Fab, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с одним и тем же ассоциированным с опухолью антигеном, представляют собой Fab, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт F4-TriNKET по настоящему изобретению имеют идентичные аминокислотные последовательности.

[113] В других вариантах осуществления описанный в настоящем документе мультиспецифический связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ассоциированный с опухолью антиген; второй антигенсвязывающий сайт, который связывает другой антиген; третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; и константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. Любой из антигенсвязывающих сайтов может принимать форму Fab или scFv (в ориентации  $V_H-V_L$  или  $V_L-V_H$ ). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт или второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с двумя разными антигенами, представляют собой scFv, а третий антигенсвязывающий сайт, который

связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с двумя разными антигенами, представляют собой scFv, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт или второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с двумя разными антигенами, представляет собой Fab, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с двумя разными антигенами, представляют собой Fab, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv.

[114] В определенных вариантах осуществления предложенный в данном документе мультиспецифический связывающий белок (упоминаются в данном документе как F4-TriNKET) обеспечивает бивалентное взаимодействие с ассоциированным с опухолью антигеном, тем самым стабилизируя и поддерживая ассоциированный с опухолью антиген на поверхности раковых клеток и усиливая цитотоксичность НК-клеток по отношению к раковым клеткам. В некоторых вариантах осуществления изобретения бивалентное вовлечение ассоциированных с опухолью антигенов мультиспецифическими связывающими белками обеспечивает более высокую avidность мультиспецифических связывающих белков для раковых клеток, тем самым способствуя более сильному цитотоксическому ответу НК-клеток в отношении раковых клеток, особенно в отношении раковых клеток, экспрессирующих низкий уровень ассоциированного с опухолью антигена.

[115] В настоящем изобретении также предложен мультиспецифический связывающий белок, содержащий (а) антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; (b) фрагмент антигенсвязывающего TCR; и (с) константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид из ассоциированного с опухолью антигена (ТАА), презентованного МНС, *например*, пептид из ассоциированного с опухолью антигена человека, презентованный лейкоцитарным антигеном человека (HLA). Элемент (b) может существовать в различных форматах (*например*, растворимых форматах), таких как внеклеточный фрагмент TCR или фрагмент scTCR. Элементы (а) и (с) могут существовать в различных форматах и/или содержать различные мутации, описанные выше. Например, в некоторых вариантах осуществления элемент (с) представляет собой константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, причем константная область антитела или ее часть содержит (i) первый константный домен антитела, связанный с сайтом связывания антигена, который связывается NKG2D, и (ii) второй константный домен антитела, связанный с антигенсвязывающим фрагментом TCR, причем первый и второй константные домены антитела могут гетеродимеризоваться.

[116] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт

представляет собой Fab-фрагмент, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой фрагмент scTCR. Учитывая, что его NKG2D-связывающая часть представляет собой Fab, а его ТАА-связывающая часть включает переменные домены, связанные пептидным линкером в единую цепь (аналогично мультиспецифическому связывающему белку, содержащему первый антигенсвязывающий сайт, который содержит scFv, связанный с константным доменом антитела; и второй антигенсвязывающий сайт, который принимает форму Fab; и второй константный домен антитела, связанный со вторым антигенсвязывающим сайтом, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает ассоциированный с опухолью антиген, второй антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, а константные области антитела связывают CD16), формат этого мультиспецифического связывающего белка также упоминается в данном документе как F3'-TriNKET, как показано на ФИГ. 1А.

[117] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой внеклеточный фрагмент TCR. Учитывая, что его NKG2D-связывающая часть представляет собой scFv, а его ТАА-связывающая часть включает переменные домены и константные домены (аналогично мультиспецифическому связывающему белку, содержащему первый антигенсвязывающий сайт, который содержит scFv, связанный с константным доменом антитела; и второй антигенсвязывающий сайт, который принимает форму Fab; и второй константный домен антитела, связанный со вторым антигенсвязывающим сайтом, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, второй антигенсвязывающий сайт связывает ассоциированный с опухолью антиген, а константные области антитела связывают CD16), формат этого мультиспецифического связывающего белка также упоминается в данном документе как F3-TriNKET, как показано на ФИГ. 1В.

[118] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой фрагмент scTCR. Такой формат показан на ФИГ. 1С. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой Fab, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой внеклеточный фрагмент TCR. Такой формат показан на ФИГ. 2А.

[119] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий фрагмент TCR, который связывает антиген (*например*, пептид ТАА, презентованный МНС); второй антигенсвязывающий фрагмент TCR, который связывает тот же антиген, что и первый антигенсвязывающий фрагмент TCR; антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; и константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. Альтернативно, предполагается, что первый антигенсвязывающий фрагмент TCR и второй антигенсвязывающий фрагмент TCR могут связывать два разных пептида ТАА, презентованных одними и теми же или разными МНС. Любой из антигенсвязывающих сайтов может принимать форму Fab или scFv. Первый и

второй антигенсвязывающие фрагменты TCR могут принимать форму либо внеклеточного фрагмента TCR, либо фрагмента scTCR. Типичные форматы, которые обеспечивают бивалентное вовлечение антигена (*например*, пептид ТАА, презентованный МНС), упоминаются в данном документе как F4-TriNKET и показаны на ФИГ. 2B-2C.

[120] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент TCR и второй антигенсвязывающий фрагмент TCR F4-TriNKET по настоящему изобретению связываются с одним и тем же пептидом ТАА, презентованным одним и тем же МНС. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент TCR или второй антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент TCR и второй антигенсвязывающий фрагмент TCR представляют собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент TCR или второй антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент TCR и второй антигенсвязывающий фрагмент TCR представляют собой Fab.

[121] F4-TriNKET с антигенсвязывающими фрагментами TCR, предложенными в данном документе, обеспечивают бивалентное взаимодействие антигенов (*например*, пептиды ТАА, презентованные МНС), тем самым стабилизируя и поддерживая пептид ТАА на поверхности раковых клеток и усиливая цитотоксичность по отношению к раковым клеткам НК-клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения бивалентное вовлечение пептидов ТАА мультиспецифическими связывающими белками обеспечивает более высокую avidность мультиспецифических связывающих белков для раковых клеток, тем самым способствуя более сильному цитотоксическому ответу НК-клеток в отношении раковых клеток, особенно в отношении раковых клеток, представляющих низкий уровень пептида ТАА.

[122] Понятно, что если белок по настоящему изобретению содержит scFv,  $V_H$  может быть расположен либо на С-конце, либо на N-конце  $V_L$ . Аналогичным образом, если белок по настоящему изобретению содержит фрагмент scTCR,  $V\alpha$  может быть расположен либо на С-конце, либо на N-конце  $V\beta$ .

[123] Иллюстративные последовательности сайта связывания NKG2D и связанного с опухолью антигенсвязывающего сайта, или антигенсвязывающих фрагментов TCR, которые могут быть включены в F3/F3' и F4-TriNKET, перечислены в данном документе.

#### ***Сайт связывания NKG2D***

[124] В таблице 1 перечислены пептидные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с NKG2D. Если не указано иное, последовательности CDR, представленные в таблице 1, определены по Кабат. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи расположены в формате Fab. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи слиты вместе с scFv.

[125] NKG2D-связывающие домены могут отличаться по своей аффинности связывания с NKG2D, тем не менее все они активируют NKG2D и NK-клетки человека.

Таблица 1		
Клоны	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1) CDR1: GSFSGYYWS (не по Кабат) (SEQ ID NO:3) или GYYWS (SEQ ID NO:307) CDR2: EIDHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:4) CDR3: ARARGPWSFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:5) или ARGPWSFDP (SEQ ID NO:308)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDFATYYCQ QYNSYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:6)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:8)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDFATYYCQ QYHSFYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGKA

	DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTA VYYCARARGPW SFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:10)	PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QNSY YTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:11)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTA VYYCARARGPW SFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:12)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYNSYPTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:13)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTA VYYCARARGPW GFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:14)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRTSQSISSYLNWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQ QSYDIPYTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:15)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTA VYYCARARGPW SFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:16)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYGSFPITFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:17)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTA VYYCARARGPW SFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:18)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPDDFATYYC QQSKEVPWTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:19)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTA VYYCARARGPW SFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:20)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYNSFPTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:21)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT

	GGFSFGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:22)	CRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQ QYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:23)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGFSFGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:24)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQ QYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:25)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGFSFGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:26)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQ QYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:27)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGFSFGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:28)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQ QYQSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:29)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGFSFGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:30)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQ QYSSFSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:31)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGFSFGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:32)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQ QYESYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:33)

ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:34)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYDSFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:35)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:36)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYQSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:37)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:38)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:39)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:40)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYELYSYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:41)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:42)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYDTFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:43)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG GIPIFGTANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDS SIRHAYYYYGMDVWGQGTITVTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQYYSTPITFGGGTK

	(SEQ ID NO:44) CDR1: GTFSSY AIS (не по Кабат) (SEQ ID NO:45) или SYAIS (SEQ ID NO:309) CDR2: GIPIFGTANYA QKFQG (SEQ ID NO:46) CDR3: ARGDSSIRHAYYYYGMDV (не по Кабат) (SEQ ID NO:47) или GDSSIRHAYYYYGMDV (SEQ ID NO:310)	VEIK (SEQ ID NO:48) CDR1: KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO:49) CDR2: WASTRES (SEQ ID NO:50) CDR3: QQYYSTPIT (SEQ ID NO:51)
ADI-29443 (F43)	QLQLQESG PGLVKPSETLSLCTVSG GSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGSDR FHPYFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:52) CDR1: GSISSSSYYWG (не по Кабат) (SEQ ID NO:53) или SSSYYWG (SEQ ID NO:311) CDR2: SIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:54) CDR3: ARGSDRFHPYFDY (не по Кабат) (SEQ ID NO:55) или GSDRFHPYFDY (SEQ ID NO:312)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSRYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASN RATGIPARFSGSGS GTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQ QFDTWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:56) CDR1: RASQSVSRYLA (SEQ ID NO:57) CDR2: DASN RAT (SEQ ID NO:58) CDR3: QQFDTWPPT (SEQ ID NO:59)
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:60)	DIQMTQSPSTLSASVGD RVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLES GVPSRFSGSG SGTEFTLTIS SLQPDDFATYYCE QYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:61)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKAS GGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMG GIPIFGTANYA QKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSED TAVYYCARRGR KASGSFY YYYGMDVWGQGT TTVTS S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CESSQSLLSNGNQN YL TWYQ QKPGQPPKPLIYWASTRES GVP DRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAED VAVYYCQNDYSYPYTFGQGTK LEIK

	(SEQ ID NO:62) CDR1: GTFSSY AIS (не по Кабат) (SEQ ID NO:63) CDR2: GIPIFGTANYA QKFQG (SEQ ID NO:64) CDR3: ARRGRKASGSFY YYYGMDV (не по Кабат) (SEQ ID NO:65)	(SEQ ID NO:66) CDR1: ESSQSLN SGNQKNYLT (SEQ ID NO:67) CDR2: WASTRES (SEQ ID NO:68) CDR3: QNDYSYPYT (SEQ ID NO:69)
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKA SGYTFTSY YMHWRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSYA QKFQGRVTMTR DTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCA RGAPNYGDTTHDYY YMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO:70) CDR1: YTFTSY YMH (не по Кабат) (SEQ ID NO:71) или SY YMH (SEQ ID NO:313) CDR2: IINPSGGSTSYA QKFQG (SEQ ID NO:72) CDR3: ARGAPNYGDTTHDYY YMDV (не по Кабат) (SEQ ID NO:73) или GAPNYGDTTHDYY YMDV (SEQ ID NO:314)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSG SGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYCQ QYDDWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:74) CDR1: RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:75) CDR2: GASTRAT (SEQ ID NO:76) CDR3: QQYDDWPPT (SEQ ID NO:77)
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKA SGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEW MGWINPNSGGTNYA QKFQGRVTMT RDTSISTAYMEL SRLRSDD TAVYYC ARDTGEYYDTDDHGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:78) CDR1: YTFTGY YMH (не по Кабат) (SEQ ID NO:79) или GYYMH (SEQ ID NO:315) CDR2: WINPNSGGTNYA QKFQG (SEQ	EIVLTQSPGTL SLS PGERATLSC RASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGS GTEFTLTIS SLQSEDFAVYYCQ QDDYWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82) CDR1: RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:83) CDR2: GASTRAT (SEQ ID NO:84) CDR3: QQDDYWPPT (SEQ ID

	ID NO:80) CDR3: ARDTGEYYDTDDHGMDV (не по Кабат) (SEQ ID NO:81) или DTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO:316)	NO:85)
ADI-27744 (A44)	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD GGYYDSGAGDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:86) CDR1: FTFSSYAMS (не по Кабат) (SEQ ID NO:87) или SYAMS (SEQ ID NO:317) CDR2: AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:88) CDR3: AKDGGYYDSGAGDY (не по Кабат) (SEQ ID NO:89) или DGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO:318)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGIDSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGVSYPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:90) CDR1: RASQGIDSWLA (SEQ ID NO:91) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:92) CDR3: QQGVSYPRT (SEQ ID NO:93)
ADI-27749 (A49)	EVQLVES GGGLVKP GGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PMGAAAGWFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:94) CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPMGAAAGWFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:97) или GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:320)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWVLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QGVSPRTPFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRTP (SEQ ID NO:101)
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYTFTSYMHWRQAPGQGLEW	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAP

	<p>MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCA REGAGFAYGMDYYYMDVWGKGT VTVSS (SEQ ID NO:102) CDR1: YFTSYMH (не по Кабат) (SEQ ID NO:103) или SYMH (SEQ ID NO:313) CDR2: IINPSGGSTSYAQKFG (SEQ ID NO:104) CDR3: AREGAGFAYGMDYYYMDV (не по Кабат) (SEQ ID NO:105) или EGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:321)</p>	<p>RLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSEPEDFAVYYCQ QSDNWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:106) CDR1 (SEQ ID NO:107) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:108) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:109) - QQSDNWPFT</p>
A49MI	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PIGAAAGWFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:322) CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPIGAAAGWFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:323) или GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:324)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRFT (SEQ ID NO:101)</p>
A49MQ	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PQAAAGWFDPWGQGLVTVSS</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)</p>

	<p>(SEQ ID NO:325)</p> <p>CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319)</p> <p>CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)</p> <p>CDR3: ARGAPQGAAAGWFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:326) или GAPQGAAAGWFDP (SEQ ID NO:327)</p>	<p>CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)</p> <p>CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)</p>
A49ML	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PLGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:328)</p> <p>CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319)</p> <p>CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)</p> <p>CDR3: ARGAPLGAAAGWFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:329) или GAPLGAAAGWFDP (SEQ ID NO:330)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)</p> <p>CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)</p> <p>CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)</p>
A49MF	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PFGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:331)</p> <p>CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)</p> <p>CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)</p>

	<p>CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)</p> <p>CDR3: ARGAPFGAAAGWFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:332) или GAPFGAAAGWFDP (SEQ ID NO:333)</p>	<p>CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)</p>
A49MV	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPVGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:334)</p> <p>CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319)</p> <p>CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)</p> <p>CDR3: ARGAPVGAAAGWFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:335) или GAPVGAAAGWFDP (SEQ ID NO:336)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)</p> <p>CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)</p> <p>CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)</p>
A49- консенсусная	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPXGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS, в которой X представляет собой M, L, I, V, Q или F (SEQ ID NO:337)</p> <p>CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319)</p> <p>CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)</p> <p>CDR3: ARGAPXGAAAGWFDP, в которой X представляет собой M, L, I,</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)</p> <p>CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)</p> <p>CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)</p>

	V, Q или F (не по Кабат) (SEQ ID NO:338) или GAPXGAAAGWFDP, в которой X представляет собой M, L, I, V, Q или F (SEQ ID NO:339)	
--	--	--

[126] Альтернативно, переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO: 110, может быть соединен с переменным доменом легкой цепи, представленным SEQ ID NO: 111, с образованием антигенсвязывающего сайта, который может связываться с NKG2D, как проиллюстрировано в патенте США 9273136.

SEQ ID NO:110

QVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRY  
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDY  
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:111

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLPL  
SGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

[127] Альтернативно, переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO: 112, может быть соединен с переменным доменом легкой цепи, представленным SEQ ID NO: 113, с образованием антигенсвязывающего сайта, который может связываться с NKG2D, как проиллюстрировано в патенте США 7879985.

SEQ ID NO:112

QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSDDISISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGS  
ANYNPSLKS RVTVSDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGMVTVS  
S

SEQ ID NO:113

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA  
TGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

***Ассоциированный с опухолью антигенсвязывающий сайт***

[128] В контексте настоящего документа ассоциированный с опухолью означает любой антиген, включая без ограничения белок, гликопротеин, ганглиозид, углевод, липид, который ассоциирован с раком. Такой антиген может экспрессироваться на злокачественных клетках или в микроокружении опухоли, например, на ассоциированных с опухолью кровеносных сосудах, внеклеточном матриксе, мезенхимальной строме или иммунных инфильтратах. Например, ассоциированный с опухолью антиген может включать ANO1, BCMA, EpCAM, CAIX, CEA, CCR4, CD2, CD123, CD133, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CLAUDIN-18.2, DLL3, EGFR/ERBB1, GD2, IGF1R, HER2, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSMA, мезотелин, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, TROP2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, PD1, 5T4, GPNMB, FR-альфа, PAPP-A, FLT3, GPC3, CXCR4, ROR1, ROR2, HLA-E, PD-L1, VLA4, CD44, CD13, CD15, CD47, CLL1, CD81, CD23, CD79a, CD79b, CD80,

CRLF2, SLAMF7, CD138, CA125, NaPi2b, нектин4, ADAM8, ADAM9, SLC44A4, CA19-9, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, ULRA 1, LILRA2, LILRA3, ULRA4, LILRA5 и ULRA6, CCR8, CD7, CTLA4, CX3CR1, ENTPD1, HAVCR2, IL-1R2, PDCD1LG2, TIGIT, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, GEM, NT5E, TNFRSF18, MUC1, Р-кадгерин, плексин-А1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, erbB-3, EDNRB, Tyrp1, CD14, CD163, CSF3R, Siglec-9, ITGAM, VISTA, B7-H4 (VTCN1), CCR1, LRRC25, PTAFR, SIRPB1, TLR2, TLR4, CD300LB, ATP1A3, CCR5, MUC1 (или MUC1-C), плексин-А1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, AXL, EDNRB, OLR1 и TYRP1, которые экспрессируются на раковых клетках.

[129] Ассоциированный с опухолью антигенсвязывающий сайт может быть разработан для связывания с любым ассоциированным с опухолью антигеном. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с опухолью антигенсвязывающий сайт включает переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, которые могут образовывать пары для связывания с ассоциированным с опухолью антигеном. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи расположены в формате Fab. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи слиты вместе с scFv. Иллюстративные ассоциированные с опухолью антигенсвязывающие сайты перечислены ниже.

[130] В таблице 2 перечислены пептидные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с ВСМА.

Клоны	Пептидная последовательность переменного домена тяжелой цепи	Пептидная последовательность переменного домена легкой цепи
1 (US14/776 649)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK ASGYSFPDYINWVRQAPGQGLE WMGWIYFASGNSEYNQKFTGRVT MTRDTSSTAYMELSSLRSEDNAV YFCASLYDYDWYFDVWGQGMV TVSS (SEQ ID NO:114) CDR1(SEQ ID NO:115) - DYYIN CDR2 (SEQ ID NO:116) - WIYFASGNSEYNQKFTG CDR3 (SEQ ID NO:117) - LYDYDWYFDV	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKS SQLVHNSGNTYLHWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGS GADFTLKISRVEAEDVGVYYCAE TSHVPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:118) или DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKS SQLVHNSGNTYLHWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQS SIYPWTFGQGTKLEIK

		(SEQ ID NO:119) CDR1(SEQ ID NO:120) - KSSQSLVHSNGNTYLH CDR2 (SEQ ID NO:121) - KVSNRFS CDR3 - AETSHVPWT (SEQ ID NO:122) или SQSSIYPWT (SEQ ID NO:123)
2 (PCT/US15 /64269)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKA SGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKW MGWINTETREPAYAYDFRGRFAF SLETSASTAYLQINNPKYEDTATY FCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:124) CDR1 (SEQ ID NO:125) - DYSIN CDR2 (SEQ ID NO:126) - WINTETREPAYAYDFR CDR3 (SEQ ID NO:127) - DYSYAMDY	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCR ASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPP TLTIQLASNVQGTGVPARFSGSGSR TDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSR TIPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:128) CDR1 (SEQ ID NO:129) - RASESVTILGSHLIH CDR2 (SEQ ID NO:130) - LASNVQT CDR3 (SEQ ID NO:131) - LQSR TIPRT
3 (US14/122 391)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKK ASGGTFSNYWMHWVRQAPGQGL EWMGATYRGHSDTYYNQKFKGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDY AVYYCARGAIYNGYDVLNHWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:132) CDR1 (SEQ ID NO:133) - NYWMH CDR2 (SEQ ID NO:134) - ATYRGHSDTYYNQKFKG CDR3 (SEQ ID NO:135) - GAIYNGYDVLN	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCS ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLL IYYTSNLSHGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYRKLP WTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:136) CDR1 (SEQ ID NO:137) - SASQDISNYLN CDR2 (SEQ ID NO:138) - YTSNLHS CDR3 (SEQ ID NO:139) - QQYRKLPWT
4 (US201700 51068)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTV SGGSISSSSYFWGWIRPPGKGLE WIGSIYYSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARHDGATAGLFDYWGQGLTVT	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGG NNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVV VYDDSDRPSGIPER FSGNSNGNTA TLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSS SDHVVFSGGGTKLTVL (SEQ ID

	VSS (SEQ ID NO:140) CDR1: SSSYFWG (SEQ ID NO:141) CDR2: SIYYSGITYYNNPSLKS (SEQ ID NO:142) CDR3: HDGATAGLFDY (SEQ ID NO:143)	NO:144) CDR1: GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO:145) CDR2: DDSDRPS (SEQ ID NO:146) CDR3: QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO:147)
5 (WO20170 21450)	EVQLLES <del>GG</del> GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF <del>FDY</del> WGQGT <del>LV</del> TVSS (SEQ ID NO:148) CDR1: RASQSVSDEYLS (SEQ ID NO:149) CDR2: SASTRAT (SEQ ID NO:150) CDR3: QQYGYPDF (SEQ ID NO:151)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAQS <del>VS</del> DEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAI <del>SR</del> LEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:152) CDR1: RASQSVSDEYLS (SEQ ID NO:153) CDR2: SASTRAT (SEQ ID NO:154) CDR3: QQYGYPDF (SEQ ID NO:155)

[131] Альтернативно, ВСМА-связывающий домен может включать переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, как указано ниже в EM-801 и EM-901.

Переменный домен тяжелой цепи EM-801 (SEQ ID NO: 157):

EVQLLES~~GG~~GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS

GG

CDR1 CDR2

STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQ

GTL CDR3

VTVSS

Переменный домен легкой цепи EM-801 (SEQ ID NO: 158):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA

TGI

CDR1 CDR2

PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIK

CDR3

Переменный домен тяжелой цепи EM-901 (SEQ ID NO: 159)

EVQLLES~~GG~~GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGS

GS CDR1 CDR2

STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQ

## GTL CDR3

VTVSS

Вариабельный домен легкой цепи EM-901 (SEQ ID NO: 160)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRA

## TGI CDR1 CDR2

PDRFSGSGSGTDFTLAISRLPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK

CDR3

[132] Альтернативно, новые антигенсвязывающие сайты, которые могут связываться с ВСМА, могут быть идентифицированы с помощью скрининга на связывание с аминокислотной последовательностью, определенной SEQ ID NO:156.

SEQ ID NO:156

MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA  
ILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRGTGDEIILP  
RGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATE  
IEKSISAR

[133] В таблице 3 перечислены пептидные последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с CD33. CD33-связывающие домены могут различаться по своей аффинности связывания с CD33.

Таблица 3		
	Пептидная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи	Пептидная последовательность вариабельного домена легкой цепи
ADI-10159 [Ab1] (G59)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYGMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYV DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREGGP YYDSSGYFVYYGMDVWGQG TTVTVSS [SEQ ID NO:161]  CDR1: FTFSSYGMS [SEQ ID NO:162]  CDR2: NIKQDGSEKYYVDSVKG [SEQ ID NO:163]  CDR3:	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISWLAWYQQKPGKAPKLL IYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCQYESFP TFGGGTKVEIK [SEQ ID NO165]  CDR1: RASQSISWLA [SEQ ID NO:166]  CDR2: DASSLES [SEQ ID NO:167]  CDR3: QQYESFPT [SEQ ID NO:168]

	AREGGPYYDSSGYFVYYGMD V [SEQ ID NO:164]	
ADI-10177 [Ab2]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYV DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARPLNA GELDVWGQGTMTVTVSS [SEQ ID NO:169]  CDR1: FTFSSYWMS [SEQ ID NO:170]  CDR2: NIKQDGSEKYYVDSVKG [SEQ ID NO:171]  CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:172]	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASSLESVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQLESYPL TFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:173]  CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:174]  CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:175]  CDR3: QQLESYPLT [SEQ ID NO:176]
ADI-11776 [Ab3] (H76)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSKYTMSWVRQAP GKGLEWVSAIVGSGESTYFAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAREGGPY YDSSGYFVYYGMDVWGQGT TVTVSS [SEQ ID NO:177]  CDR1: FTFSKYTMS [SEQ ID NO:178]  CDR2: AIVGSGESTYFADSVKG [SEQ ID NO:179]  CDR3: AREGGPYYDSSGYFVYYGMD V [SEQ ID NO:180]	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCQQYDDL PTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:181]  CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:182]  CDR2: KASSLES [SEQ ID NO:183]  CDR3: QQYDDLPT [SEQ ID NO:184]
ADI-11801	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFSDYYMHVVRQA	DIVMTQSPLSLPVTGPASISCRS SQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQ

[Ab4]	<p>PGQGLEWMGMINPSWGSTSY  AQKFQGRVTMTRDTSTSTVY  MELSSLRSED TAVYYCAREAA  DGFVGERYFDLWGRGTLVTV  SS [SEQ ID NO:185]</p> <p>CDR1: YTFSDYYMH [SEQ ID  NO:186]</p> <p>CDR2:  MINPSWGSTSYAQKFQG [SEQ  ID NO:187]</p> <p>CDR3: AREAADGFVGERYFDL  [SEQ ID NO:188]</p>	<p>SPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSG  SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM  QDVALPITFGGGTKVEIK [SEQ ID  NO:189]</p> <p>CDR1: RSSQSLLYSNGYNYLD  [SEQ ID NO:190]</p> <p>CDR2: LGSNRAS [SEQ ID NO:191]</p> <p>CDR3: MQDVALPIT [SEQ ID  NO:192]</p>
<p>ADI-11807</p> <p>[Ab5]</p> <p>(I07)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS  CAASGFTFGSYWMSWVRQAP  GKGLEWVATIKQDGSEKSYV  DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ  MNSLRAEDTAVYYCARPLNA  GELDVWGQGTMTVTVSS [SEQ  ID NO:193]</p> <p>CDR1: FTFGSYWMS [SEQ ID  NO:194]</p> <p>CDR2:  TIKQDGSEKSYVDSVKG [SEQ  ID NO:195]</p> <p>CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID  NO:196]</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR  ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL  IYEASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT  LTISSLQPDDFATYYCQQSQSYPP  ITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:197]</p> <p>CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID  NO:198]</p> <p>CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:199]</p> <p>CDR3: QQSQSYPPIT [SEQ ID  NO:200]</p>
<p>ADI-11809</p> <p>[Ab6]</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS  CAASGFTFPSYWMSWVRQAP  GKGLEWVATIKRDGSEKGYV  DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ  MNSLRAEDTAVYYCARPLNA  GELDVWGQGTMTVTVSS [SEQ</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR  ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL  IYEASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT  LTISSLQPDDFATYYCQQSQSYPP  ITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:205]</p> <p>CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID</p>

	<p>ID NO:201]</p> <p>CDR1: FTFPSYWMS [SEQ ID NO:202]</p> <p>CDR2: TIKRDGSEKGYVDSVKG [SEQ ID NO:203]</p> <p>CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:204]</p>	<p>NO:206]</p> <p>CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:207]</p> <p>CDR3: QQSQSYPPIT [SEQ ID NO:208]</p>
<p>ADI-11815 [Ab7]</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFGTYYMHVVRQA PGQGLEWMGIINPSRGSTVYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDVAVYYCARGAGY DDEDMDVWGKGTTVTVSS [SEQ ID NO:209]</p> <p>CDR1: YTFGTYYMH [SEQ ID NO:210]</p> <p>CDR2: IINPSRGSTVYAQKFQG [SEQ ID NO:211]</p> <p>CDR3: ARGAGYDDEDMDV [SEQ ID NO:212]</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCR ASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQAHSY PLTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:213]</p> <p>CDR1: RASQGIDSWLA [SEQ ID NO:214]</p> <p>CDR2: AASSLQS [SEQ ID NO:215]</p> <p>CDR3: QQAHSYPLT [SEQ ID NO:216]</p>
<p>ADI-11819 [Ab8]</p>	<p>EVQLVESGGGLVKGPGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSSISSSSEGIYYADS VKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREGGPYY DSSGYFVYYGMDVWGQGTTV TVSS [SEQ ID NO:217]</p> <p>CDR1: FTFSSYAMS [SEQ ID NO:218]</p> <p>CDR2: SISSSEGIYYADSVKG</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCR ASNSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASSTKSGVPSRFSGSGSGTEF TLTISLQPDDEFATYYCQQYDDL PTFGGGGTKVEIK [SEQ ID NO:221]</p> <p>CDR1: RASNSISSWLA [SEQ ID NO:222]</p> <p>CDR2: EASSTKS [SEQ ID NO:223]</p> <p>CDR3: QQYDDLPT [SEQ ID NO:224]</p>

	[SEQ ID NO:219] CDR3: AREGGPYYDSSGYFVYYGMD V [SEQ ID NO:220]	
ADI-11830 [Ab9]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAP GKGLEWVANINTDGSEVYYV DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDVGP GIAYQGHFDYWQGTLTVS S [SEQ ID NO:225] CDR1: FTFSSYWMS [SEQ ID NO:226] CDR2: NINTDGSEVYYVDSVKG [SEQ ID NO:227] CDR3: ARDVGPGIAYQGHFDY [SEQ ID NO:228]	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQVIYSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLKSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQVYDT PLTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:229] CDR1: RASQVIYSYLN [SEQ ID NO:230] CDR2: AASSLK [SEQ ID NO:231] CDR3: QQVYDTPLT [SEQ ID NO:232]
ADI-11835 [Ab10] (I35)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGGSISSTDYYWGWIRQPP GKGLEWIGSIGYSGTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARETAHDVHG MDVWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:233] CDR1: GSISSTDYYWG [SEQ ID NO:234] CDR2: SIGYSGTYYNPSLKS [SEQ ID NO:235] CDR3: ARETAHDVHGMDV [SEQ ID NO:236]	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASHSVYSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFAVYYCQQYDNL PTFGGGGTKVEIK [SEQ ID NO:237] CDR1: RASHSVYSYLA [SEQ ID NO:238] CDR2: DASNRAT [SEQ ID NO:239] CDR3: QQYDNLPT [SEQ ID NO:240]
Линтузумаб	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR

	<p>CKASGYTFTDYNMHWVRQAP GQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQ KFKSKATITADESTNTAYMEL SSLRSEDVAVYYCARGRPAMD YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:241)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:242) - GYTFTDY</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:243) - YIYPYNGGTG</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:244) - GRPAMDY</p>	<p>ASESVDNYGISFMNWFQQKPGK APKLLIYAASNQGSQVPSRFSQSG SGTDFTLTISSLQPDFATYYCQQ SKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:245)</p> <p>CDR1(SEQ ID NO:246) - ESVDNYGISFMN</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:247) - AASNQGS</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:248) - QQSKEVPWT</p>
Гемтузумаб	<p>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGYTITDSNIHWVRQAPG QSLEWIGYIYPYNGGTDYNQK FKNRATLTVDNPTNTAYMELS SLRSEDVAFYYCVNGNPWLA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:249)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:250) - GYTITDS</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:251) - YIYPYNGGTD</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:252) - GNPWLAY</p>	<p>DIQLTQSPSTLSASVGDRVITICR ASESLDNYGIRFLTWVQQKPGKA PKLLMYAASNQGSQVPSRFSQSG SGTEFTLTISSLQPDFATYYCQQ TKEVPWSFGQGTKVEVK (SEQ ID NO:253)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:254) - ESLDNYGIRFLT</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:255) - AASNQGS</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:256) - QQTKEVPWS</p>
анти-CD33 (US 7557189)	<p>QVQLQQPGAQEVVKPGASVKM SCKASGYTFTSYIHWIKQTPG QGLEWVGVYIPGNDDISYNQK FQGKATLTADKSSTTAYMQLS SLTSEDSAVYYCAREVRLRYF DVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:257)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:258) -</p>	<p>EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCK SSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPG QSPRLLIYWASTRESQVDRFTGS GSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCH QYLSSRTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:261)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:262) - QSVFFSSSQKNYLA</p>

	GYTFTSY CDR2 (SEQ ID NO:259) - YPGNDD CDR3 (SEQ ID NO:260) - EVRLRYFDV	CDR2 (SEQ ID NO:263) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:264) - HQYLSRT
вадастуксимаб (US 13/804227)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYDINWVRQAP GQGLEWIGWIYPGDGSTKYNE KFKAKATLTADTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCASGYEDA MDYWGQGTTVTVSSA (SEQ ID NO:265)  CDR1 (SEQ ID NO:266): GYTFTNY CDR2 (SEQ ID NO:267): YPGDGS CDR3 (SEQ ID NO:268): GYEDAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCK ASQDINSYLSWFQKPGKAPKTL IYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQD YTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEF PLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:269)  CDR1 (SEQ ID NO:270): QDINSYLS CDR2 (SEQ ID NO:271): RANRLVD CDR3 (SEQ ID NO:272): LQYDEFPLT

[134] Альтернативно, новые антигенсвязывающие сайты, которые могут связываться с CD33, могут быть идентифицированы с помощью скрининга на связывание с аминокислотной последовательностью, определенной SEQ ID NO:273.

SEQ ID NO:273

MPLLLLPLLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPIPYDYDKNS  
PVHGYWFREGAIIIRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLLGDPNRNCSLSIVDARRRDN  
GSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHKNLTCVSWACEQGT  
PPIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYV  
PQNPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAV  
GRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVEEMDEELHYASLNFGMNPST  
DTSTEYSEVRTQ

[135] В таблице 4 перечислены пептидные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с HER2.

Таблица 4		
Клоны	Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи
Трастузума б	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRWGGDGFYAMDYWGQGLV TVSS (SEQ ID NO:274)  CDR1(SEQ ID NO:275) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:276) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:277) - WGGDGFYAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:278)  CDR1(SEQ ID NO:279) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:280) - SASFLYS CDR3 (SEQ ID NO:281) - QQHYTPPT
Пертузумаб	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEW VADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLS VDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARNLGPSFYFDYWGQGLVTV SSA (SEQ ID NO:282)  CDR1 (SEQ ID NO:283) - GFTFTDY CDR2 (SEQ ID NO:284) - NPNSGG CDR3 (SEQ ID NO:285) - NLGPSFYFDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC KASQDVSIGVAWYQQKPGKAP KLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YYIYPYTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:286)  CDR1 (SEQ ID NO:287) - QDVSIGVA CDR2 (SEQ ID NO:288) - SASRYT CDR3 (SEQ ID NO:289) - QQYYIYPYT
MGAH22 (US 8802093)	QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCA SGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWI GRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITA DTSSNTAYLQVSRLTSEDVAVYYC	DIVMTQSHKFMSTSVGDRV SITC KASQDVNTAVAWYQQKPGHSP KLLIYSASFRYTGVPDRFTGSRS GTDFFTISSLVQAEDLAVYYCQ

SRWGGDGFYAMDYWGQGASVTV SSA (SEQ ID NO:290)	QHYTTPPTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:294)
CDR1 (SEQ ID NO:291) - GFNIKDT	CDR1 (SEQ ID NO:295) - QDVNTAVA
CDR2 (SEQ ID NO:292) - YPTNGY	CDR2 (SEQ ID NO:296) -
CDR3 (SEQ ID NO:293) - WGGDGFYAMDY	SASFRYT CDR3 (SEQ ID NO:297) - QQHYTTPPT

[136] Альтернативно, новые антигенсвязывающие сайты, которые могут связываться с HER2, могут быть идентифицированы с помощью скрининга на связывание с аминокислотной последовательностью, определенной SEQ ID NO:298.

MELAAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRRLPASPETHLDMLRHLYQGC  
QVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNY  
ALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDI  
FHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGP  
LPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRY  
TFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGM  
EHLREVRVAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITG  
YLYISAWPDSLPLDSVFNQLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIH  
HNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPT  
QCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQC  
VACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCP  
AEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSG  
AMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKA  
NKEILDEAYVMAGVGSPPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQD  
LLNWCMIQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHA  
DGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEK  
GERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEIDLGPA  
SPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSSTRSG  
GGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAACKGLQSLPTHDPSPQLRYSE  
DPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSP  
GKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLPQGGAAPQHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAP  
PSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV (SEQ ID NO:298).

[137] Антигенсвязывающий фрагмент TCR может быть разработан для связывания ассоциированного с опухолью антигенного пептида, презентованного МНС. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR включает переменный домен альфа-цепи и переменный домен бета-цепи, которые могут образовывать пары для связывания с пептидом ТАА, презентованным МНС. В некоторых вариантах

осуществления переменный домен альфа-цепи и переменный домен бета-цепи расположены в формате внеклеточного фрагмента TCR. В некоторых вариантах осуществления переменный домен альфа-цепи и переменный домен бета-цепи слиты вместе с фрагментом scTCR.

[138] Неограничивающие примеры белков, которые могут быть преобразованы в TCR-нацеленные пептиды TAA, включают антигены тканевой дифференциации (*например*, MART-1, gp100, CEA, CD19 и тирозиназу), антигены зародышевой линии опухоли (*например*, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A12, MAGE-C2, BAGE1, GAGE1, STAG1, STAG2, XAGE-1B и SSX2), нормальные белки, сверхэкспрессируемые раковыми клетками, (*например*, hTERT, EGFR, ERBB2, WT1, MUC1 и мезотелин), вирусные белки (*например*, HPV, EBV, и MCC) опухолеспецифичные мутировавшие антигены. Иллюстративные ассоциированные с опухолью антигенсвязывающие сайты перечислены ниже.

[139] В Таблице 5 перечислены пептидные последовательности мишеней TCR и соответствующие последовательности альфа-цепи и бета-цепи TCR.

Таблица 5		
Целевой белок и пептид, презентованный MHC	Внеклеточный фрагмент TCR $\alpha$ переменный домен $\alpha$ -цепи (V $\alpha$ ) CDR3 цепи $\alpha$ (CDR3 $\alpha$ )	Внеклеточный фрагмент TCR-бета переменный домен $\beta$ -цепи (V $\beta$ ) CDR $\beta$ -цепи (CDR3 $\beta$ )
ELAVL4 (UniProt ID P26378) LGYGFVNYI (SEQ ID NO:425) презентованный HLA-A*02:01:48	KEVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYSGK SPELIMSIYSNGDKEDGRFTA QLNKASQYVSLIRDSQPSDS ATYLCVTTDSWGKLQFGA GTQVVVTPDIQNPDAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKSDVYITDKTVLDM RSMDFKSNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:349) V $\alpha$ : KEVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYSGK SPELIMSIYSNGDKEDGRFTA QLNKASQYVSLIRDSQPSDS	NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPGMGL RLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNV SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYF CASRPGLAGGRPEQYFGPGTRLT VTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYALSSRLRVSATFWQD PRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQ DRAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:350) V $\beta$ : NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPGMGL RLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNV

	<p>ATYLCAVTTDSWGKQLQFGA GTQVVVTPDIQNP (SEQ ID NO:351)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVTTDSWGKQLQF (SEQ ID NO:353)</p>	<p>SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYF CASRPGLAGGRPEQYFGPGTRLT VTEDLKNVF (SEQ ID NO:352)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASRPGLAGGRPEQYF (SEQ ID NO:354)</p>
<p>Инсулин (UniProt ID P01308)</p> <p>ALWGPDPAААА (SEQ ID NO:426)</p> <p>презентованный HLA-A*02:01:48</p>	<p>EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMRGDSSYKLIFGS GTRLLVRPDIQNPDPAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKSDSVYITDKCVLDM RSMDFKSNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:355)</p> <p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMRGDSSYKLIFGS GTRLLVRPDIQNP (SEQ ID NO:357)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAMRGDSSYKLIF (SEQ ID NO:359)</p>	<p>AGVIQSPRHEVTEMGQQVTLRC KPISGHDYLFWYRQTMMRGLEL LIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAK MPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFC ASSLWEKLAKNIQYFGAGTRLSV LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYDPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQP ALNDSRYALSSRLRVSATFWQDP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:356)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>AGVIQSPRHEVTEMGQQVTLRC KPISGHDYLFWYRQTMMRGLEL LIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAK MPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFC ASSLWEKLAKNIQYFGAGTRLSV LEDLKNVF (SEQ ID NO:358)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASSLWEKLAKNIQYF (SEQ ID NO:360)</p>
<p>TERT (UniProt ID O14746)</p> <p>ILAKFLHWL (SEQ ID NO:340)</p> <p>презентованный HLA-A*02:01:48</p>	<p>IQVEQSPPDLILQEGANSTLR CNFSDSVNNLWWFHQNPWG QLINLFYIPSGTKQNGRLSAT TVATERYSLLYISSSQTTDSG VYFCAVDSATALPYGYIFGT GTRLKVLANIQNPDPAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQT</p>	<p>AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQC AQDMNHEYMSWYRQDPGMGLR LIHYSIHPEYTDQGEVPNGYNVS RSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFC ASSYQGTEAFFGQGTRLTVVEDL NKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYDPDHVELSWVWNG</p>

	<p>NVSQSKDSDVYITDKCVLDM  RSMDFKSNSAVAWSNKSDFA  CANAFNNSIIPEDTFFPS  (SEQ ID NO:361)</p> <p>V<math>\alpha</math>:  IQVEQSPPDLILQEGANSTLR  CNFSDSVNNLWWFHQNPWG  QLINLFYIPSGTKQNGRLSAT  TVATERYSLLYISSQTDDSG  VYFCAVDSATALPYGYIFGT  GTRLKVLANIQNP (SEQ ID  NO:363)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVDSATALPYGYIF  (SEQ ID NO:365)</p>	<p>KEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDS  RYALSSRLRVSATFWQDPRNHFR  CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV  TQIVSAEAWGRAD (SEQ ID  NO:362)</p> <p>V<math>\beta</math>:  AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQC  AQDMNHEYMSWYRQDPGMGLR  LIHYSIHPEYTDQGEVPNGYNVS  RSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFC  ASSYQGTEAFFGQGTRLTVVEDL  NKVF (SEQ ID NO:364)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASSYQGTEAFF (SEQ ID  NO:366)</p>
<p>ERBB2 (UniProt  ID P04626)  KIFGSLAFL  (SEQ ID NO:341)  презентованный  HLA-A*02</p>	<p>EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC  TYSNSAFQYFMWYRQYSRK  GPELLMYTYSSGNKEDGRFT  AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD  SATYLCAMSLYYGGSQGNLI  FGKGTKLSVKPDPVAVYQLRD  SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS  QSKDSDVYITDKCVLDMRS  MDFKNSAVAWSNKSDFAC  ANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ  ID NO:428)</p> <p>V<math>\alpha</math>:  EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC  TYSNSAFQYFMWYRQYSRK  GPELLMYTYSSGNKEDGRFT  AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD  SATYLCAMSLYYGGSQGNLI  FGKGTKLSVKP (SEQ ID  NO:430)</p>	<p>AGVAQSPRYKIIKRQSVAFWCN  PISGHATLYWYQQILGQGPKLLI  QFQNNGVVDDSQLPKDRFSAER  LKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLC  ASSLEIFGGIADTDTQYFGPGTRL  TVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI  SHTQKATLVCLATGFYPDHVELS  WWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE  QPALNDSRYALSSRLRVSATFWQ  DPRNHFR CQVQFYGLSENDEWT  QDRAKPV TQIVSAEAWGRAD  (SEQ ID NO:429)</p> <p>V<math>\beta</math>:  AGVAQSPRYKIIKRQSVAFWCN  PISGHATLYWYQQILGQGPKLLI  QFQNNGVVDDSQLPKDRFSAER  LKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLC  ASSLEIFGGIADTDTQYF  GPGTRLTVLEDLKNVF (SEQ ID</p>

	<p>CDR3<math>\alpha</math>: CAMSLYYGGSQGNLIF (SEQ ID NO:367)</p>	<p>NO:431) CDR3<math>\beta</math>: CASSLEIFGGIADTDTQYF (SEQ ID NO:368)</p>
<p>WT1 (UniProt ID P19544) RMFPNAPYL (SEQ ID NO:342) презентованный HLA-A*02</p>	<p>EVEQNSGPLSVPEGAIASLNC TYSDRGSQSFFWYRQYSGKS PELIMFIYSNGDKEDGRFTAQ LNKASQYVSLLRDSQPDSA TYLCAVNDQGGGADGLTFG KGTHLIIQPDPAVYQLRDSKS SDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KSDSVYITDKCVLDMRSM FKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:432)</p> <p>V<math>\alpha</math>: EVEQNSGPLSVPEGAIASLNC TYSDRGSQSFFWYRQYSGKS PELIMFIYSNGDKEDGRFTAQ LNKASQYVSLLRDSQPDSA TYLCAVNDQGGGADGLTFG KGTHLIIQP (SEQ ID NO:434)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVNDQGGGADGLTF (SEQ ID NO:369)</p>	<p>NAGVTQTPKFRVLKTGQSMTLL CAQDMNHEYMYWYRQDPGMG LRLIHYSVGEGETTAKGEVPDGYN VSRLKKQNFLLGLESAAPSQTSV YFCASSWWDTGELFFGEGSRLTV LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYDPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQP ALNDSRYALSSRLRVSATFWQDP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:433)</p> <p>V<math>\beta</math>: NAGVTQTPKFRVLKTGQSMTLL CAQDMNHEYMYWYRQDPGMG LRLIHYSVGEGETTAKGEVPDGYN VSRLKKQNFLLGLESAAPSQTSV YFCASSWWDTGELFFGEGSRLTV LEDLKNVF (SEQ ID NO:435)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASSWWDTGELFF (SEQ ID NO:370)</p>
<p>WT1 (UniProt ID P19544) RMFPNAPYL (SEQ ID NO:342) презентованный HLA-A*02</p>	<p>AQSVTQLGSHVSVSEALVL LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP QGLQLLLKYTSAATLVKGIN GFEAEFKKSETSFHLTKPSAH MSDAAEYFCAVSEGGDYKL SFGAGTTVTVRADPAVYQLR DSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKSDSVYITDKCVLDMR</p>	<p>DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLEC VQDMDHENMFWYRQDPGLGLR LIYFSYDVKMKEKGDPIPEGYSVS REKKERFSLILESASTNQTSMYLC AWGTLATEQYFGPGTRLTVTED LKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYDPDHVELSWWN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN</p>

	<p>SMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:436)</p> <p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>AQSVTQLGSHVSVSEALVL LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP QGLQLLKYTSAATLVKGIN GFEAEFKKSETSFHLTKPSAH MSDAAEYFCAVSEGGDYKL SFGAGTTVTVRA (SEQ ID NO:438)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVSEGGDYKLSF (SEQ ID NO:371)</p>	<p>DSRYALSSRLRVSATFWQDPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:437)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLEC VQDMDHENMFWYRQDPGLGLR LIYFSYDVKMKEKGDIPGYSVS REKKERFSLILESASTNQTSMYLC AWGTLATEQYFGPGTRLTVTED LKNVF (SEQ ID NO:439)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CAWGTATEQYF (SEQ ID NO:372)</p>
<p>MAGE-A3 (UniProt ID P43357)</p> <p>CASSFNMATGQ YF (SEQ ID NO:343)</p> <p>презентованный HLA-A1</p>	<p>AQEVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLYVRPYQREQTSG RLNASLDKSSGRSTLYIAASQ PGDSATYLCAVRPGGAGPFF VVFSGKTKLSVIPNIQNPDA VYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKSDVYITDKC VLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIP (SEQ ID NO:373)</p> <p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>AQEVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLYVRPYQREQTSG RLNASLDKSSGRSTLYIAASQ PGDSATYLCAVRPGGAGPFF VVFSGKTKLSVIPNIQNP (SEQ ID NO:375)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVRPGGAGPFF</p>	<p>AGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCS PISGHRSVSWYQQTPGQGLQFLF EYFSETQRNKGFPGRFSGRQFS NSRSEMNVSTLELGDSALYLCAS SFNMATGQYFGPGTRLTVTEDLK NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWWVNGK EVHSGVCTDPQPLKEQPALNSR YALSSRLRVSATFWQDPRNHFRC QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:374)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>AGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCS PISGHRSVSWYQQTPGQGLQFLF EYFSETQRNKGFPGRFSGRQFS NSRSEMNVSTLELGDSALYLCAS SFNMATGQYFGPGTRLTVTEDLK NVF (SEQ ID NO:376)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASSFNMATGQYF (SEQ</p>

	(SEQ ID NO:377)	ID NO:378)
MART1 (UniProt ID Q16655) EAAGIGILTV (SEQ ID NO:344) презентованный HLA-A2	EVEQDPGPLSVPEGAIIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMSETGGFKTIFGA GTRLFVKANIQNPDPVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKSDVYITDKTVLDM RSMDFKSNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:379) V $\alpha$ : EVEQDPGPLSVPEGAIIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMSETGGFKTIFGA GTRLFVKANIQNP (SEQ ID NO:381) CDR3 $\alpha$ : CAMSETGGFKTIF (SEQ ID NO:383)	EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLR QIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKV SRKEKRNFLILESPSPNQTSLYF CASSLVGTAGSPLHFGNGTRLTV TEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:380) V $\beta$ : EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLR QIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKV SRKEKRNFLILESPSPNQTSLYF CASSLVGTAGSPLHFGNGTRLTV TEDLNKVF (SEQ ID NO:382) CDR3 $\beta$ : CASSLVGTAGSPLHF (SEQ ID NO:384)
SSX2 (UniProt ID Q16385) KASEKIFYV (SEQ ID NO:345) презентованный HLA-A2	CDR3 $\alpha$ : CAMTSGFGNEKLTIF (SEQ ID NO:387)	CDR3 $\beta$ : CATSRGQGGQPQHF (SEQ ID NO:388)
BIRC5, также называется сурвивин (UniProt ID O15392)	GESVGLHLPTLSVQEGDNSII NCAYSNSASDYFIWYKQESG KGPQFIIDIRSNMDKRQGQR VTVLLNKTVKHLSLQIAATQ PGDSAVYFCAENCAETVTDS	DAMVIQNPRYQVTQFGKPVTLSC SQTLNHNVMYWYQQKSSQAPKL LFHYYDKDFNNEADTPDNFQSR RPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYL CATSRGDSTAEPQHFGDGTRLSIL

<p>ELTLGEFLKL (SEQ ID NO:346) презентованный HLA-A2</p>	<p>WGKLQFGAGTQVVVTPDPA VYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFF PS (SEQ ID NO:440)</p> <p>V<math>\alpha</math>: GESVGLHLPTLSVQEGDNSII NCAYSNSASDYFIWYKQESG KGPQFIIDIRSNMDKRQQR VTVLLNKTVKHLSLQIAATQ PGDSAVYFCAENCAETVTDS WGKLQFGAGTQVVVTP (SEQ ID NO:442)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAETVTDSWGKLQF (SEQ ID NO:389)</p>	<p>EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPA LNDSRYALSSRLRVSATFWQDPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:441)</p> <p>V<math>\beta</math>: DAMVIQNPRYQVTQFGKPVTLSC SQTLNHNVMYWYQKSSQAPKL LFHYDVKDFNNEADTPDNFQSR RPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYL CATSRGDSTAEPQHFGDTRL SIL EDLNKVF (SEQ ID NO:443)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CATSRGDSTAEPQHF (SEQ ID NO:390)</p>
<p>BIRC5, также называется сурвивин (UniProt ID O15392) ELTLGEFLKL (SEQ ID NO:346) презентованный HLA-A2</p>	<p>AQKITQTQPGMFVQEKEAVT LDCTYDTSQSYGLFWYKQ PSSGEMIFLIYQGSYDEQNAT EGRYSLNFQKARKSANL VIS ASQLGDSAMYFCAMREGGG YNKLIFGAGTRLAVHPDPAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDVYITDKTV LDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:385)</p> <p>V<math>\alpha</math>: AQKITQTQPGMFVQEKEAVT LDCTYDTSQSYGLFWYKQ PSSGEMIFLIYQGSYDEQNAT EGRYSLNFQKARKSANL VIS ASQLGDSAMYFCAMREGGG</p>	<p>SQTIHQWPATLVQPVGSPLSLEC TVEGTSNPPLYWYRQAAGRGLQ LLFYSVGIGQISSEVPQNLSASRP QDRQFILSSKLLLSDSGFYLCAG QDLNTEAFFGQGTRLTVVEDLN KVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWWVNGK EVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSR YALSSRLRVSATFWQDPRNHFRC QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:386)</p> <p>V<math>\beta</math>: SQTIHQWPATLVQPVGSPLSLEC TVEGTSNPPLYWYRQAAGRGLQ LLFYSVGIGQISSEVPQNLSASRP QDRQFILSSKLLLSDSGFYLCAG</p>

	YNKLIFGAGTRLAVHP (SEQ ID NO:444)  CDR3 $\alpha$ : CAMREGGGYNKLIF (SEQ ID NO:391)	QDLNTEAFFGQGTRLTVVEDLN KVF (SEQ ID NO:445)  CDR3 $\beta$ : CAGQDLNTEAFF (SEQ ID NO:392)
PRAME (UniProt ID P78395)  QLLALLPSL (SEQ ID NO:347)  презентованный HLA-A2	AQSVTQLGSHVSVSERALVLR LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP NQGLQLLLKYTSAATLVKGI NGFEAEFKKSETSFHLTKPSA HMSDAAEYFCAVSGQTGAN NLFFGTGTRLTVIPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKDSDVYITDK TVLDMRSMDFKSN SAVAWS NKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPS (SEQ ID NO:393)  V $\alpha$ : AQSVTQLGSHVSVSERALVLR LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP NQGLQLLLKYTSAATLVKGI NGFEAEFKKSETSFHLTKPSA HMSDAAEYFCAVSGQTGAN NLFFGTGTRLTVIPYIQNP (SEQ ID NO:395)  CDR3 $\alpha$ : CAVSGQTGANNLF (SEQ ID NO:397)	DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQF LIQYYNGEERAKGNILERFSAQQ FPDLHSELNLSSLELGDSALYFCA SARWDRGGGEQYFGPGTRLTVTE DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:394)  V $\beta$ : DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQF LIQYYNGEERAKGNILERFSAQQ FPDLHSELNLSSLELGDSALYFCA SARWDRGGGEQYFGPGTRLTVTE DLKNVF (SEQ ID NO:396)  CDR3 $\beta$ : CASARWDRGGGEQYF (SEQ ID NO:398)
PRAME (UniProt ID P78395)  QLLALLPSL (SEQ ID NO:347)  презентованный HLA-A2	GQQLNQSPQSMFIQEGEDVSM NCTSSSIFNTWLWYKQDPG EGPVLLIALYKAGELTSNGR LTAQFGITRKDSFLNISASIPS DVGIYFCAGIPRDNYGQNFV FGPGTRLSVLPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKTVL	DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLEC VQDMDHENMFWYRQDPGLGLR LIYFSYDVKMKEKGDPIPEGYSVS REKKERFSLILESASTNQTSMYLC ASTPWLAGGNEQFFGPGTRLTVL EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL

	<p>DMRSMDFKSNSA VAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:399)</p> <p>V<math>\alpha</math>: GQQLNQSPQSMFIQEGEDVS MNCTSSSIFNTWLWYKQDPG EGPVLLIALYKAGELTSNGR LTAQFGITRKDSFLNISASIPS DVGIYFCAGIPRDNYGQNFV FGPGTRLSVLPYIQNP (SEQ ID NO:401)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAGIPRDNYGQNFVF (SEQ ID NO:403)</p>	<p>NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRN HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:400)</p> <p>V<math>\beta</math>: DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLEC VQDMDHENMFWYRQDPGLGLR LIYFSYDVKMKEKGDIPGYSVS REKKERFSLILESASTNQTSMYLC ASTPWLAGGNEQFFGPGTRLTVL EDLKNVF (SEQ ID NO:402)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASTPWLAGGNEQFF (SEQ ID NO:404)</p>
<p>PRAME (UniProt ID P78395)  QLLALLPSL (SEQ ID NO:347) презентованный HLA-A2</p>	<p>QKEVEQNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPELIMFIYSNGDKEDGRFT AQLNKASQYVSLIRDSQPS DSATYLCAVKDNAGNMLTF GGGTRLMVKPHIQNPDAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSA VAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:405)</p> <p>V<math>\alpha</math>: QKEVEQNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPELIMFIYSNGDKEDGRFT AQLNKASQYVSLIRDSQPS DSATYLCAVKDNAGNMLTF GGGTRLMVKPHIQNP (SEQ ID NO:407)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVKDNAGNMLTF</p>	<p>DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQF LIQYNGEERAKGNILERFSAQQ FPDLHSELNLSLELGDSALYFCA SSDGGGVYEQYFGPGTRLTVTED LKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWVN GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALND SRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHF RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:406)</p> <p>V<math>\beta</math>: DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQF LIQYNGEERAKGNILERFSAQQ FPDLHSELNLSLELGDSALYFCA SSDGGGVYEQYFGPGTRLTVTED LKNVF (SEQ ID NO:408)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASSDGGGVYEQYF</p>

	(SEQ ID NO:409)	(SEQ ID NO:410)
NY-ESO-1 (UniProt ID P78358) SLLMWITQC (SEQ ID NO:348) презентованный HLA-A*02:01:48	QEVTQIPAALSVPEGENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLLIQSSQREQTSGR NASLDKSSGRSTLYIAASQPG DSATYLCAVRPTSGGSYIPTF GRGTSLIVHPYIQNPDPVYQ LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKCVLDM RMSDFKNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:411) V $\alpha$ : QEVTQIPAALSVPEGENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLLIQSSQREQTSGR NASLDKSSGRSTLYIAASQPG DSATYLCAVRPTSGGSYIPTF GRGTSLIVHPYIQNP (SEQ ID NO:413) CDR3 $\alpha$ : CAVRPTSGGSYIPTF (SEQ ID NO:415)	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA SSVVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWVN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRYALSSRLRVSATFWQDPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:412) V $\beta$ : GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA SSVVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVF (SEQ ID NO:414) CDR3 $\beta$ : CASSYVGNTGELFF (SEQ ID NO:416)
NY-ESO-1 (UniProt ID P78358) SLLMWITQC (SEQ ID NO:348) презентованный HLA-A*02:01:48	KQQVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GGKLTSLLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSAGSSTLYIAASQP GDSATYLCAVRPTSGGSYIPT FGRGTSLIVHPYIQNPDPVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKCVL DMRSMDFKNSAVAWSNKSD DFACANAFNNSIIPEDTFFPSP E (SEQ ID NO:417)	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA SSVVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWVN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRYALSSRLRVSATFWQDPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID

	<p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>KQQVTQIPAALSVPEGENLV LNCSTDSAIYNLQWFRQDP GGKLTSLLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSAGSSTLYIAASQP GDSATYLC AVRPTSGGSYIPT FGRGTS LIVHPYIQNP (SEQ ID NO:418)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVRPTSGGSYIPTF (SEQ ID NO:415)</p>	<p>NO:412)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA SSYVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVF (SEQ ID NO:414)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASSYVGNTGELFF (SEQ ID NO:416)</p>
<p>NY-ESO-1 (UniProt ID P78358)</p> <p>SLLMWITQC (SEQ ID NO:348)</p> <p>презентованный HLA-A*02:01:48</p>	<p>KQEVTTQIPAALSVPEGENLV LNCSTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSSGSSTLYIAASQP GDSATYLC AVRPLLDGTYIP TFGRGTS LIVHPYIQNPDP YQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSVYITDKCV LDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNS (SEQ ID NO:419)</p> <p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>KQEVTTQIPAALSVPEGENLV LNCSTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSSGSSTLYIAASQP GDSATYLC AVRPLLDGTYIP TFGRGTS LIVHPYIQNP (SEQ ID NO:421)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVRPLLDGTYIPTF (SEQ ID NO:423)</p>	<p>GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVS RSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVYFC ASSYLGNTGELFFGEGSRLTVLE DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWV NGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYALSSRLRVSATFWQDPRN HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:420)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVS RSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVYFC ASSYLGNTGELFFGEGSRLTVLE DLKNVF (SEQ ID NO:422)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASSYLGNTGELFF (SEQ ID NO:424)</p>

**Константная область антитела и гетеродимеризация**

[140] Константная область антитела (домен Fc), описанная в настоящем

изобретении, может происходить из константной области антитела любого вида, которое связывается с CD16. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области человеческого антитела, такой как константная область человеческого IgG1, константная область IgG2, константная область IgG3 или константная область IgG4. В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кот, мышь или лошадь. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела включает шарнир, домен CH2, домен CH3 и, необязательно, домен CH1. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела, которая включает шарнир, домен CH2, домен CH3 и, необязательно, домен CH1, происходит из антитела IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела включает аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.

[141] В Fc-домене связывание CD16 опосредовано шарнирной областью и доменом CH2. Например, в человеческом IgG1 взаимодействие с CD16 в первую очередь сосредоточено на аминокислотных остатках Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239 и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамин в домене CH2 (см. Sondermann *et al.*, Nature, 406 (6793):267-273). Основываясь на известных доменах, мутации могут быть выбраны для повышения или понижения аффинности связывания с CD16, например, используя библиотеки фагового дисплея или библиотеки выявляемых на поверхности дрожжей кДНК, или могут быть сконструированы, основываясь на известной трехмерной структуре взаимодействия.

[142] В определенных вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в CH1 константной области человеческого IgG1, могут находиться на аминокислотных остатках V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171 и/или V173. В определенных вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в Cк константной области человеческого IgG1, могут находиться на аминокислотных остатках E123, F116, S176, V163, S174 и/или T164.

[143] Сборка тяжелых цепей гетеродимерного антитела может быть выполнена путем экспрессии последовательностей тяжелой цепи двух различных антител в одной и той же клетке, что может привести к сборке гомодимеров каждой тяжелой цепи антитела, а также сборке гетеродимеров. Способствовать предпочтительной сборке гетеродимеров можно путем введения различных мутаций в домен CH3 каждой константной области антитела, как показано в US13/494870, US16/028850, US11/533709, US12/875015, US13/289934, US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480 и US14/830336. Например, мутации могут быть сделаны в домене CH3 на основе человеческого IgG1 и включать в себя отдельные пары аминокислотных замен в первом полипептиде и втором полипептиде, что позволяет этим двум цепям селективно гетеродимеризоваться друг с

другом. Положения аминокислотных замен, показанные ниже, все пронумерованы в соответствии с индексом EU, как в Кабат.

[144] В одном сценарии аминокислотная замена в первом полипептиде заменяет исходную аминокислоту более крупной аминокислотой, выбранной из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) или триптофана (W), и по меньшей мере одна аминокислотная замена во втором полипептиде заменяет исходную аминокислоту(-ы) меньшей аминокислотой (-ами), выбранной из аланина (A), серина (S), треонина (T) или валина (V), таким образом что более крупная аминокислотная замена (выпуклость) помещается на поверхности меньших аминокислотных замен (полость). Например, один полипептид может содержать замену T366W, а другой может содержать три замены, включая T366S, L368A и Y407V.

[145] Одна или более мутаций могут быть включены в константную область по сравнению с константной областью человеческого IgG1, например, в Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и/или K439. Примеры замен включают, например, Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, T350V, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, T394W, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

[146] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, представленных в таблице 6.

Таблица 6	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	S364E/F405A	Y349K/T394F
Набор 2	S364H/D401K	Y349T/T411E
Набор 3	S364H/T394F	Y349T/F405A
Набор 4	S364E/T394F	Y349K/F405A
Набор 5	S364E/T411E	Y349K/D401K
Набор 6	S364D/T394F	Y349K/F405A
Набор 7	S364H/F405A	Y349T/T394F
Набор 8	S364K/E357Q	L368D/K370S
Набор 9	L368D/K370S	S364K
Набор 10	L368E/K370S	S364K
Набор 11	K360E/Q362E	D401K
Набор 12	L368D/K370S	S364K/E357L

Набор 13	K370S	S364K/E357Q
Набор 14	F405L	K409R
Набор 15	K409R	F405L

[147] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, представленных в таблице 7.

Таблица 7		
	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	K409W	D399V/F405T
Набор 2	Y349S	E357W
Набор 3	K360E	Q347R
Набор 4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

[148] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора замен, представленного в таблице 8.

Таблица 8		
	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	T366K/L351K	L351D/L368E
Набор 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
Набор 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
Набор 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
Набор 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
Набор 6	E356K/D399K	K392D/K409D

[149] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена в каждой полипептидной цепи может быть выбрана из таблицы 9.

Таблица 9	
Первый полипептид	Второй полипептид
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, K409F, K409W, T411D и T411E

[150] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора замен в Таблице 10, где положение(я), указанное в столбце «Первый полипептид», заменено любой известной отрицательно заряженной аминокислотой, и положение(я), указанное в столбце «Второй полипептид», заменено

любой известной положительно заряженной аминокислотой.

Таблица 10	
Первый полипептид	Второй полипептид
K392, K370, K409 или K439	D399, E356 или E357

[151] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора в Таблице 11, где положение(я), указанное в столбце «Первый полипептид», заменено любой известной положительно заряженной аминокислотой, и указанное положение(я) в столбце «Второй полипептид», заменено любой известной отрицательно заряженной аминокислотой.

Таблица 11	
Первый полипептид	Второй полипептид
D399, E356 или E357	K409, K439, K370 или K392

[152] Альтернативно аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора в таблице 12.

Таблица 12	
Первый полипептид	Второй полипептид
T350V, L351Y, F405A и Y407V	T350V, T366L, K392L и T394W

[153] Альтернативно или дополнительно, структурная стабильность гетеромультимерного белка может быть увеличена введением S354C в первую или вторую полипептидную цепь и введением Y349C в противоположную полипептидную цепь, что создает искусственный дисульфидный мостик на границе двух полипептидов.

[154] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, L368 и Y407.

[155] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, L368 и Y407, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366.

[156] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411, и





последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами O347R, D399V и F405T.

[169] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами O347R, D399V и F405T, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W.

[170] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366W, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V.

[171] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой T366W.

[172] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W.

[173] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V.

[174] Ниже перечислены примеры мутаций в константных областях, которые делают возможной гетеродимеризацию двух полипептидных цепей. Каждая тяжелая цепь A1, A2, B1 и B2 трастузумаба включает переменный домен тяжелой цепи трастузумаба (последовательность жирного шрифта) и константную область, полученную из IgG1 человека с мутациями в подчеркнутых аминокислотах. Тяжелая цепь A1 трастузумаба и тяжелая цепь B1 трастузумаба могут предпочтительно спариваться и образовывать

гетеродимер. Тяжелая цепь A2 трастузумаба и тяжелая цепь B2 трастузумаба могут предпочтительно спариваться и образовывать гетеродимер.

Тяжелая цепь A трастузумаба

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARI  
YPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA  
MDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD  
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
AKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSGDSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID  
NO:299).**

Тяжелая цепь B трастузумаба

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARI  
YPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA  
MDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD  
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
AKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID  
NO:300).**

Тяжелая цепь A1 трастузумаба

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARI  
YPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA  
MDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD  
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP  
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\* (SEQ ID  
NO:301).**

Тяжелая цепь B1 трастузумаба

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARI  
YPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA  
MDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD  
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV**

LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\* (SEQ ID NO:302).

[175] Описанные выше белки могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалисту в данной области. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую цепь иммуноглобулина, содержащую scFv, шарнир и константную область антитела, может быть клонирована в первый вектор экспрессии; вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую цепь иммуноглобулина, например, содержащую другой scFv, шарнир и константную область антитела, или содержащую тяжелую цепь антитела, может быть клонирована во второй вектор экспрессии; и третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь антитела, может быть клонирована в третий вектор экспрессии. Первый, второй и, необязательно, третий векторы экспрессии можно стабильно трансфицировать совместно в клетки-хозяева для получения мультимерных белков, описанных в данном документе.

[176] Для достижения наивысшего выхода мультиспецифического связывающего белка можно исследовать различные соотношения первого, второго и третьего вектора экспрессии, чтобы определить оптимальное соотношение для трансфекции в клетки-хозяева. После трансфекции отдельные клоны могут быть выделены для создания банка клеток с использованием способов, известных в данной области, таких как ограниченное разведение, ИФА, FACS, микроскопия или Clonепix.

[177] Клоны можно культивировать в условиях, подходящих для увеличения масштаба биореактора и поддержания экспрессии мультиспецифического связывающего белка. Мультиспецифические связывающие белки могут быть выделены и очищены с использованием методов, известных в данной области, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, лизис клеток, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, хроматографию обмена с гидрофобным взаимодействием и хроматографию со смешанным режимом.

## **II. ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

[178] В изобретении предложены способы лечения рака с использованием описанного в данном документе мультиспецифического связывающего белка и/или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Способы можно использовать для лечения различных видов рака, включая солидную опухоль, лимфому и лейкоз. Желательно, чтобы тип рака, подлежащего лечению, соответствовал типу раковой клетки, с которой связывается белок. Например, лечение рака, экспрессирующего HER2, такого как рак молочной железы, экспрессирующий HER2, желательно лечить с использованием описанного в данном документе белка, который связывается с белком. В некоторых вариантах осуществления изобретение предлагает способы лечения различных видов рака, которые экспрессируют ВСМА, путем введения пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества мультиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе. В некоторых вариантах

осуществления изобретение предлагает способы лечения различных видов рака, которые экспрессируют CD33, путем введения пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества мультиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе.

[179] Соответственно, один аспект изобретения предлагает способ лечения рака у пациента, где способ включает введение пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества белка, описанного в данном документе, для лечения рака. Дополнительные аспекты и варианты терапевтических способов описаны ниже.

[180] Терапевтический способ можно охарактеризовать в зависимости от рака, который подлежит лечению. Например, в некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых других вариантах осуществления рак представляет собой рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной груди, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, лейкоз, рак легких, рак печени, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак прямой кишки, рак почек, рак желудка, рак яичек или рак матки. В еще других вариантах осуществления рак представляет собой васкуляризованную опухоль, плоскоклеточную карциному, аденокарциному, мелкоклеточную карциному, меланому, нейробластому, саркому (*например*, ангиосаркому или хондросаркому), рак гортани, рак околоушной железы, рак желчных путей, рак щитовидной железы, акральную лентигинозную меланому, актинический кератоз, острый лимфолейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденоидно-кистозную карциному, аденомы, аденосаркому, аденосквamousную карциному, рак анального канала, анальный рак, аноректальный рак, астроцитарную опухоль, карциному бартолиновой железы, базально-клеточную карциному, рак желчных путей, рак кости, рак костного мозга, рак бронхов, карциному бронхов, нейроэндокринную опухоль, холангиокарциному, хондосаркому, папиллому/карциному сосудистого сплетения, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный лейкоз, светлоклеточную карциному, рак соединительной ткани, цистаденому, рак пищеварительной системы, рак двенадцатиперстной кишки, рак эндокринной системы, опухоль энтодермального синуса, гиперплазию эндометрия, стромальную саркому эндометрия, эндометриоидную аденокарциному, рак эндотелиальных клеток, эпендимальный рак, эпителиально-клеточный рак, саркому Юинга, рак глаза и орбиты, рак женских половых органов, очаговую узловую гиперплазию, рак желчного пузыря, рак антрального отдела желудка, рак дна желудка, гастриному, глиобластому, глюкагоному, рак сердца, гемангиобластомы, гемангиоэндотелиому, гемангиомы, аденому печени, аденоматоз печени, гепатобилиарный рак, гепатоцеллюлярную карциному, болезнь Ходжкина, рак подвздошной кишки, инсулиному, интраэпителиальную неоплазию, межэпителиальную плоскоклеточную неоплазию, рак внутривенного желчного протока, инвазивную плоскоклеточную карциному, рак тощей кишки, рак суставов, саркому Капоши, рак таза, крупноклеточную карциному, рак толстой кишки,

лейомиосаркому, меланому типа злокачественного лентиго, лимфому, рак половых органов у мужчин, злокачественную меланому, злокачественные мезотелиальные опухоли, медуллобластому, медуллоэпителиому, менингеальный рак, мезотелиальный рак, метастатическую карциному, рак рта, мукоэпидермоидную карциному, множественную миелому, рак мышц, рак носового тракта, рак нервной системы, нейроэпителиальную аденокарциному, узловую меланому, неэпителиальный рак кожи, овсяноклеточную карциному, олигодендроглиальный рак, рак полости рта, остеосаркому, папиллярно-серозную аденокарциному, рак полового члена, рак глотки, опухоли гипофиза, плазмоцитому, псевдосаркому, легочную бластому, рак прямой кишки, почечно-клеточную карциному, рак дыхательной системы, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому, серозную карциному, рак придаточных пазух носа, рак кожи, мелкоклеточную карциному, рак тонкой кишки, рак гладких мышц, рак мягких тканей, соматостатин-секретирующую опухоль, рак позвоночника, плоскоклеточную карциному, рак поперечно-полосатых мышц, субмезотелиальный рак, поверхностную распространяющуюся меланому, Т-клеточный лейкоз, рак языка, недифференцированную карциному, рак мочеочника, рак мочеиспускательного канала, рак мочевого пузыря, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак тела матки, увеальную меланому, рак влагалища, веррукозную карциному, ВИПому, рак вульвы, высокодифференцированную карциному или опухоль Вильмса.

[181] В некоторых других вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, представляет собой неходжкинскую лимфому, такую как В-клеточная лимфома или Т-клеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой В-клеточную лимфому, такую как диффузная В-крупноклеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, малая лимфоцитарная лимфома, лимфома из мантийных клеток, В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, экстранодальная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, узловая В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки, лимфома Беркитта, лимфома плазмобластическая лимфома, лейкоз ворсистых клеток или первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых других вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой Т-клеточную лимфому, такую как Т-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, периферическая Т-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома кожи, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, экстранодальная естественный киллер/Т-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома энтеропатического типа, Т-клеточная лимфома типа подкожного панникулита, анапластическая крупноклеточная лимфома или периферическая Т-клеточная лимфома.

[182] В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания представляют собой АМЛ, миелодиспластические синдромы, хронический миеломоноцитарный лейкоз, миелоидный бластный криз хронического миелоидного лейкоза и ALL.

[183] В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, можно охарактеризовать в соответствии с наличием конкретного антигена, экспрессируемого на

поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка может экспрессировать один или более из следующего перечня в дополнение к ВСМА: CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD1.

[184] В некоторых вариантах осуществления раковая клетка может экспрессировать один или более из следующего перечня в дополнение к CD33: CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, TROP2, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD1.

[185] В некоторых вариантах осуществления раковая клетка может экспрессировать один или более из следующего перечня в дополнение к HER2: CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD1.

[186] В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, может быть охарактеризован по презентованию конкретного пептида ТАА посредством МНС на поверхности раковой клетки. Неограничивающие примеры белков, которые могут быть преобразованы в TCR-нацеленные пептиды ТАА, включают антигены тканевой дифференциации (*например*, MART-1, gp100, CEA, CD19 и тирозиназу), антигены зародышевой линии опухоли (*например*, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A12, MAGE-C2, BAGE1, GAGE1, CTAG1, CTAG2, XAGE-1B и SSX2), нормальные белки, сверхэкспрессируемые раковыми клетками, (*например*, hTERT, EGFR, ERBB2, WT1, MUC1 и мезотелин), вирусные белки (*например*, HPV, EBV, и MCC) опухолеспецифичные мутировавшие антигены. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид ELAVL4, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 425, презентованный HLA-A\*02:01:48. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид инсулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426, презентованный HLA-A\*02:01:48. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид hTERT, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 340, презентованный HLA-A\*02:01:48. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид ERBB2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341, презентованный HLA-A\*02. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид WT1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, презентованный HLA-A\*02. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид MAGE-A3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 343, презентованный HLA-A1. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид MART1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид BIRC5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 346,

презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид PRAME, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 347, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид NY-ESO-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 348, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид SSX2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345, презентованный HLA-A2.

### **III. КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ**

[187] Другой аспект изобретения предлагает комбинированную терапию. Описанный в данном документе мультиспецифический связывающий белок можно использовать в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами для лечения рака.

[188] Примеры терапевтических агентов, которые можно использовать как часть комбинированной терапии при лечении рака, включают, например, облучение, митомицин, третиноин, рибомустин, гемцитабин, винкристин, этопозид, кладрибин, митобронитол, метотрексат, доксорубин, карбоксон, пентостатин, нитракрин, зиностатин, цетрореликс, летрозол, ралтитрексед, даунорубин, фазрозол, фотемустин, тималфазин, собузоксан, недаплатин, цитарабин, бикалутаид, винорелбин, веснаринон, аминоклутетимид, амсакрин, проглумид, эллиптиния ацетат, кетансерин, доксифлуридин, этретинат, изотретиноин, стрептозоцин, нимустин, виндезин, флутаид, наркотический, бутонин, кармофур, разоксан, сизофилан, карбоплатин, митолактол, тегафур, ифосфамид, преднимустин, пицибанил, левамизол, тенипозид, импросульфам, эноцитабин, лизурид, оксиметолон, тамоксифен, прогестерон, мепитиостан, эпителиостанол, форместан, интерферон-альфа, интерферон-2 альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма, колониестимулирующий фактор 1, колониестимулирующий фактор 2, денилейкин дифтитокс, интерлейкин-2, фактор высвобождения лютеинизирующего гормона и варианты вышеупомянутых агентов, которые могут проявлять дифференциальное связывание с родственным ему рецептором и увеличивать или уменьшать период полужизни в сыворотке.

[189] Дополнительным классом агентов, которые можно использовать как часть комбинированной терапии при лечении рака, являются ингибиторы иммунных контрольных точек. Примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают агенты, которые ингибируют один или более из (i) антигена 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), (ii) белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v) B7-H3, (vi) B7-H4 и (vii) TIM3. Ингибитор CTLA4 ипилимумаб был одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США для лечения меланомы.

[190] Еще другие агенты, которые могут использоваться как часть комбинированной терапии при лечении рака, представляют собой агенты с моноклональными антителами, которые нацелены на мишени, не являющиеся контрольными точками (*например,*

герцептин), и нецитотоксические агенты (*например*, ингибиторы тирозинкиназы).

[191] Еще другие категории противораковых средств включают, например: (i) ингибитор, выбранный из ингибитора ALK, ингибитора ATR, антагониста A2A, ингибитора эксцизионной репарации оснований, ингибитора тирозинкиназы Bcr-Abl, ингибитора тирозинкиназы Брутона, ингибитора CDC7, ингибитора CHK1, ингибитора циклинзависимой киназы, ингибитора ДНК-ПК, ингибитора как ДНК-ПК, так и mTOR, ингибитора DNMT1, ингибитора DNMT1 плюс 2-хлор-дезоксиаденозина, ингибитора HDAC, ингибитора механизма передачи сигналов hedgehog, ингибитора IDO, ингибитора JAK, ингибитора mTOR, ингибитора MEK, ингибитора MELK, ингибитора MTH1, ингибитора PARP, ингибитора фосфоинозитид-3-киназы, ингибитора как PARP1, так и DHODH, ингибитора протеасомы, ингибитора топоизомеразы-II, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора VEGFR и ингибитора WEE1; (ii) агонист OX40, CD137, CD40, GITR, CD27, HVEM, TNFRSF25 или ICOS; и (iii) цитокин, выбранный из IL-12, IL-15, GM-CSF и G-CSF.

[192] Белки по настоящему изобретению также можно использовать в качестве дополнения к хирургическому удалению первичного поражения.

[193] Количество мультиспецифического связывающего белка и дополнительного терапевтического агента и относительное время введения могут быть выбраны для достижения желаемого комбинированного терапевтического эффекта. Например, при назначении комбинированной терапии пациенту, нуждающемуся в таком введении, терапевтические агенты в комбинации или фармацевтическая композиция или композиции, содержащие терапевтические агенты, могут вводиться в любом порядке, например, последовательно, параллельно, вместе, одновременно и тому подобное. Кроме того, например, мультиспецифический связывающий белок можно вводить в то время, когда дополнительный терапевтический агент(ы) оказывает свое профилактическое или терапевтическое действие, или *наоборот*.

#### **IV. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ**

[194] Настоящее описание также предлагает фармацевтические композиции/составы, которые содержат терапевтически эффективное количество мультиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе.

[195] Композиция может быть составлена для использования в различных системах доставки лекарств. Один или более физиологически приемлемых эксципиентов или носителей также могут быть включены в композицию для правильного приготовления. Подходящие составы для использования в настоящем описании можно найти в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Для краткого обзора способов доставки лекарств *см., например*, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

[196] Состав для внутривенной доставки лекарственного средства по настоящему изобретению может содержаться в пакете, ручке или шприце. В некоторых вариантах осуществления пакет может быть соединен с каналом, содержащим трубку и/или иглу. В

некоторых вариантах осуществления состав может быть лиофилизированным составом или жидким составом. В некоторых вариантах осуществления состав может быть высушенным сублимацией (лиофилизирован) и содержаться примерно в 12-60 флаконах. В некоторых вариантах осуществления состав может быть лиофилизированным, и 45 мг лиофилизированного состава может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления от около 40 мг до около 100 мг лиофилизированной композиции может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав из 12, 27 или 45 флаконов объединяют для получения терапевтической дозы белка в форме лекарственного состава для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления состав может быть жидким и храниться в количестве от примерно 250 мг/флакон до примерно 1000 мг/флакон. В некоторых вариантах осуществления состав может быть жидким и храниться в количестве примерно 600 мг/флакон. В некоторых вариантах осуществления состав может быть жидким и храниться в количестве примерно 250 мг/флакон.

[197] Белки по настоящему изобретению могут существовать в жидком водном фармацевтическом составе, включающем терапевтически эффективное количество белка в забуференном растворе, образующем состав.

[198] Эти композиции можно стерилизовать обычными методами стерилизации или можно стерилизовать фильтрованием. Полученные водные растворы могут быть упакованы для использования как есть или лиофилизированы, при этом лиофилизированный препарат перед введением объединяют со стерильным водным носителем. рН препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 или от 6 до 8, и наиболее предпочтительно от 7 до 8, например от 7 до 7,5. Полученные композиции в твердой форме могут быть упакованы в виде многократных единиц разовых доз, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеуказанного агента или агентов. Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер в произвольном количестве.

[199] В некоторых вариантах осуществления настоящее описание предлагает состав с увеличенным сроком хранения, включающий белок по настоящему описанию, в комбинации с маннитом, моногидратом лимонной кислоты, цитратом натрия, дигидратом динатрийфосфата, дигидратом дигидрофосфата натрия, хлоридом натрия, полисорбатом 80, водой и гидроксидом натрия.

[200] В некоторых вариантах осуществления готовят водный состав, включающий белок по настоящему описанию в рН-буферном растворе. Буфер по настоящему изобретению может иметь рН в диапазоне от примерно 4 до примерно 8, *например* от примерно 4,5 до примерно 6,0, или от примерно 4,8 до примерно 5,5, или может иметь рН от примерно 5,0 до примерно 5,2. Промежуточные диапазоны в пределах указанных выше значений рН, также входят в объем данного изобретения. Например, подразумевается, что включены диапазоны значений, в которых комбинации любого из вышеперечисленных значений используются в качестве верхней и/или нижней границ. Примеры буферов, которые будут регулировать рН в этом диапазоне, включают ацетатные (*например*, ацетат

натрия), сукцинатные (такие, как сукцинат натрия), глюконатные, гистидиновые, цитратные и другие буферы органических кислот.

[201] В некоторых вариантах осуществления состав включает буферную систему, которая содержит цитрат и фосфат для поддержания рН в диапазоне от примерно 4 до примерно 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон рН может составлять от примерно 4,5 до примерно 6,0 или от примерно рН 4,8 до примерно 5,5 или в диапазоне рН от примерно 5,0 до примерно 5,2. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает моногидрат лимонной кислоты, цитрат натрия, дигидрат динатрийфосфата и/или дигидрат дигидрофосфата натрия. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает примерно 1,3 мг/мл лимонной кислоты (*например*, 1,305 мг/мл), примерно 0,3 мг/мл цитрата натрия (*например*, 0,305 мг/мл), примерно 1,5 мг/мл дигидрата фосфата динатрия (*например*, 1,53 мг/мл), примерно 0,9 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия (*например*, 0,86) и примерно 6,2 мг/мл хлорида натрия (*например*, 6,165 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления буферная система включает 1-1,5 мг/мл лимонной кислоты, 0,25-0,5 мг/мл цитрата натрия, 1,25-1,75 мг/мл дигидрата динатрийфосфата, 0,7-1,1 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия и от 6,0 до 6,4 мг/мл хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления рН композиции регулируют гидроксидом натрия.

[202] В состав также может быть включен полиол, который действует как тонизирующий агент и может стабилизировать антитело. Полиол добавляют в композицию в количестве, которое может варьироваться в зависимости от желаемой изотоничности композиции. В некоторых вариантах осуществления водный состав может быть изотоническим. Количество добавляемого полиола также может быть изменено в зависимости от молекулярной массы полиола. Например, может быть добавлено меньшее количество моносахарида (*например*, маннита) по сравнению с дисахаридом (таким, как трегалоза). В некоторых вариантах осуществления полиол, который можно использовать в составе в качестве тонизирующего агента, представляет собой маннит. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от примерно 5 до примерно 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от примерно 7,5 до примерно 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять примерно 10-14 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять примерно 12 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в композицию может быть включен полиол сорбит.

[203] В состав также могут быть добавлены детергент или ПАВ. Типовые детергенты включают неионогенные детергенты, такие как полисорбаты (*например*, полисорбаты 20, 80 и т.д.) или полоксамеры (*например*, полоксамер 188). Количество добавляемого детергента таково, что оно снижает агрегацию антитела в составе и/или сводит к минимуму образование частиц в составе и/или снижает адсорбцию. В некоторых вариантах осуществления состав может включать ПАВ, которое представляет собой полисорбат. В некоторых вариантах осуществления состав может содержать детергент полисорбат 80 или Твин 80. Твин 80 - это термин, используемый для описания полиоксиэтилен (20)

сорбитанмоноолеата (см. Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996). В некоторых вариантах осуществления состав может содержать от примерно 0,1 мг/мл до примерно 10 мг/мл полисорбата 80 или от примерно 0,5 мг/мл до примерно 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в состав может быть добавлено около 0,1% полисорбата 80.

[204] В вариантах осуществления белковый продукт по настоящему изобретению составлен в виде жидкого состава. Жидкий состав может быть представлен в концентрации 10 мг/мл либо во флаконе 50R типа I согласно Фармакопеи США/ Европейской Фармакопеи, закрытом резиновой пробкой и запечатанном алюминиевой обжимной крышкой. Пробка может быть изготовлена из эластомера, соответствующего Фармакопеи США и Европейской Фармакопеи. В некоторых вариантах осуществления флаконы могут быть заполнены 61,2 мл раствора белкового продукта, чтобы обеспечить экстрагируемый объем 60 мл. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может быть разбавлен 0,9% физиологическим раствором.

[205] В некоторых вариантах осуществления жидкий состав белков по настоящему описанию может быть приготовлен в виде раствора с концентрацией 10 мг/мл в комбинации с сахаром на стабилизирующем уровне. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может быть приготовлен в водном носителе. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор может быть добавлен в количестве, не превышающем то, которое может привести к нежелательной или непригодной для внутривенного введения вязкости. В некоторых вариантах осуществления сахар может быть дисахаридом, *например*, сахарозой. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может также включать один или более из буферного агента, ПАВ и консерванта.

[206] В некоторых вариантах осуществления pH жидкого состава может быть установлен путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может быть соляной кислотой. В некоторых вариантах осуществления основание может представлять собой гидроксид натрия.

[207] Помимо агрегации, дезамидирование является распространенным вариантом образования продукта пептидов и белков, которое может происходить во время ферментации, сбора/очистки клеток от примесей, очистки, хранения лекарственного вещества/лекарственного препарата и во время анализа образцов. Деамидирование - это потеря  $\text{NH}_3$  белком с образованием промежуточного сукцинимиды, который может подвергаться гидролизу. Промежуточный сукцинимид приводит к снижению массы исходного пептида на 17 дальтон. Последующий гидролиз приводит к увеличению массы на 18 дальтон. Выделение промежуточного сукцинимиды затруднено из-за нестабильности в водных условиях. По существу, дезамидирование обычно обнаруживается по увеличению массы на 1 дальтон. Дезамидирование аспарагина приводит к образованию либо аспарагиновой, либо изоаспарагиновой кислоты. Параметры, влияющие на скорость дезамидирования, включают pH, температуру, диэлектрическую проницаемость

растворителя, ионную силу, первичную последовательность, локальную конформацию и третичную структуру полипептида. Аминокислотные остатки, прилегающие к Asn в пептидной цепи, влияют на скорость дезамидирования. Gly и Ser, следующие за Asn в белковых последовательностях, приводят к более высокой чувствительности к дезамидированию.

[208] В некоторых вариантах осуществления жидкий состав белков по настоящему описанию может храниться в условиях pH и влажности для предотвращения дезаминирования белкового продукта.

[209] Представляющий интерес водный носитель в данном документе является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для приготовления жидкого состава. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (*например*, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[210] Консервант может быть необязательно добавлен в составы по настоящему изобретению для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, облегчить производство состава для многократного использования (многократного приема).

[211] Внутривенные (в/в) составы могут быть предпочтительным путем введения в определенных случаях, например, когда пациент находится в больнице после трансплантации и получает все лекарства внутривенным путем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия перед введением. В некоторых вариантах осуществления разбавленный лекарственный продукт для инъекций является изотоническим и подходит для введения путем внутривенной инфузии.

[212] В некоторых вариантах осуществления компоненты соли или буфера могут быть добавлены в количестве от 10 мМ до 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и являются производными различных известных кислот (неорганических и органических) с металлами или аминами, «образующими основания». В некоторых вариантах осуществления буфер может быть фосфатным буфером. В некоторых вариантах осуществления буфер может быть глицинатным, карбонатным, цитратным буферами, и в этом случае ионы натрия, калия или аммония могут служить в качестве противоиона.

[213] Консервант может быть необязательно добавлен в составы по настоящему изобретению для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, облегчить производство состава для многократного использования (многократного приема).

[214] Представляющий интерес водный носитель в данном документе является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для приготовления жидкого состава. Иллюстративные носители включают

стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), рН-буферный раствор (*например*, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[215] Белки по настоящему описанию могут существовать в лиофилизированном составе, включающем белки и лиопротектор. Лиопротектором может быть сахаром, *например*, дисахаридами. В некоторых вариантах осуществления лиопротектор может представлять собой сахарозу или мальтозу. Лиофилизированный состав может также включать один или более из буферного агента, ПАВ, наполнителя и/или консерванта.

[216] Количество сахарозы или мальтозы, пригодное для стабилизации лиофилизированного лекарственного продукта, может находиться в массовом соотношении по меньшей мере 1:2 белка к сахарозе или мальтозе. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение белка и сахарозы или мальтозы может составлять от 1:2 до 1:5.

[217] В некоторых вариантах осуществления рН состава перед лиофилизацией может быть установлен путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может быть соляной кислотой. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемое основание может представлять собой гидроксид натрия.

[218] Перед лиофилизацией рН раствора, содержащего белок по настоящему описанию, может быть отрегулирован от 6 до 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон рН для лиофилизированного лекарственного продукта может составлять от 7 до 8.

[219] В некоторых вариантах осуществления компоненты соли или буфера могут быть добавлены в количестве от 10 мМ до 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и являются производными различных известных кислот (неорганических и органических) с металлами или аминами, «образующими основания». В некоторых вариантах осуществления буфер может быть фосфатным буфером. В некоторых вариантах осуществления буфер может быть глицинатным, карбонатным, цитратным буферами, и в этом случае ионы натрия, калия или аммония могут служить в качестве противоиона.

[220] В некоторых вариантах осуществления может быть добавлен «наполнитель». «Наполнитель» представляет собой соединение, которое добавляет массу лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной массы (*например*, облегчает производство по существу однородной лиофилизированной массы, которая поддерживает открытопористую структуру). Иллюстративные наполнители включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лиофилизированные составы по настоящему изобретению могут содержать такие наполнители.

[221] Консервант может быть необязательно добавлен в составы по настоящему изобретению для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, *например*, облегчить производство состава для многократного использования

(многократного приема).

[222] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт может быть составлен с водным носителем. Представляющий интерес водный носитель в данном документе является фармацевтически приемлемым (*например*, безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для приготовления жидкого состава после лиофилизации. Иллюстративные разбавители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), рН-буферный раствор (*например*, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[223] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт по настоящему описанию восстанавливается либо стерильной водой для инъекций, Фармакопея США (SWFI), либо 0,9% хлорида натрия для инъекций, Фармакопея США. Во время восстановления лиофилизированный порошок растворяется в растворе.

[224] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт по настоящему описанию состоит из примерно 4,5 мл воды для инъекций и разбавляется 0,9% физиологическим раствором (раствор хлорида натрия).

[225] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться для получения количества активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента.

[226] Конкретная доза может быть одинаковой для каждого пациента, например, 50-5000 мг белка. В качестве альтернативы доза для пациента может быть адаптирована к приблизительной массе тела или площади поверхности пациента. Другие факторы при определении подходящей дозировки могут включать заболевание или состояние, которое подлежит лечению или предотвращению, тяжесть заболевания, способ введения, а также возраст, пол и состояние здоровья пациента. Дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения подходящей для лечения дозировки, обычно выполняется специалистами в данной области техники, особенно в свете информации о дозировке и анализе, описанных в данном документе. Дозировка также может быть определена с помощью общепринятых анализов для определения используемых доз в сочетании с соответствующими данными доза-реакция. Индивидуальная дозировка для пациента может быть скорректирована по мере наблюдения за развитием болезни. Можно измерить уровни целевого конструкта или комплекса в крови у пациента, чтобы увидеть, нужно ли корректировать дозировку для достижения или поддержания эффективной концентрации. Для определения того, какие целевые конструкции и/или комплексы, а также их дозировки, наиболее вероятно будут эффективны для данного человека, может использоваться фармакогеномика (Schmitz *et al.*, *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer *et al.*, *Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).

[227] Как правило, дозировки, основанные на массе тела, составляют от примерно

0,01 мкг до примерно 100 мг на кг массы тела, такие как от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 50 мкг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 10 мкг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 1 мкг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 0,1 мкг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 10 мкг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 1 мкг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 50 мкг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 10 мкг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 50 мкг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 50 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 1 мг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 1 мг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 1 мг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 10 мг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 10 мг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 50 мг до примерно 100 мг/кг массы тела.

[228] Дозы можно вводить один или более раз в день, в неделю, в месяц или в год или даже один раз в 2-20 лет. Специалисты в данной области могут легко оценить частоту повторения для дозирования на основании измеренного времени удержания и концентраций целевого конструкта или комплекса в жидкостях или тканях организма. Введение по настоящему изобретению может быть внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутриплевральным, интратекальным, внутриполостным, перфузией через катетер или прямой инъекцией внутрь очага поражения. Их можно вводить один или более раз в день, один или более раз в неделю, один или более раз в месяц и один или более раз в год.

[229] Вышеприведенное описание описывает множество аспектов и вариантов осуществления изобретения. В данной патентной заявке конкретно рассматриваются все комбинации и изменения аспектов и вариантов осуществления.

## ПРИМЕРЫ

[230] Теперь изобретение, в целом описываемое, будет более легко понято со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

### Пример 1. Очистка F3-TriNKET и F3'-TriNKET

[231] Белки F3-TriNKET и F3'-TriNKET были очищены в соответствии со стадиями, которые используются для очистки терапевтических моноклональных антител. Вкратце, метод очистки включал очистку протеина А (достигается примерно 80-90% мономера) с последующей стадией элюирования солевым раствором Rogos HS CIEX (достигается примерно 97-99% мономера). Для клинического производственного процесса может быть добавлена дополнительная стадия очистки с помощью Q сефарозы или Q Mustang (проточный режим) (для достижения около 99% мономера) для дальнейшего снижения всего белка клетки (WCP) и ДНК СНО.

[232] Очищенный F3'-TriNKET имеет высокую термостабильность (DSC), аналогичную терапевтическим моноклональным антителам. А стабильность мутантного Fc, содержащего F3'-TriNKET, близка к Fc IgG1. См. таблицу 13 ниже.

Таблица 13

Молекула	Tm <sub>1</sub> (°C)	Tm <sub>2</sub> (°C)	Tm <sub>3</sub> (°C)
Герцептин	72,4	83,6	
F3'-TriNKET	73,2	79,0	86,7

### Пример 2. F3'-TriNKET стабилен на протяжении по крайней мере 4-х недель

[233] В ускоренном исследовании стабильности, проведенном при 37 °C, было обнаружено, что F3'-TriNKET стабилен в течение 4 недель. См. ФИГ. 3А-3С.

[234] Очищенный F3'-TriNKET был стабилен при низком уровне pH. 20 мг/мл очищенного белка инкубировали в течение 2 часов в глицине при pH 3,0. На ФИГ. 4 показано, что очищенный F3'-TriNKET был стабилен при низком уровне pH.

[235] Очищенный F3'-TriNKET был стабилен после 5 циклов замораживания-оттаивания. На ФИГ. 5А и ФИГ. 5В показано, что очищенный F3'-TriNKET был стабилен после 5 циклов замораживания-оттаивания, независимо от pH (на ФИГ. 5А показаны циклы замораживания-оттаивания в PBS, а на ФИГ. 5В показаны циклы замораживания-оттаивания в цитрате при pH 5,5).

[236] Очищенный F3'-TriNKET был стабилен в исследованиях принудительной деградации. На ФИГ. 6 показаны столбчатые графики условий принудительной деградации, в которых F3'-TriNKET оставался стабильным.

### Пример 3. Оценка связывания TriNKET с клетками, экспрессирующими раковые антигены человека

[237] Линии раковых клеток человека, экспрессирующие представляющий интерес раковый антиген, использовали для оценки связывания TriNKET с опухолевым антигеном. Клеточную линию AML человека Molm-13 использовали для оценки связывания F3'-TriNKET-CD33 с клетками, экспрессирующими CD33. Клеточную линию HER2+ Colo-201 использовали для оценки связывания F3'-TriNKET-HER2 с клетками, экспрессирующими HER2. F3'-TriNKET-HER2 и F3'-TriNKET-CD33 разводили и инкубировали с соответствующими клетками. Связывание F3'-TriNKET-HER2 и F3'-TriNKET-CD33 с HER2-экспрессирующими и CD33-экспрессирующими клетками, соответственно, детектировали с использованием конъюгированных с флуорофором вторичных антител к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, связывание MFI с HER2- и CD33-экспрессирующими клетками, соответственно, нормализовали по вторичным контрольным антителам для получения кратных значений по сравнению с контрольными значениями.

#### **Пример 4. Первичный анализ цитотоксичности НК-клеток человека**

[238] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Выделенные PBMC промывали и готовили для выделения НК-клеток. НК-клетки выделяли с использованием метода отрицательной селекции с помощью магнитных шариков, чистота выделенных НК-клеток обычно составляла > 90% CD3-CD56 +. Выделенные НК-клетки оставляли на ночь и использовали на следующий день для анализа цитотоксичности.

##### *Анализ цитотоксичности DELFIA:*

[239] Линии раковых клеток человека, экспрессирующие представляющую интерес мишень, собирали из культуры, клетки промывали PBS и ресуспендировали в питательной среде в концентрации  $10^6$ /мл для мечения реагентом BATDA (Perkin Elmer AD0116). При мечении клеток-мишеней соблюдались инструкции производителя. После мечения клетки промывали 3 раза PBS и ресуспендировали в культуральной среде при  $0,5-1,0 \times 10^5$ /мл. Для приготовления контрольных лунок аликвоту меченых клеток откладывали, и клетки центрифугировали из среды. 100 мкл среды осторожно добавляли в лунки в трех повторностях, чтобы не повредить осажденные клетки. 100 мкл меченых BATDA клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. В лунках предотвращали спонтанное высвобождение из клеток-мишеней, и лунки готовили для максимального лизиса клеток-мишеней добавлением 1% Тритона-Х. Моноклональные антитела или TriNKET к интересующей опухолевой мишени разводили в культуральной среде, в каждую лунку добавляли 50 мкл разведенных mAb или TriNKET. Покоящиеся и/или активированные НК-клетки собирали из культуры, клетки промывали и ресуспендировали в концентрации  $10^5-2,0 \times 10^6$ /мл в культуральной среде в зависимости от желаемого соотношения Е:Т. В каждую лунку планшета добавляли 50 мкл НК-клеток, чтобы получить общий объем культуры 200 мкл. Планшет инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$  в течение 2-3 часов перед разработкой анализа.

[240] После культивирования в течение 2-3 часов планшет вынимали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 минут. 20 мкл супернатанта культуры переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем, и в каждую лунку добавляли 200 мкл раствора европия комнатной температуры. Планшет защищали от света и инкубировали на шейкере для планшетов при 250 об/мин в течение 15 минут. Планшет считывали с помощью приборов Victor 3 или SpectraMax i3X. % специфического лизиса рассчитывали следующим образом: % специфического лизиса = ((экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение) / (максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение)) \* 100%.

*Анализ цитотоксичности проточной цитометрией*

[241] Линии раковых клеток человека, экспрессирующие ВСМА и трансдуцированные для стабильной экспрессии NucLight Green (Essen BioScience 4475) после отбора пуромицином, собирали из культуры, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации  $10^5$ /мл в культуральной среде. 100 мкл клеток-мишеней добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. TriNKET к ВСМА разводили в культуральной среде и 50 мкл каждого добавляли в повторные лунки. Очищенные НК человека, оставленные на ночь, собирали из культуры, промывали и ресуспендировали в концентрации  $4 \times 10^5$ /мл в культуральной среде. Для соотношения Е:Т 2:1 50 мкл НК-клеток добавляли во все лунки, за исключением контрольных, содержащих только мишени, в которые добавляли 100 мкл культуральной среды. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 30 часов.

[242] После совместного культивирования клетки окрашивали, фиксировали и анализировали проточной цитометрией. Оставшиеся клетки-мишени были обнаружены со значительными сдвигами в канале ФИТЦ, при этом мертвые клетки исключены с помощью окрашивания в отношении жизнеспособности. Было выделено количество событий Green и рассчитан % уничтожения путем сравнения с контрольными образцами, содержащими только мишени. Были включены гранулы для счета, чтобы гарантировать сопоставимость записанных объемов.

**Пример 5. F3' TriNKET связываются с клетками, экспрессирующими опухолевые антигены**

[243] На ФИГ. 7 показано связывание F3'-TriNKET-HER2 или трастузумаба с клетками HER2+ Colo-201. F3'-TriNKET-HER2 связывал клетки Colo-201 с большей максимальной кратностью по сравнению с контролем, но имел слегка пониженное значение связывания EC<sub>50</sub>.

[244] На ФИГ. 8 показано связывание моноклонального антитела F3'-TriNKET-CD33 или CD33 с CD33, экспрессируемым на клетках Molm-13. F3'-TriNKET связывал клетки Molm-13 с аналогичной максимальной кратностью по сравнению с контролем и значением связывания EC<sub>50</sub> по сравнению с mAb к CD33.

**Пример 6. F3'-TriNKET опосредуют цитотоксичность НК в отношении клеток-мишеней HER2+ и CD33+:**

[245] На ФИГ. 9 и ФИГ. 10 показана цитотоксичность, опосредованная F3'-

TriNKET-HER2, в отношении линии клеток 786-О с низким уровнем HER2 и линии клеток SkBr-3 с высоким уровнем HER2, соответственно. F3'-TriNKET-HER2 обеспечивал эффективные значения EC<sub>50</sub> для индукции NK-опосредованной цитотоксичности в отношении клеточных линий как с низким уровнем HER2, так и с высоким уровнем HER2. По сравнению с трастузумабом, F3'-TriNKET-HER2 обеспечивал больший максимальный специфический лизис и более эффективные значения EC<sub>50</sub> для клеток, экспрессирующих HER2, как с низким уровнем, так и с высоким уровнем.

[246] ФИГ. 11 и ФИГ. 12 демонстрируют опосредованную F3'-TriNKET-CD33 цитотоксичность в отношении двух CD33-положительных линий клеток человека, EOL-1 и ТНР-1, соответственно. Моноклональное антитело CD33 было способно увеличивать лизис NK-клетками клеток-мишеней EOL-1 (ФИГ. 11), но было обнаружено, что оно неэффективно против линии клеток ТНР-1 с высоким уровнем FcR (ФИГ. 12). F3'-TriNKET-CD33 обеспечивал субнаномолярные значения EC<sub>50</sub> для индукции NK-опосредованной цитотоксичности в отношении клеток-мишеней ТНР-1 и EOL-1.

#### **Пример 7. F4-TriNKET опосредуют цитотоксичность NK**

[247] В этом примере описывается эффективность опосредованного бивалентным TriNKET формата F4 усиления уничтожения NK-клетками раковых клеток-мишеней. В этом примере описывается связывание бивалентного TriNKET формата F4 с целевыми клетками. В этом примере описывается влияние бивалентного TriNKET формата F4 на стабилизацию и поддержание высокой экспрессии ВСМА на клеточной поверхности. В этом примере описывается, что avidность бивалентного TriNKET формата F4 к своей мишени улучшает аффинность, с которой TriNKET связывается с антигеном-мишенью, что фактически стабилизирует экспрессию и поддержание высоких уровней антигена-мишени на поверхности клетки.

#### Стабилизация поверхности ВСМА с помощью F4-TriNKET

[248] ВСМА-положительные клетки миеломы KMS12-PE инкубировали с 10 мкг/мл F4-TriNKET или моноклональным антителом (ЕМ-901), образцы делили на три части, аликвоты каждого образца помещали на лед на 20 минут, выдерживали при 37°C в течение 2 часов или 37°C в течение 24 часов. После периода инкубации клетки промывали и связанный F4-TriNKET детектировали с использованием вторичного антитела к IgG человека. После окрашивания клетки фиксировали и хранили при 4 °C, все образцы анализировали в конце исследования.

#### Оценка связывания F4-TriNKET с клетками, экспрессирующими раковые антигены человека

[249] Линии раковых клеток человека, экспрессирующие ВСМА, использовали для оценки связывания F4-TriNKET с опухолевым антигеном (*например*, A49-F4-TriNKET-ВСМА, NKG2D-связывающим доменом из клона ADI-27749 и ВСМА-связывающим доменом, полученным из ЕМ-901). Клеточная линия множественной миеломы человека MM.1R, которая экспрессирует ВСМА на более высоком уровне, чем клетки миеломы KMS12-PE, была использована для оценки связывания TriNKET с клетками, которые

экспрессируют высокие уровни ВСМА. F4-TriNKET разводили и инкубировали с клетками MM.1R. Связывание F4-TriNKET детектировали с помощью конъюгированного с флуорофором вторичного антитела к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, связывание MFI с клетками, экспрессирующими ВСМА, нормализовали по вторичным контрольным антителам для получения кратных значений по сравнению с контрольными значениями.

#### Первичный анализ цитотоксичности NK-клеток человека

[250] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Выделенные PBMC промывали и готовили для выделения NK-клеток. NK-клетки выделяли с использованием метода отрицательной селекции с помощью магнитных шариков, чистота выделенных NK-клеток обычно составляла > 90% CD3-CD56<sup>+</sup>. Выделенные NK-клетки оставляли на ночь и использовали на следующий день для анализа цитотоксичности.

[251] *Анализ цитотоксичности DELFIA*: Линии раковых клеток человека, экспрессирующие представляющую интерес мишень, собирали из культуры, клетки промывали PBS и ресуспендировали в питательной среде в концентрации  $10^6$ /мл для мечения реагентом BATDA (Perkin Elmer AD0116). При мечении клеток-мишеней соблюдались инструкции производителя. После мечения клетки промывали 3 раза PBS и ресуспендировали в культуральной среде при  $0,5-1,0 \times 10^5$ /мл. Для приготовления контрольных лунок аликвоту меченых клеток откладывали, и клетки центрифугировали из среды. 100 мкл среды осторожно добавляли в лунки в трех повторностях, чтобы не повредить осажденные клетки. 100 мкл меченых BATDA клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. В лунках предотвращали спонтанное высвобождение из клеток-мишеней, и лунки готовили для максимального лизиса клеток-мишеней добавлением 1% Тритона-X. Моноклональные антитела или TriNKET к интересующей опухолевой мишени разводили в культуральной среде, в каждую лунку добавляли 50 мкл разведенных mAb или TriNKET. Покоящиеся и/или активированные NK-клетки собирали из культуры, клетки промывали и ресуспендировали в концентрации  $10^5-2,0 \times 10^6$ /мл в культуральной среде в зависимости от желаемого соотношения Е:Т. В каждую лунку планшета добавляли 50 мкл NK-клеток, чтобы получить общий объем культуры 200 мкл. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 2-3 часов перед разработкой анализа. После культивирования в течение 2-3 часов планшет вынимали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 минут. 20 мкл супернатанта культуры переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем, и в каждую лунку добавляли 200 мкл раствора европия комнатной температуры. Планшет защищали от света и инкубировали на шейкере для планшетов при 250 об/мин в течение 15 минут. Планшет считывали с помощью приборов Victor 3 или SpectraMax i3X. % специфического лизиса рассчитывали следующим образом: % специфического лизиса = ((экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение) / (максимальное высвобождение -

спонтанное высвобождение)) \* 100%.

#### Цитотоксичность НК, опосредованная F4-TriNKET

[252] Исследовали опосредованный F4-TriNKET лизис ВСМА-положительных миеломных клеток. На ФИГ. 19 показан опосредованный F4-TriNKET лизис ВСМА-положительных клеток миеломы KMS12-PE покоящимися эффекторными клетками НК человека. На ФИГ. 20 показан опосредованный F4-TriNKET лизис ВСМА-положительных клеток миеломы MM.1R покоящимися эффекторными клетками НК человека. Моноклональное антитело EM-901 использовали в качестве контроля в обоих экспериментах. На ФИГ. 19, клетки KMS12-PE (низкий уровень экспрессии ВСМА) использовали в качестве клеток-мишеней; а на ФИГ. В качестве клеток-мишеней использовали 20 MM.1R (высокий уровень экспрессии ВСМА). В отношении клеток с высокой и низкой экспрессией ВСМА, MM.1R и KMS12-PE, соответственно, F4-TriNKET имел субнаномолярные значения EC<sub>50</sub>. По сравнению с моноклональным антителом ВСМА EM-901, F4-TriNKET обеспечивает более высокий максимальный специфический лизис и эффективность в отношении обеих клеточных линий.

[253] На ФИГ. 21 показано связывание F4-TriNKET (A49-F4-TriNKET-BCMA), DuoBody-TriNKET (A49-DB-TriNKET-BCMA) или моноклонального антитела ВСМА (EM-901) с клетками миеломы MM.1R. Все три белка были способны связываться с ВСМА, экспрессируемым на клетках MM.1R, дозозависимым образом. Авидные связывающие были способны связываться со слегка пониженной максимальной кратностью по сравнению с моновалентными связывающими, но avidность связывания обеспечивала улучшенное значение связывания EC<sub>50</sub>.

#### F4-TriNKET стабилизируют поверхностный ВСМА

[254] На ФИГ. 22 показано окрашивание поверхностного ВСМА моноклональным антителом F4-TriNKET или ВСМА (EM-901) после инкубации в течение указанного времени. И mAb к ВСМА (EM-901), и F4-TriNKET были способны быстро стабилизировать поверхностный ВСМА после инкубации. mAb к ВСМА (EM-901) и F4-TriNKET были способны поддерживать повышенную поверхностную экспрессию ВСМА в течение 24 часов.

[255] ФИГ. 23 показывает стабилизацию поверхностного ВСМА на клетках KMS12-PE после инкубации с F4-TriNKET или моноклональным антителом к ВСМА (EM-901). Начальная стабилизация ВСМА на клеточной поверхности произошла быстро после воздействия F4-TriNKET или mAb (EM-901). Авидное связывание, обеспечиваемое F4-TriNKET и моноклональным антителом (EM-901), поддерживало высокий уровень поверхностного ВСМА дольше, чем моновалентное связывание ВСМА, на что указывает падение экспрессии поверхностного ВСМА через 24 часа с DuoBody-TriNKET.

#### *F4-TriNKET опосредуют значительную долгосрочную цитотоксичность*

[256] Анализ цитотоксичности проточной цитометрии: Линии раковых клеток человека, экспрессирующие ВСМА и трансдуцированные для стабильной экспрессии NucLight Green (Essen BioScience 4475) после отбора пуromицином, собирали из культуры,

центрифугировали и ресуспендировали в концентрации  $10^5$ /мл в культуральной среде. 100 мкл клеток-мишеней добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. TriNKET к ВСМА разводили в культуральной среде и 50 мкл каждого добавляли в повторные лунки. Очищенные НК человека, оставленные на ночь, собирали из культуры, промывали и ресуспендировали в концентрации  $4 \times 10^5$ /мл в культуральной среде. Для соотношения Е:Т 2:1 50 мкл НК-клеток добавляли во все лунки, за исключением контрольных, содержащих только мишени, в которые добавляли 100 мкл культуральной среды. Планшет инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$  в течение 30 часов.

[257] После совместного культивирования клетки окрашивали, фиксировали и анализировали проточной цитометрией. Оставшиеся клетки-мишени были обнаружены со значительными сдвигами в канале ФИТЦ, при этом мертвые клетки исключены с помощью окрашивания в отношении жизнеспособности. Было выделено количество событий Green и рассчитан % уничтожения путем сравнения с контрольными образцами, содержащими только мишени. Были включены гранулы для счета, чтобы гарантировать сопоставимость записанных объемов.

#### *F4-TriNKET опосредуют значительную долгосрочную цитотоксичность*

[258] На ФИГ. 24 и ФИГ. 25 показан лизис НК-клетками человека ВСМА-положительных клеточных линий-мишеней с соотношением Е:Т на уровне 2:1 в присутствии F4- или DB-TriNKET через 30 часов. На ФИГ. 24 показано уничтожение клеток KMS12-PE (низкий уровень экспрессии ВСМА) по сравнению с уничтожением контроля без белка, тогда как на ФИГ. 25 в качестве клеток-мишеней использовали клетки MM.1S (более высокий уровень экспрессии ВСМА). По сравнению с моновалентным DuoBody-TriNKET, F4-TriNKET продемонстрировал повышенное уничтожение линий клеток с высоким и низким уровнем экспрессией ВСМА при всех тестируемых концентрациях.

#### **ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ**

[259] Полное описание каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в данном документе, включено посредством ссылки для всех целей.

#### **ЭКВИВАЛЕНТЫ**

[260] Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от сущности или его существенных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в данном документе. Следовательно, объем данного изобретения указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, и все изменения, которые подпадают под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, должны быть включены в ее объем.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), связанный с константным доменом антитела через шарнир, содержащий Ala-Ser, причем scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи.
2. Полипептид по п. 1, в котором вариабельный домен тяжелой цепи образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи.
3. Полипептид по п. 2, в котором дисульфидный мостик образован между С44 из вариабельного домена тяжелой цепи и С100 из вариабельного домена легкой цепи.
4. Полипептид по любому из пп. 1-3, в котором вариабельный домен тяжелой цепи связан с вариабельным доменом легкой цепи через гибкий линкер.
5. Полипептид по п. 4, в котором гибкий линкер содержит  $(G_4S)_4$ .
6. Полипептид по любому из пп. 1-5, в котором вариабельный домен тяжелой цепи расположен на N-конце или C-конце вариабельного домена легкой цепи.
7. Полипептид по любому из пп. 1-6, в котором шарнир дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly.
8. Полипептид по любому из пп. 1-7, в котором константный домен антитела содержит Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16.
9. Полипептид по п. 8, в котором константный домен антитела содержит домен CH2 и CH3 антитела IgG1 человека.
10. Полипептид по п. 9, в котором константный домен антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.
11. Полипептид по п. 10, в котором константный домен антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную Fc-домену IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439.
12. Полипептид по п. 11, в котором константный домен антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную Fc-домену IgG1 человека и отличается одной или более заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.
13. Полипептид по любому из пп. 1-12, в котором scFv связывает NKG2D или ассоциированный с опухолью антиген.
14. Полипептид по п. 13, в котором scFv связывается с NKG2D, и вариабельный домен тяжелой цепи scFv содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере



24. Полипептид по п. 14, в котором вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 60, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 61.

25. Полипептид по п. 14, в котором вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 62, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 66.

26. Полипептид по п. 14, в котором вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 70, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 74.

27. Полипептид по п. 14, в котором вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 78, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 82.

28. Полипептид по п. 14, в котором вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 86, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 90.

29. Полипептид по п. 14, в котором вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 102, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 106.

30. Полипептид по п. 13, в котором scFv связывается с NKG2D, и в котором вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 110, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 111.

31. Полипептид по п. 13, в котором scFv связывается с NKG2D, и в котором вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 112, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 113.

32. Полипептид по п. 13, в котором scFv связывается с ассоциированным с опухолью антигеном, причем ассоциированный с опухолью антиген выбран из группы, состоящей из ANO1, BCMA, EpCAM, CAIX, CEA, CCR4, CD2, CD123, CD133, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CLAUDIN-18.2, DLL3, EGFR/ERBB1, GD2, IGF1R, HER2, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSMA, мезотелина, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, TROP2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, PD1, 5T4,

GPNUMB, FR-альфа, PAPP-A, FLT3, GPC3, CXCR4, ROR1, ROR2, HLA-E, PD-L1, VLA4, CD44, CD13, CD15, CD47, CLL1, CD81, CD23, CD79a, CD79b, CD80, CRLF2, SLAMF7, CD138, CA125, NaPi2b, нектин4, ADAM8, ADAM9, SLC44A4, CA19-9, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, ULRA 1, LILRA2, LILRA3, ULRA4, LILRA5 и ULRA6, CCR8, CD7, CTLA4, CX3CR1, ENTPD1, HAVCR2, IL-1R2, PDCD1LG2, TIGIT, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, GEM, NT5E, TNFRSF18, MUC1, P-кадгерина, плексина-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, erbB-3, EDNRB, Tyrp1, CD14, CD163, CSF3R, Siglec-9, ITGAM, VISTA, B7-H4 (VTCN1), CCR1, LRRC25, PTAFR, SIRPB1, TLR2, TLR4, CD300LB, ATP1A3, CCR5, MUC1 (или MUC1-C), плексина-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, AXL, EDNRB, OLR1 и TYRP1.

33. Белок, содержащий scFv по любому из предыдущих пунктов.

34. Белок, содержащий:

первый антигенсвязывающий сайт, причем первый антигенсвязывающий сайт содержит полипептид по любому из пп. 1-32;

второй антигенсвязывающий сайт; и

второй константный домен антитела.

35. Белок по п. 34, в котором первый антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, и второй антигенсвязывающий сайт связывает ассоциированный с опухолью антиген.

36. Белок по п. 34, в котором первый антигенсвязывающий сайт связывает ассоциированный с опухолью антиген, и второй антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D.

37. Белок по любому из пп. 34-36, в котором второй антигенсвязывающий сайт содержит scFv или Fab.

38. Белок по любому из пп. 34-37, в котором второй константный домен антитела содержит шарнир и домен CH2 антитела IgG1 человека.

39. Белок по любому из пп. 34-38, в котором второй константный домен антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.

40. Белок по п. 39, в котором второй константный домен антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную Fc-домену IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439.

41. Белок, содержащий:

(a) первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ассоциированный с опухолью антиген;

(b) второй антигенсвязывающий сайт, который связывает тот же ассоциированный с опухолью антиген, что и первый антигенсвязывающий сайт;

(c) третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; и

(d) константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16,

или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16.

42. Белок по п. 41, в котором первый антигенсвязывающий сайт содержит scFv или Fab.

43. Белок по п. 41 или 42, в котором второй антигенсвязывающий сайт содержит scFv или Fab.

44. Белок по любому из пп. 41-43, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит scFv или Fab.

45. Белок по любому из пп. 41-44, в котором ассоциированный с опухолью антиген выбран из группы, состоящей из ANO1, BCMA, EpCAM, CAIX, CEA, CCR4, CD2, CD123, CD133, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CLAUDIN-18.2, DLL3, EGFR/ERBB1, GD2, IGF1R, HER2, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSMA, мезотелина, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, TROP2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, PD1, 5T4, GPNMB, FR-альфа, PAPP-A, FLT3, GPC3, CXCR4, ROR1, ROR2, HLA-E, PD-L1, VLA4, CD44, CD13, CD15, CD47, CLL1, CD81, CD23, CD79a, CD79b, CD80, CRLF2, SLAMF7, CD138, CA125, NaPi2b, нектин4, ADAM8, ADAM9, SLC44A4, CA19-9, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, ULRA 1, LILRA2, LILRA3, ULRA4, LILRA5 и ULRA6, CCR8, CD7, CTLA4, CX3CR1, ENTPD1, HAVCR2, IL-1R2, PDCD1LG2, TIGIT, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, GEM, NT5E, TNFRSF18, MUC1, P-кадгерина, плексина-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, erbB-3, EDNRB, Tyrp1, CD14, CD163, CSF3R, Siglec-9, ITGAM, VISTA, B7-H4 (VTCN1), CCR1, LRRC25, PTAFR, SIRPB1, TLR2, TLR4, CD300LB, ATP1A3, CCR5, MUC1 (или MUC1-C), плексина-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, AXL, EDNRB, OLR1 и TYRP1.

46. Белок по любому из пп. 41-45, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:322, SEQ ID NO:325, SEQ ID NO:328, SEQ ID NO:331, SEQ ID NO:334 и SEQ ID NO:337.

47. Белок по п. 46, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 94, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 98.

48. Белок по п. 46, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 322, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 98.

49. Белок по п. 46, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по



меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 62, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 66.

58. Белок по п. 46, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 70, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 74.

59. Белок по п. 46, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 78, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 82.

60. Белок по п. 46, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 86, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 90.

61. Белок по п. 46, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 102, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 106.

62. Белок по любому из пп. 41-45, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 110, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 111.

63. Белок по любому из пп. 41-45, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 112, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 113.

64. Белок по любому из пп. 41-63, в котором константная область антитела или ее часть, достаточная для связывания CD16, содержит шарнир и домен CH2 антитела IgG1 человека.

65. Белок по п. 64, в котором константная область антитела или ее часть, достаточная для связывания CD16, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.

66. Белок по п. 65, в котором константная область антитела или ее часть, достаточная

для связывания CD16, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную Fc-домену IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439.

67. Белок, содержащий:

антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D;

антигенсвязывающий фрагмент Т-клеточного рецептора (TCR); и

константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16.

68. Белок по п. 67, в котором антигенсвязывающий сайт представляет собой Fab-фрагмент, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой одноцепочечный фрагмент TCR (scTCR).

69. Белок по п. 68, в котором фрагмент scTCR связан с полипептидной цепью константной области антитела через шарнир, содержащий Ala-Ser.

70. Белок по п. 67, в котором антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой внеклеточный фрагмент TCR.

71. Белок по п. 70, в котором scFv связан с полипептидной цепью константной области антитела через шарнир, содержащий Ala-Ser.

72. Белок по п. 69 или п. 71, в котором шарнир дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly.

73. Белок по п. 67, в котором антигенсвязывающий сайт представляет собой Fab-фрагмент, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой внеклеточный фрагмент TCR.

74. Белок по п. 67, дополнительно содержащий дополнительный антигенсвязывающий фрагмент TCR, который связывает тот же антиген, что и антигенсвязывающий фрагмент TCR.

75. Белок по п. 74, в котором антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR и дополнительный антигенсвязывающий фрагмент TCR представляют собой внеклеточные фрагменты TCR.

76. Белок по п. 74, в котором антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR и дополнительный антигенсвязывающий фрагмент TCR представляют собой фрагменты scTCR.

77. Белок по любому из пп. 70-72 и 75-76, в котором scFv содержит переменный домен тяжелой цепи, связанный с переменным доменом легкой цепи через гибкий линкер.

78. Белок по п. 77, в котором гибкий линкер содержит  $(G_4S)_4$ .

79. Белок по любому из пп. 70-72 и 75-78, в котором scFv содержит переменный домен тяжелой цепи, расположенный на N-конце или C-конце переменного домена легкой цепи.

80. Белок по любому из пп. 67-79, в котором антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, и причем

вариабельный домен тяжелой цепи образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи.

81. Белок по п. 80, в котором дисульфидный мостик образован между Cys в положении 44 в вариабельном домене тяжелой цепи и Cys в положении 100 в вариабельном домене легкой цепи, причем положения определены по нумерации Кабат.

82. Белок по любому из пп. 67-81, в котором антигенсвязывающий сайт связывается с NKG2D у человека.

83. Белок по любому из пп. 67-82, в котором антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из: SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:322, SEQ ID NO:325, SEQ ID NO:328, SEQ ID NO:331, SEQ ID NO:334 и SEQ ID NO:337.

84. Белок по п. 83, в котором антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 94, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 98.

85. Белок по п. 83, в котором антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 322, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 98.

86. Белок по п. 83, в котором антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 325, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 98.

87. Белок по п. 83, в котором антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 328, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 98.

88. Белок по п. 83, в котором антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 331, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 98.

89. Белок по п. 83, в котором антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере



на 90% идентичную SEQ ID NO: 86, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 90.

98. Белок по п. 83, в котором антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 102, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 106.

99. Белок по любому из пп. 67-82, в котором антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 110, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 111.

100. Белок по любому из пп. 67-82, в котором антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 112, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 113.

101. Белок по любому из пп. 67-100, в котором антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид из ассоциированного с опухолью антигена, презентованного главным комплексом гистосовместимости (MHC).

102. Белок по п. 101, в котором антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид ELAVL4, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 425, презентованный HLA-A\*02:01:48, и причем антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 351 и переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 352.

103. Белок по п. 101, в котором антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид инсулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426, презентованный HLA-A\*02:01:48, и причем антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 357 и переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 358.

104. Белок по п. 101, в котором антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид TERT, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 340, презентованный HLA-A\*02:01:48, и причем антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 363 и переменный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 364.

105. Белок по п. 101, в котором антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид ERBB2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341, презентованный HLA-A\*02, и причем антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 430 и



вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 402.

114. Белок по п. 101, в котором антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид PRAME, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 347, презентованный HLA-A2, и причем антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 407 и вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 408.

115. Белок по п. 101, в котором антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид NY-ESO-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 348, презентованный HLA-A2, и причем антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 413 и вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 414.

116. Белок по п. 101, в котором антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид NY-ESO-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 348, презентованный HLA-A2, и причем антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 418 и вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 414.

117. Белок по п. 101, в котором антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид NY-ESO-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 348, презентованный HLA-A2, и причем антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 421 и вариабельный домен бета-цепи по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 422.

118. Белок по п. 101, в котором антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид SSX2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345, презентованный HLA-A2.

119. Белок по любому из пп. 67-118, в котором константная область антитела или ее часть, достаточная для связывания CD16, содержит шарнир и домен CH2 антитела IgG1 человека.

120. Белок по п. 119, в котором константная область антитела или ее часть, достаточная для связывания CD16, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.

121. Белок по п. 120, в котором константная область антитела или ее часть, достаточная для связывания CD16, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную Fc-домену IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439.

122. Состав, содержащий белок по любому из пп. 33-121 и фармацевтически приемлемый носитель.

123. Клетка, содержащая одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих белок по любому из пп. 33-121.

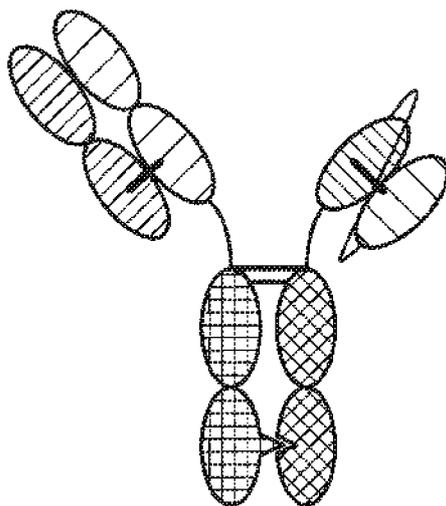
124. Способ усиления гибели опухолевых клеток, включающий воздействие белка на опухолевые и натуральные клетки-киллеры по любому из пп. 33-121.

125. Способ лечения рака, включающий введение пациенту белка по любому из пп. 33-121 или состава по п. 122.

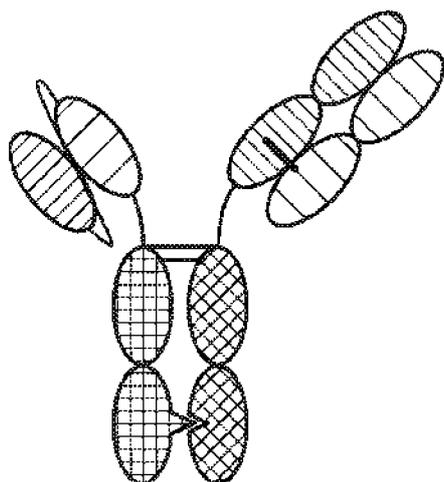
126. Способ по п. 125, в котором рак выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза, В-клеточной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака молочной груди, колоректального рака, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, рака пищевода, саркомы Юинга, фолликулярной лимфомы, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, опухолей стромы желудочно-кишечного тракта, глиобластомы, рака головы и шеи, меланомы, мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, почечно-клеточной карциномы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легких, нейроэндокринных опухолей, рака яичников и рака поджелудочной железы, рака простаты, сарком, мелкоклеточного рака легких, Т-клеточной лимфомы, рака яичка, карциномы вилочковой железы, рака щитовидной железы, уротелиального рака, злокачественных заболеваний, инфильтрованных миелоидными клетками-супрессорами, злокачественных заболеваний с накоплением внеклеточного матрикса, злокачественных заболеваний с высокими уровнями реактивной стромы и злокачественных заболеваний с неоангиогенезом.

По доверенности

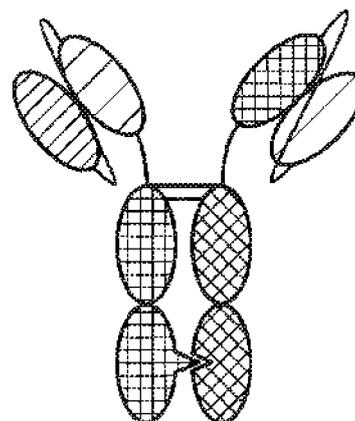
1/20

Нацеленный на NK-клетки  
FABНацеленный на опухоль  
scFv

ФИГ. 1А (F3'-формат)

Нацеленный на  
NK-клетки scFvНацеленный на  
опухоль Fab

ФИГ. 1В (F3-формат)

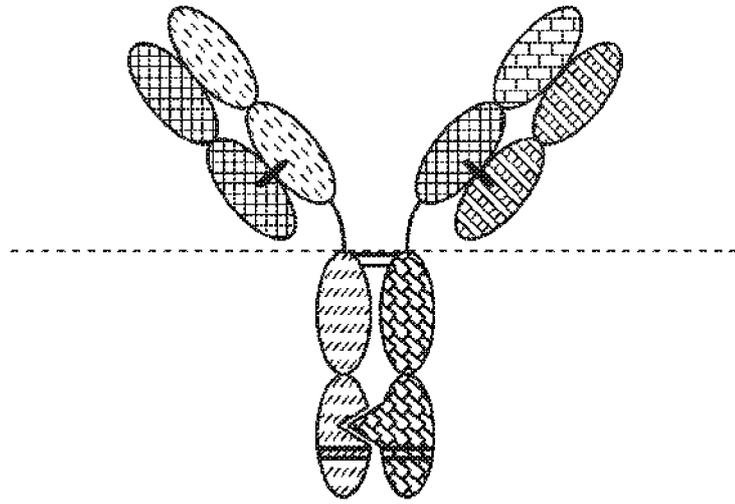
Нацеленный  
на NK-клетки  
scFvНацеленный на опухоль  
scFv

ФИГ. 1С

Duobody (DB) TriNKET

Плечо ВСМА

Плечо NKG2D



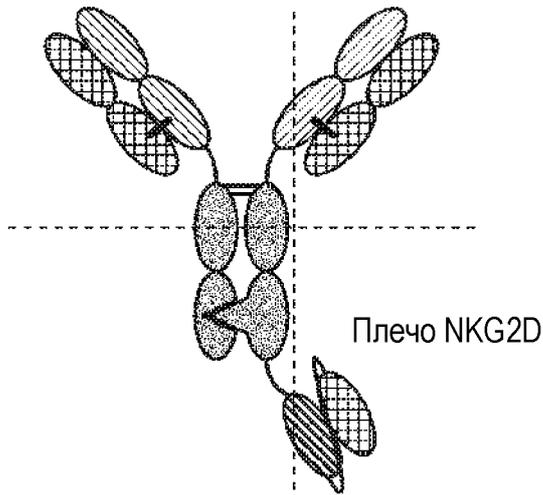
ФИГ. 2А

F4 TriNKET

Плечи ВСМА

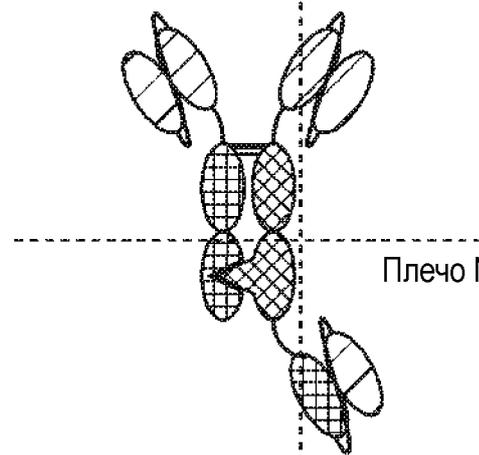
F4 TriNKET

Плечи ВСМА



Плечо NKG2D

ФИГ. 2В

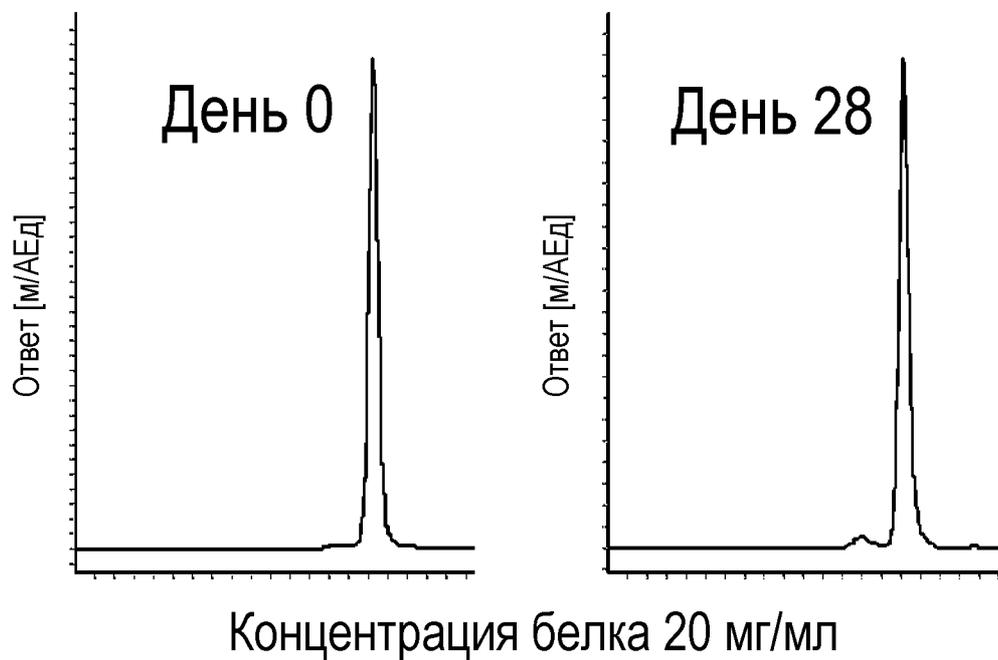


Плечо NKG2D

ФИГ. 2С

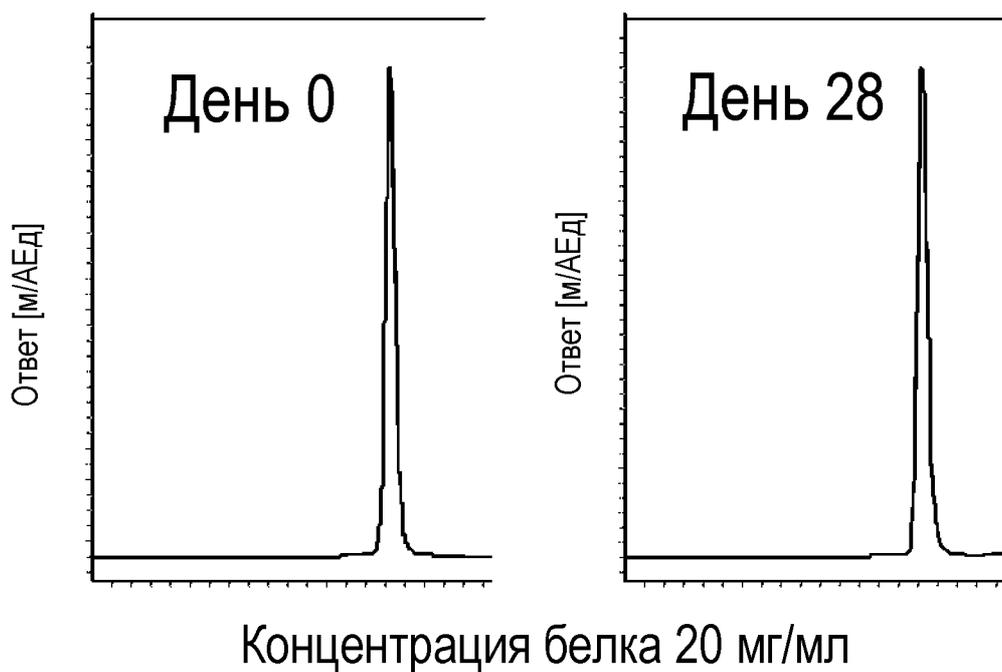
3/20

### ФСБ

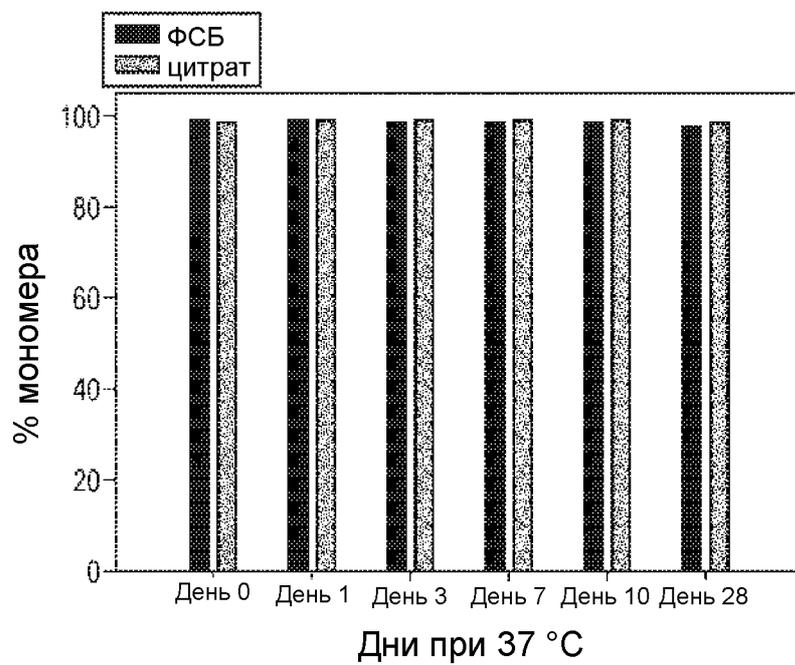


ФИГ. 3А

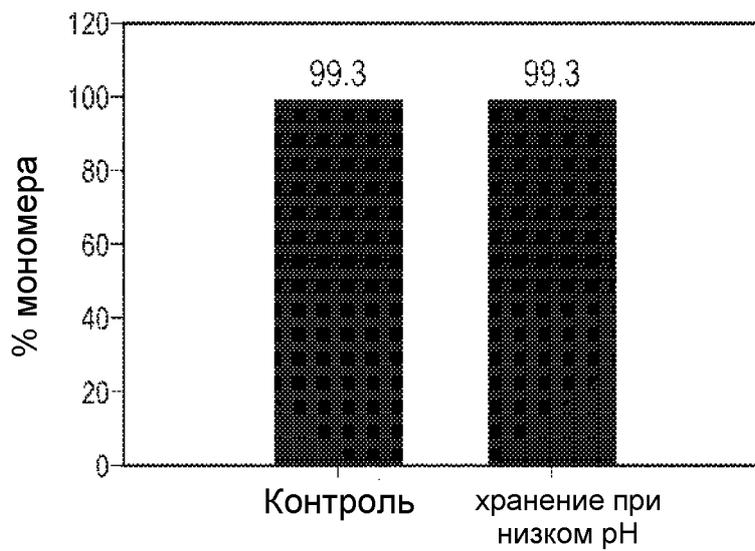
### Цитрат рН 5,5



ФИГ. 3В

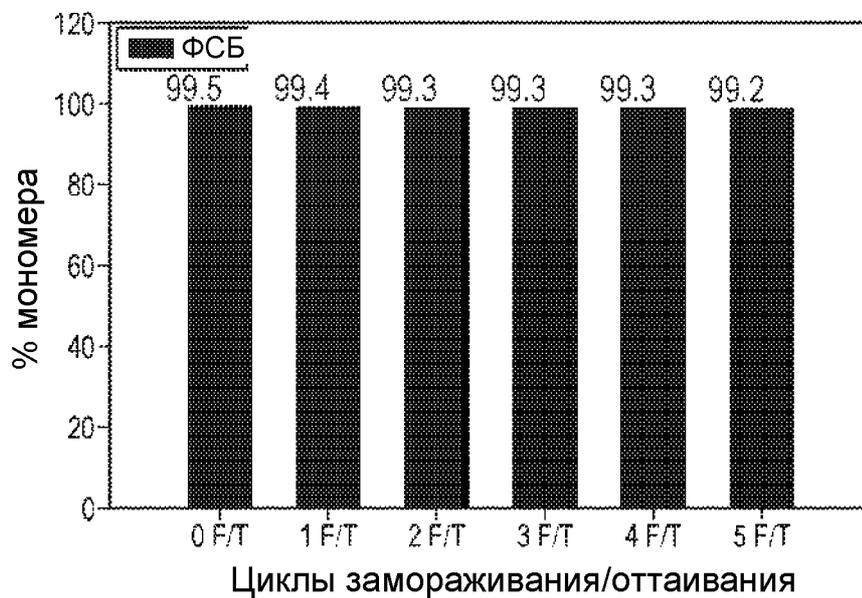


ФИГ. 3С



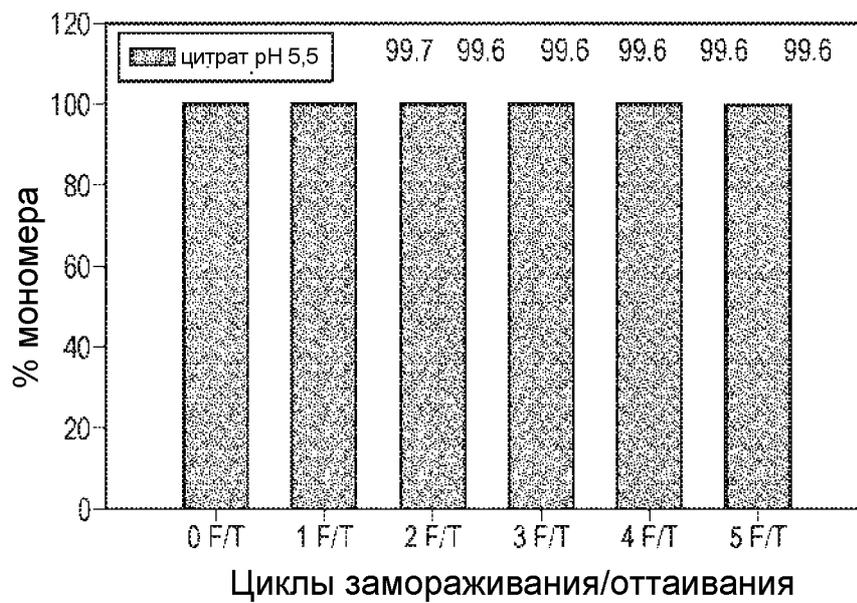
ФИГ. 4

## ФСБ

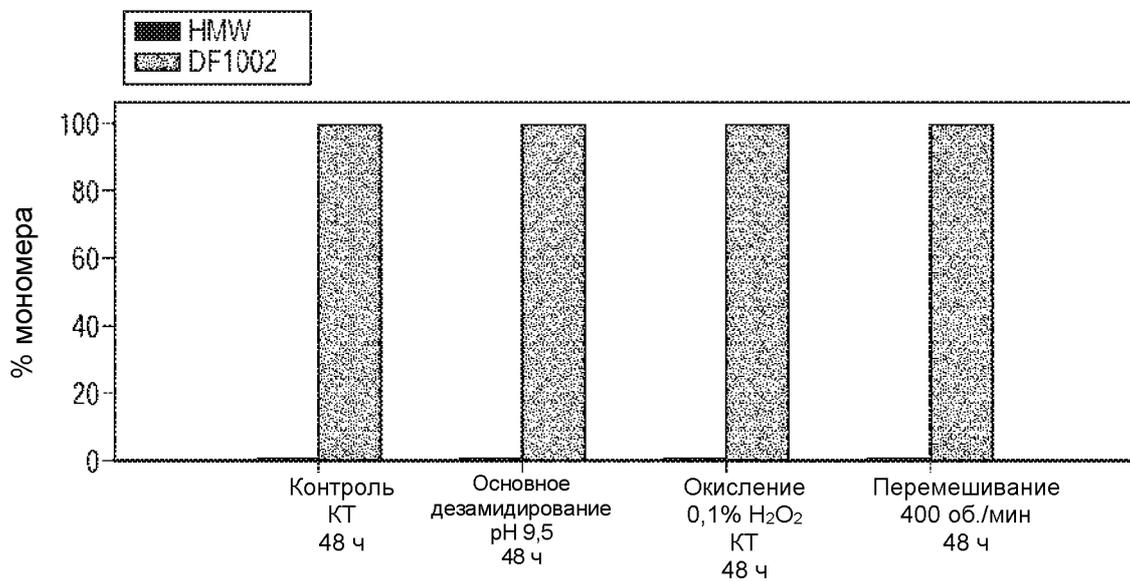


ФИГ. 5А

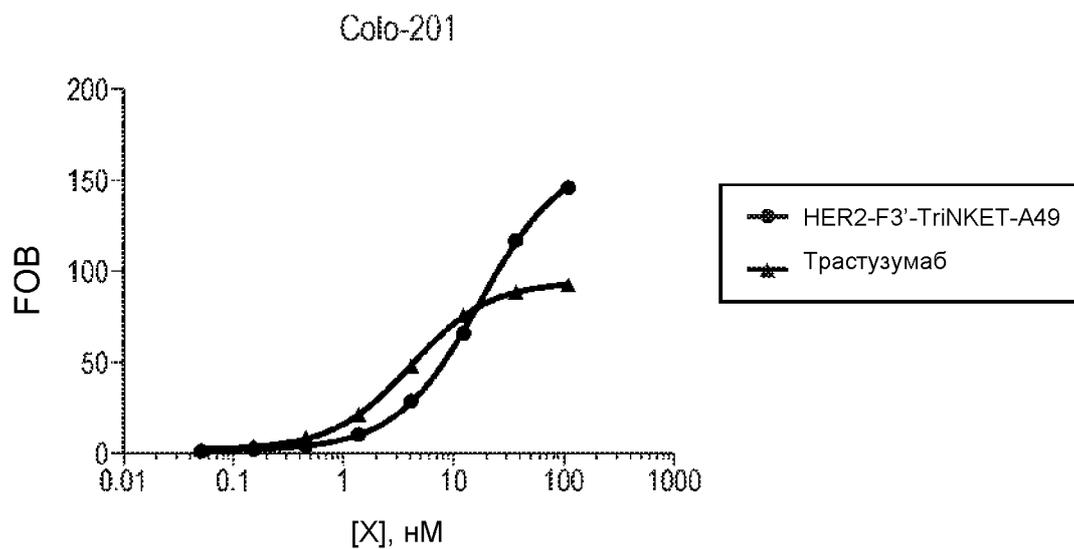
## Цитрат рН 5,5



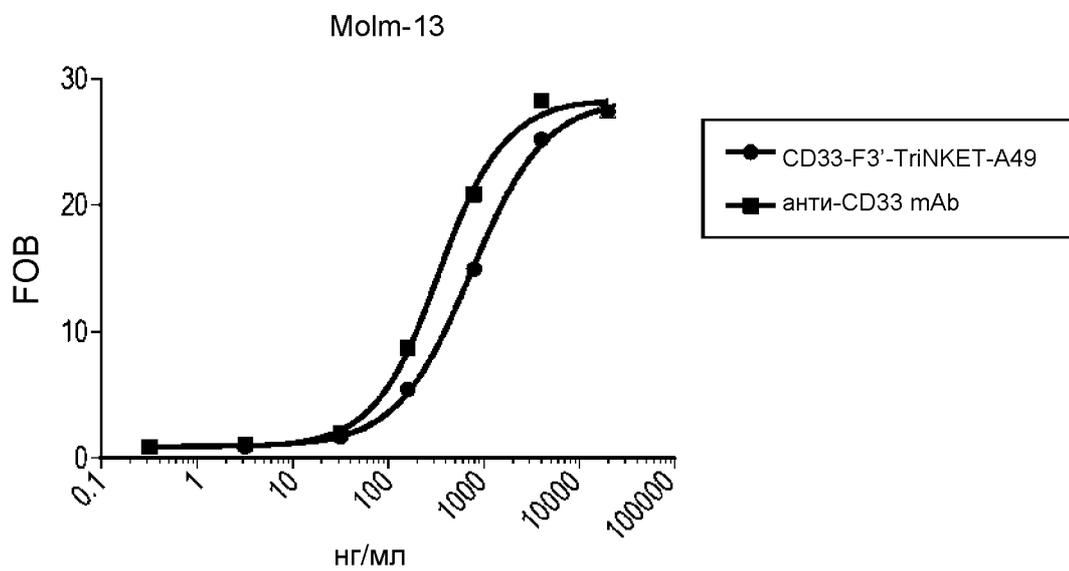
ФИГ. 5В



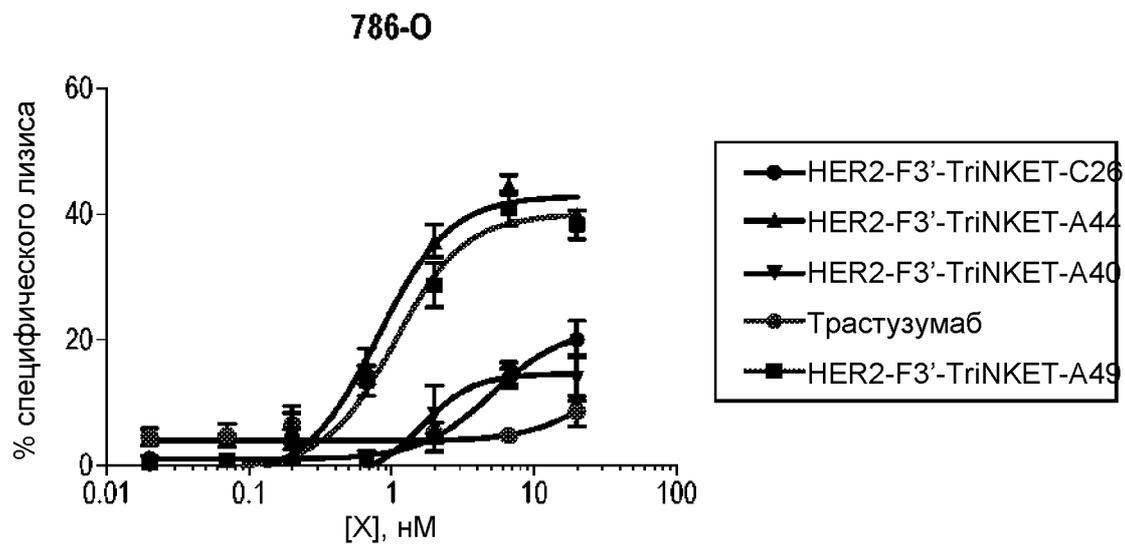
ФИГ. 6



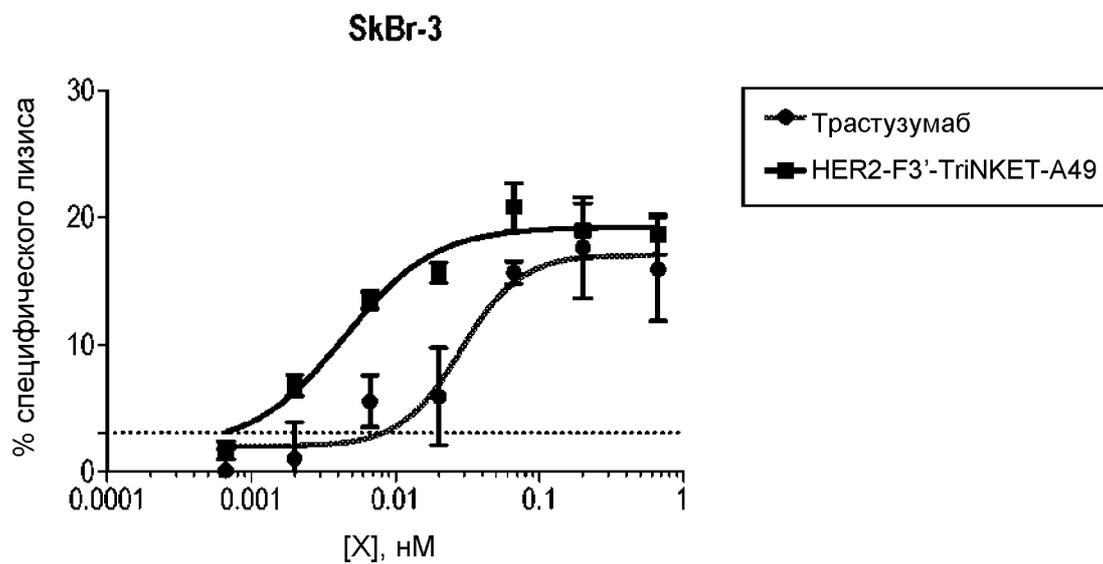
ФИГ. 7



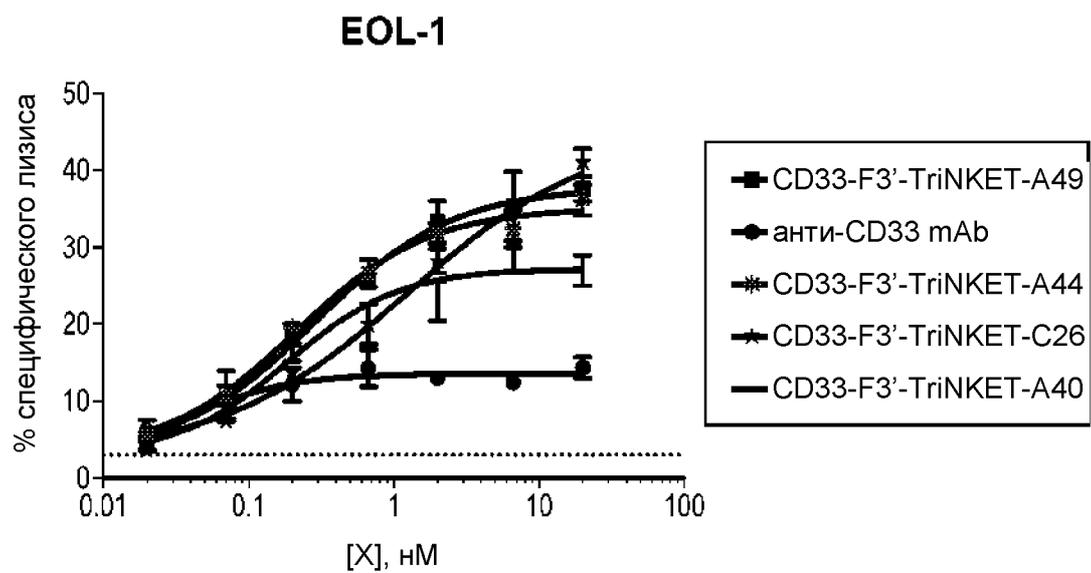
ФИГ. 8



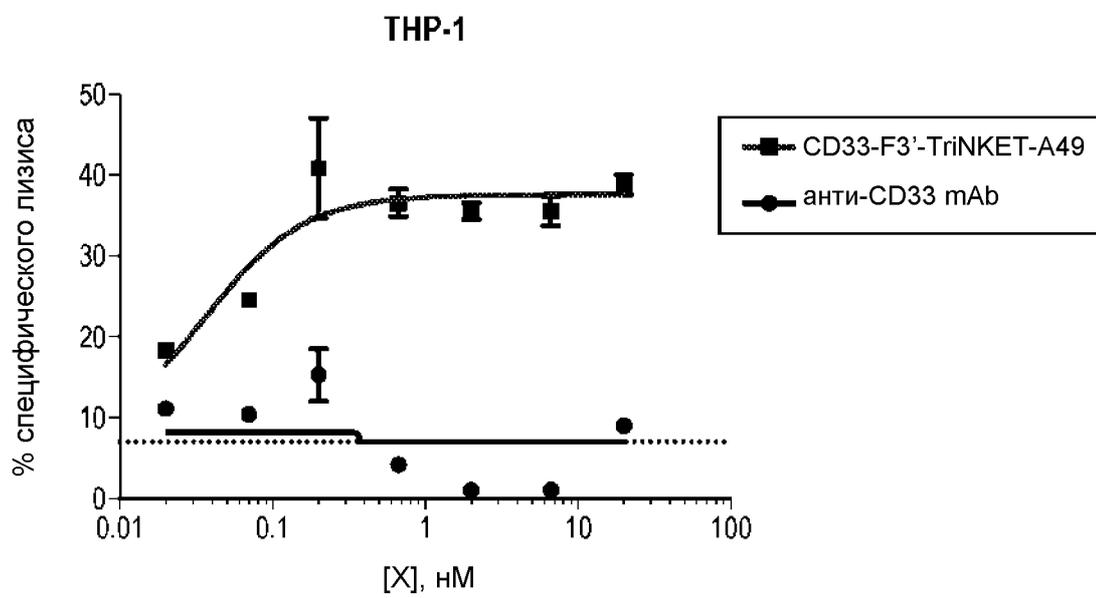
ФИГ. 9



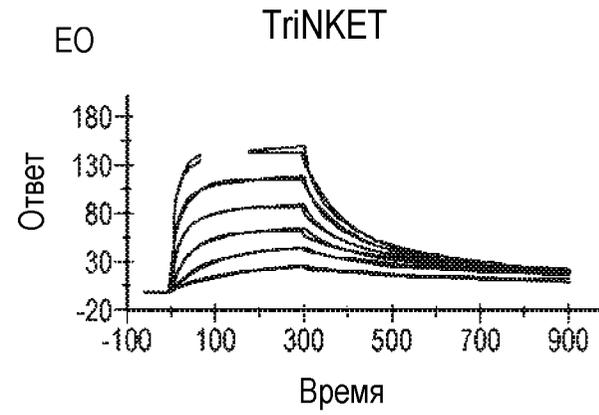
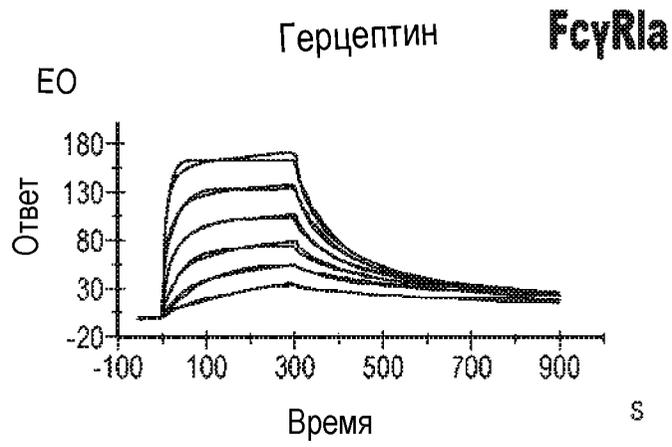
ФИГ. 10



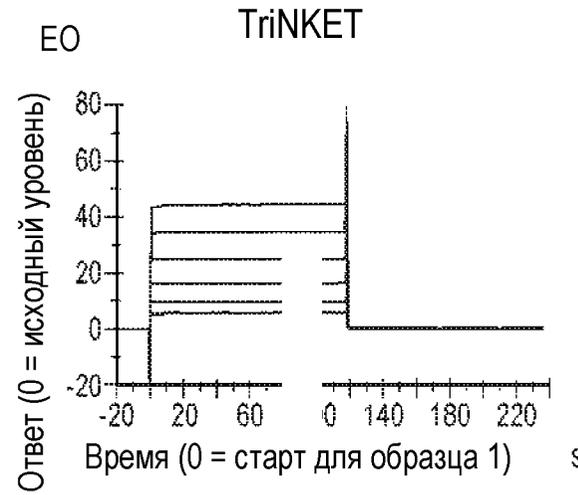
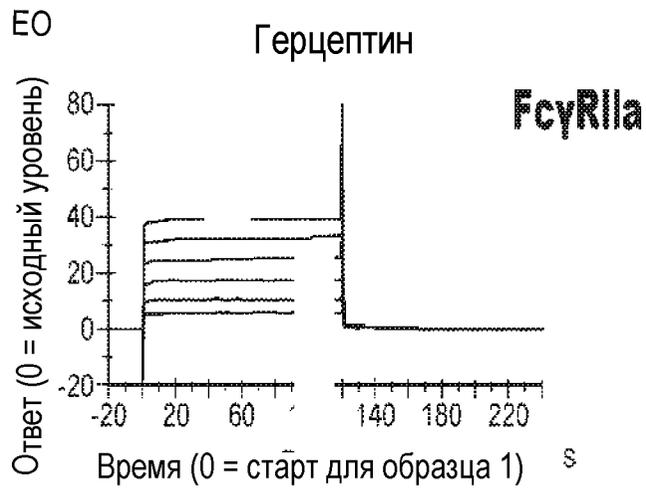
ФИГ. 11



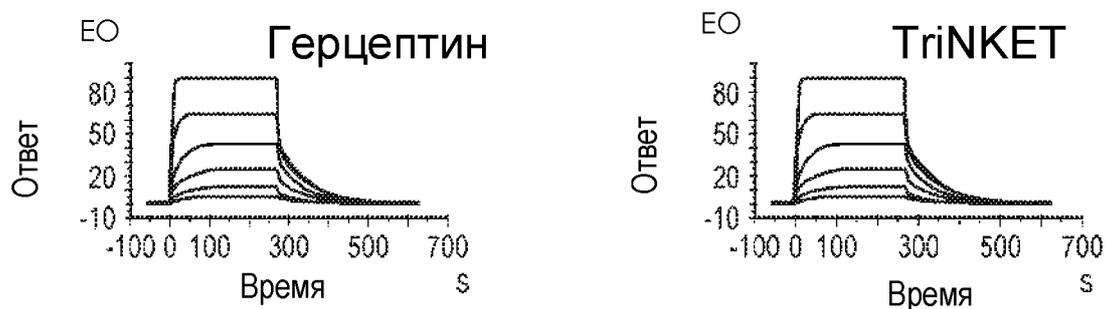
ФИГ. 12



ФИГ. 13А

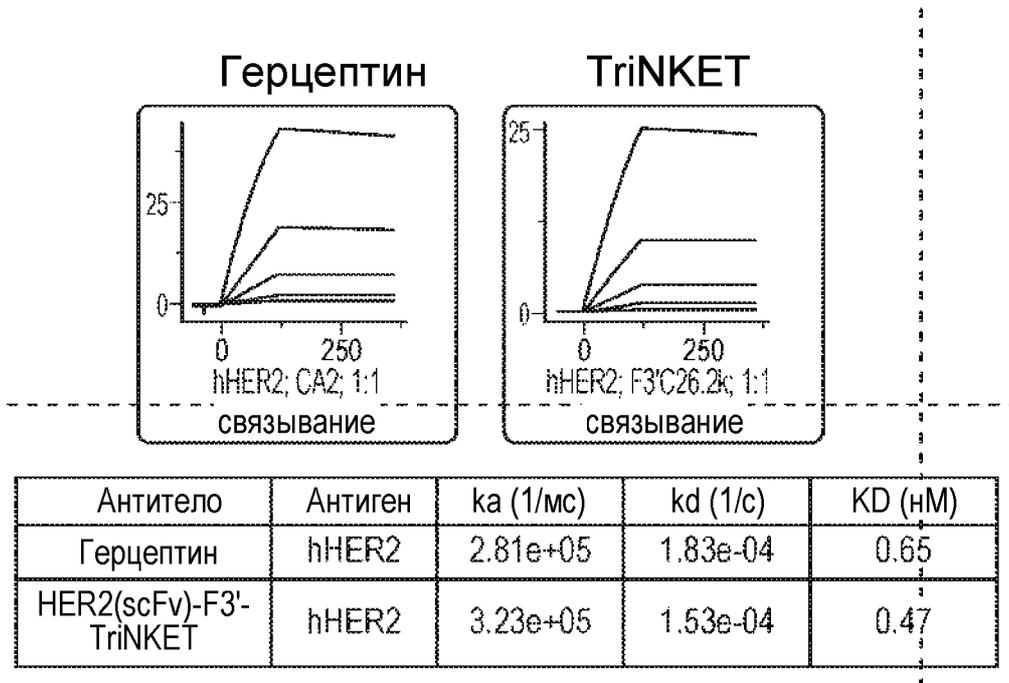


ФИГ. 13В

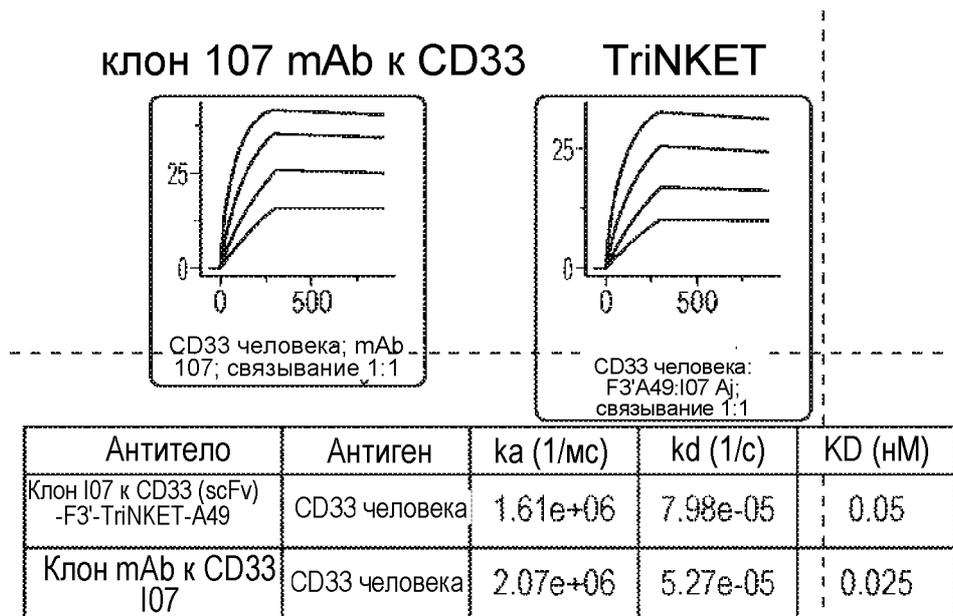


Связывание с рецептором FcγRIIIa 158V человека				
Антиген	$K_a$ , (1/Мс)	$K_d$ , (1/с)	$K_D$ , (М)	Rmax
Герцептин	1.69E+04	1.26E-02	7.46E-07	71.4
F3'-TriNKET-HER2	3.15E+04	2.20E-02	6.99E-007	72.9

ФИГ. 13С

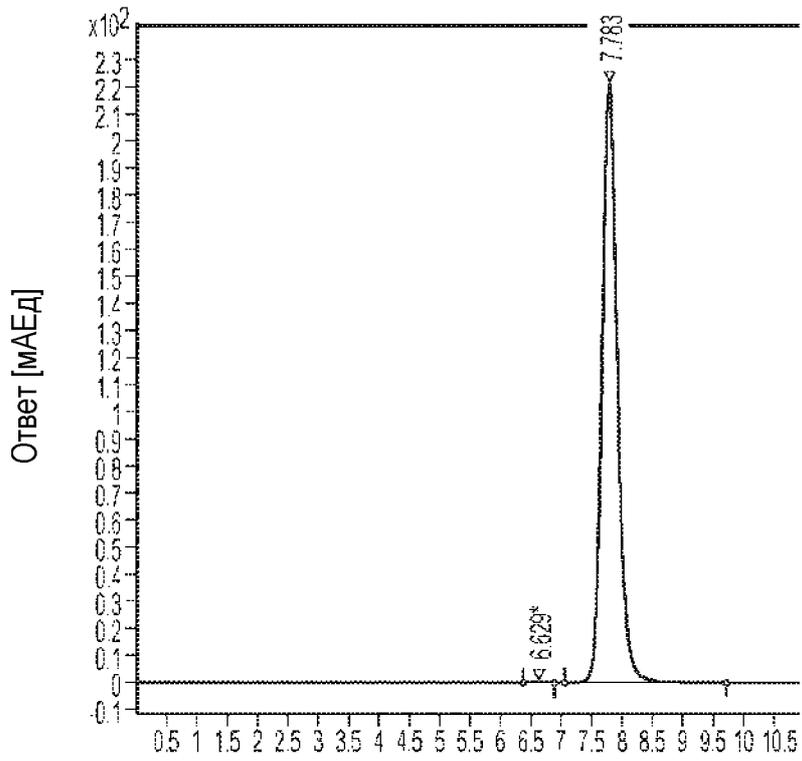


ФИГ. 14А

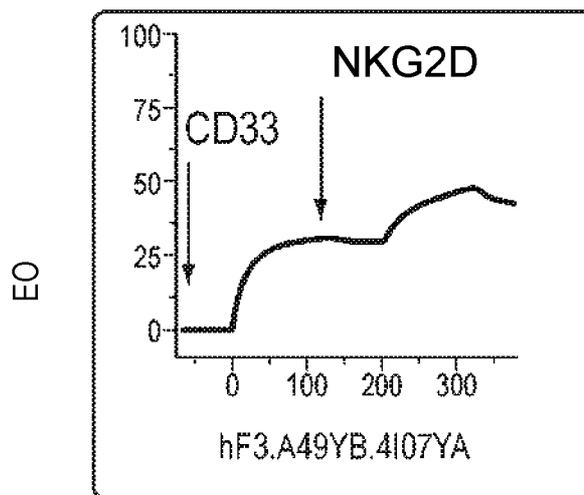


ФИГ. 14В

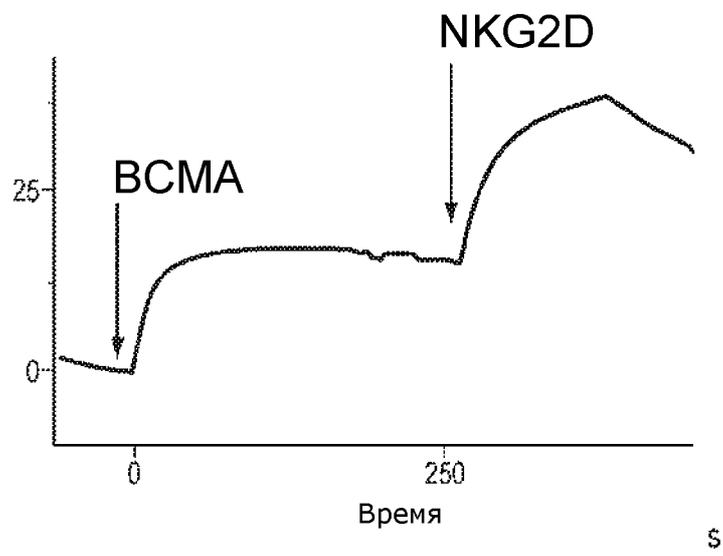
99% мономера после 2-й стадии очистки



ФИГ. 15

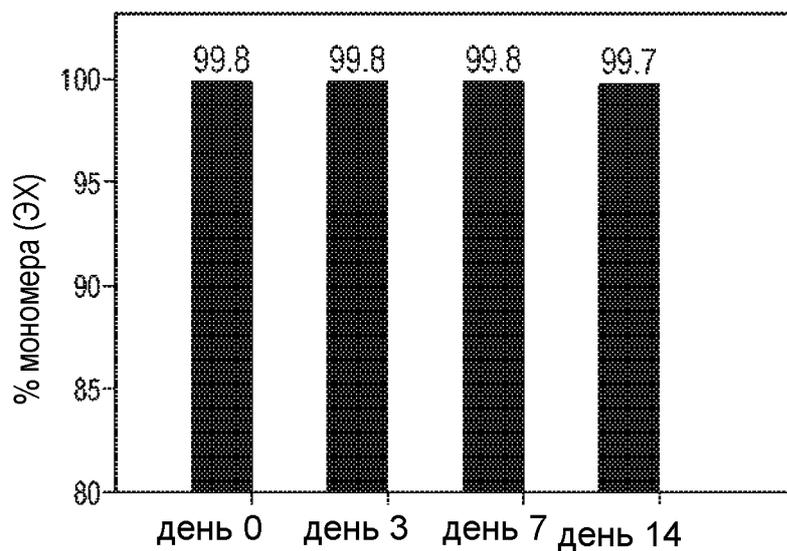


ФИГ. 16



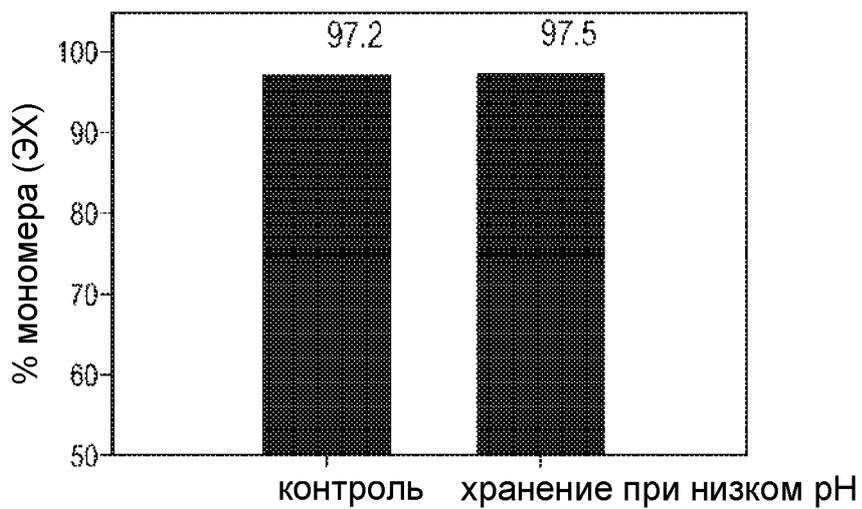
ФИГ. 17

## Ускоренная стабильность (37 °С)



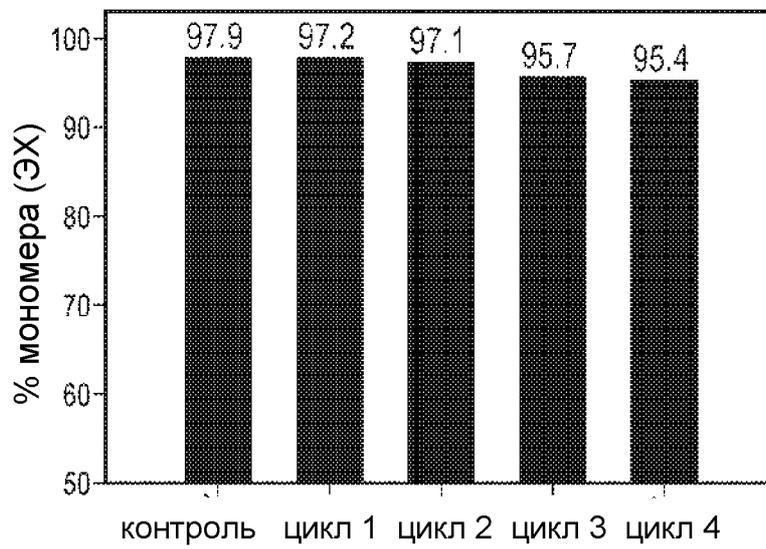
ФИГ. 18А

## Хранение при низком рН

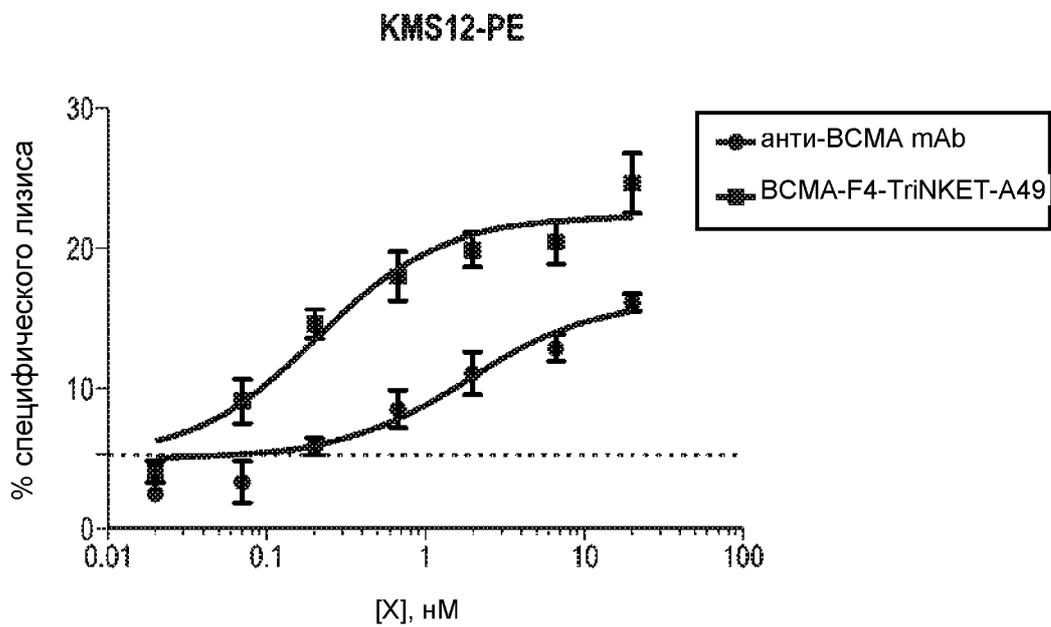


ФИГ. 18В

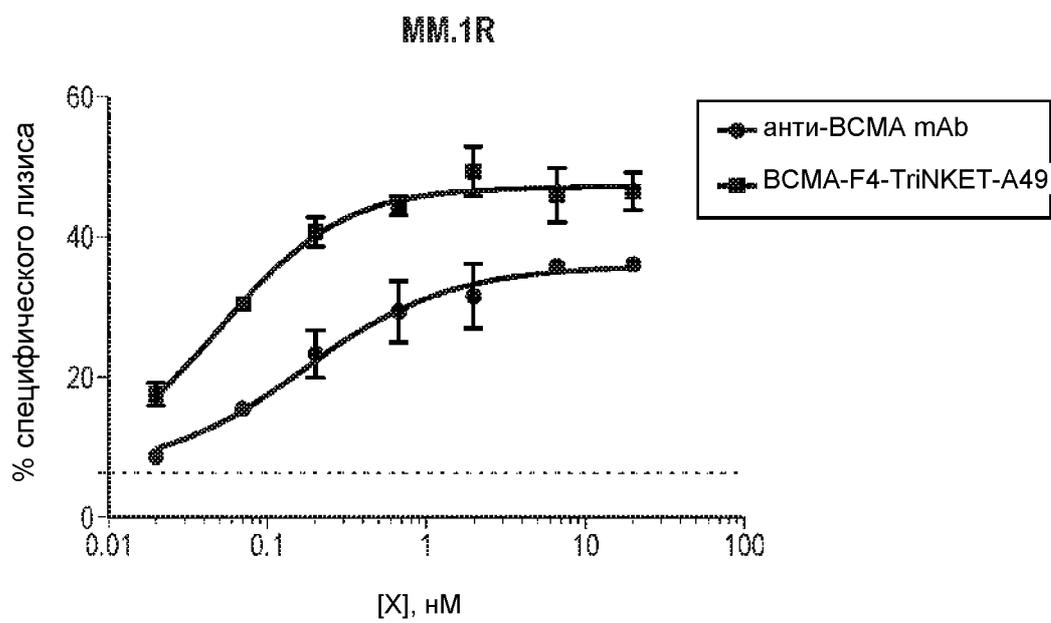
### Стабильность при замораживании/оттаивании



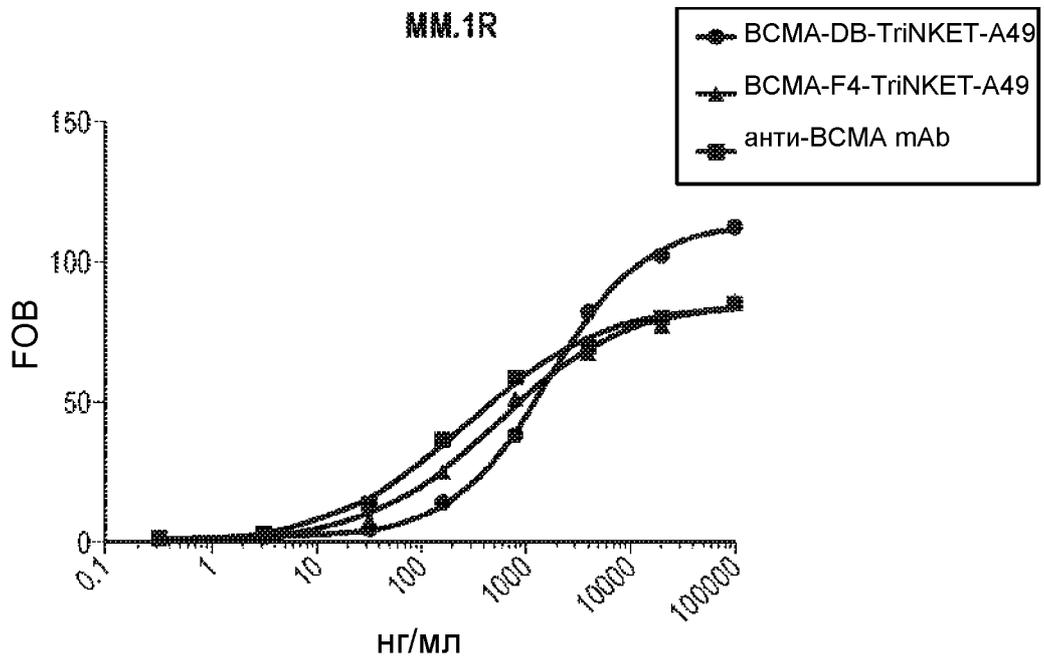
ФИГ. 18С



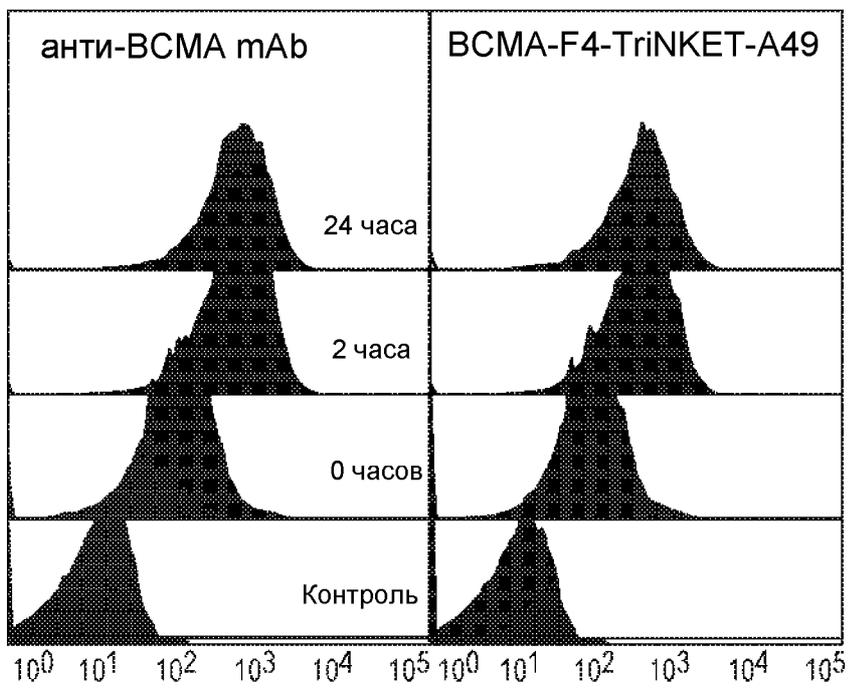
ФИГ. 19



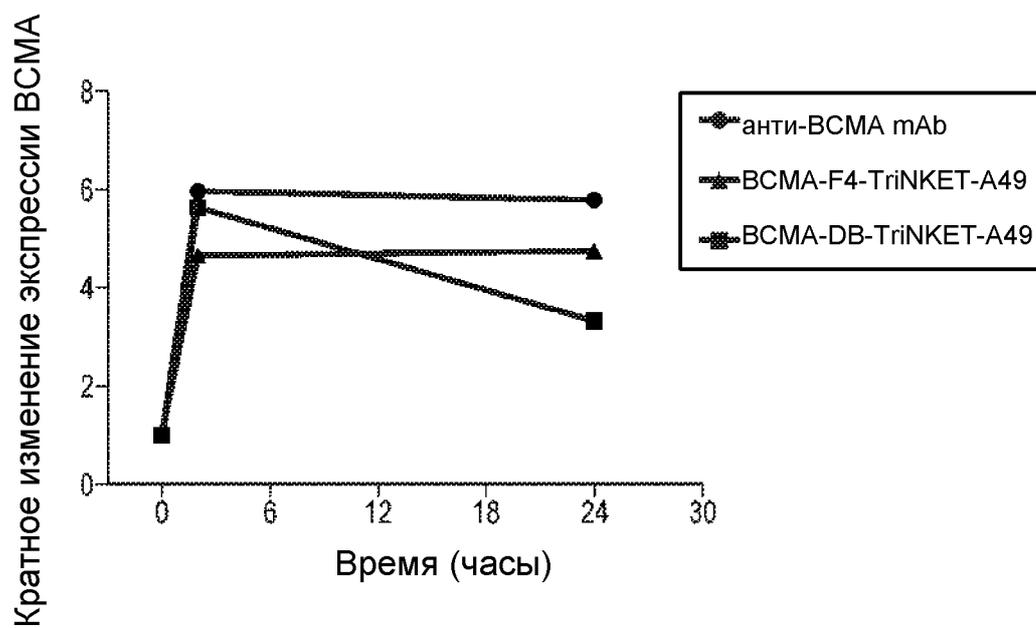
ФИГ. 20



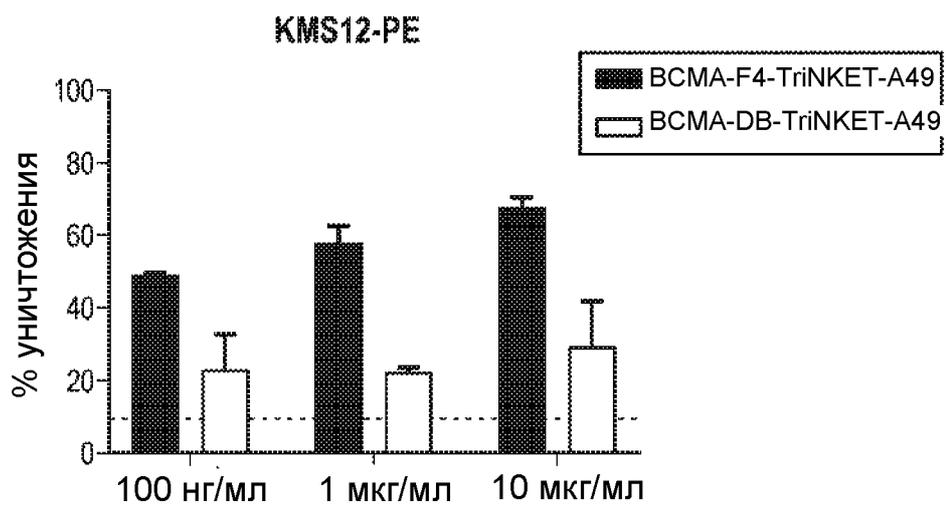
ФИГ. 21



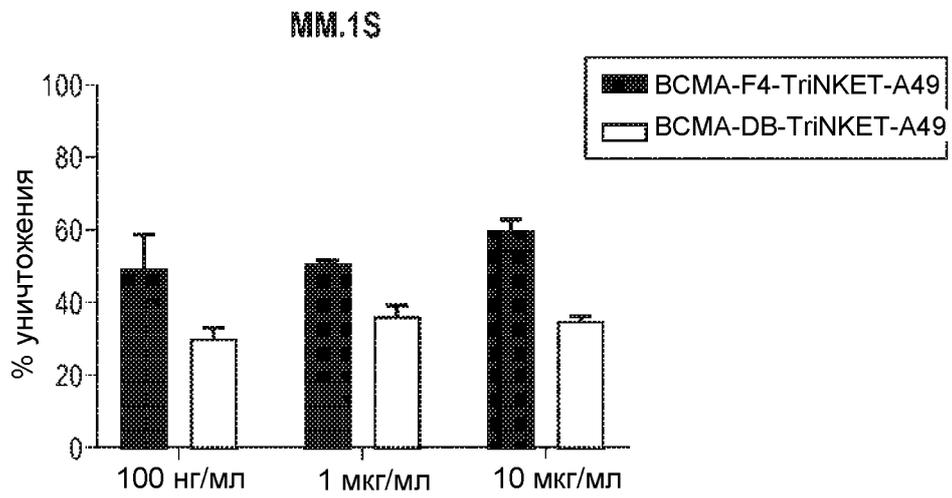
ФИГ. 22



ФИГ. 23



ФИГ. 24



ФИГ. 25