

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 040342

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.23

(21) Номер заявки
201992694

(22) Дата подачи заявки
2018.05.11

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ МЕЗОТЕЛИН БЕЛКИ

(31) 62/505,719; 62/657,417

(32) 2017.05.12; 2018.04.13

(33) US

(43) 2020.05.31

(86) PCT/US2018/032418

(87) WO 2018/209298 2018.11.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХАРПУН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

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

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

(56) US-A1-20150274836
US-A1-20100122358

(57) В изобретении раскрыты связывающие MSLN белки с улучшенной аффинностью связывания и улучшенной способностью опосредовать зависимое от Т-клеток уничтожение экспрессирующих мезотелин раковых клеток. Дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие раскрытые в настоящем документе связывающие белки и способы применения таких композиций.

B1

040342

040342

B1

Ссылка

По заявке на настоящий патент испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/505719, поданной 12 мая 2017 г., и 62/657417, поданной 13 апреля 2018 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Изобретение содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 11 мая 2018 г., характеризуется именем 47517-719_601_SL.txt и размером 145039 байт.

Включение по ссылке

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

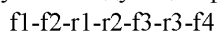
Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены связывающие мезотелин (MSLN) белки, которые можно использовать для диагностики и лечения показаний, связанных с экспрессией MSLN. Мезотелин (MSLN) представляет собой связанный с GPI мембраносвязанный опухолевый антиген. MSLN сверхэкспрессируется при раке яичников, поджелудочной железы, легких и тройном негативном раке молочной железы и мезотелиоме. Нормальная тканевая экспрессия MSLN ограничивается одноклеточными мезотелиальными слоями, выстилающими плевральную, перикардальную и брюшную полости. Сверхэкспрессия MSLN связана с плохим прогнозом при аденокарциноме легких и тройном негативном раке молочной железы. MSLN использовали в качестве ракового антигена для многочисленных способов воздействия, включая в себя иммунотоксины, вакцины, конъюгаты антител с лекарственными средствами и клетки CAR-T. Ранние признаки клинической эффективности подтвердили, что MSLN является мишенью, но для лечения экспрессирующих MSLN форм рака необходимы способы лечения с улучшенной эффективностью.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен однодоменный связывающий мезотелин белок, причем указанный белок содержит одну или более консервативных областей, содержащих последовательность, идентичную SEQ ID NO: 41, 42, 43 или 44 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 41, 42, 43 или 44. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 41 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 41. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 42 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 42. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 43 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 43. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 44 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 44. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит (i) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 41; (ii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 42; (iii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 43; и (iv) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 44.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен однодоменный связывающий мезотелин белок, причем указанный белок характеризуется следующей формулой:



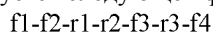
где g1 идентичен SEQ ID NO: 51 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее; g2 идентичен SEQ ID NO: 52 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее и g3 идентичен SEQ ID NO: 53 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее и где f1, f2, f3 и f4 представляют собой каркасные остатки. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-29, 30-40, 58 и 60-62. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит одну или более модификаций, которые приводят к гуманизации связывающего белка. Согласно некоторым вариантам осуществления модификация включает в себя замены, добавления или делеции аминокислотных остатков. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит от 111 до 124 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит домен VHN, полученный из отличного от человеческого источника. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит домен VHN ламы. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный эпитоп расположен в области I, содержащей аминокислотные остатки 296-390 из SEQ ID NO: 57, области II, содержащей аминокислотный остаток 391-486 из SEQ ID NO: 57, или области III, содержащей аминокислотные остатки 487-588 из SEQ ID NO: 57.

кислотные остатки 487-598 из SEQ ID NO: 57.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен однодоменный связывающий мезотелин белок, причем указанный белок содержит одну или более консервативных областей, содержащих последовательность, идентичную SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 или 50 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 45 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 46 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 47 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 48 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 49 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит консервативную область, содержащую последовательность, идентичную SEQ ID NO: 50 или содержащую одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит (i) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 45; (ii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 46; (iii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 47, (iv) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 48, (v) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 49, и (vi) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 50.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен однодоменный связывающий мезотелин белок, причем указанный белок характеризуется следующей формулой:



где r1 идентичен SEQ ID NO: 54 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее; r2 идентичен SEQ ID NO: 55 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее и r3 идентичен SEQ ID NO: 56 или содержит одну или более замен аминокислотных остатков относительно нее и где f1, f2, f3 и f4 представляют собой каркасные остатки. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30-40, 58 и 60-62. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит от 111 до 119 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит домен VHN, полученный из отличного от человеческого источника. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит домен VHN ламы. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок связывается с белком мезотелина человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок связывается с эпитопом мезотелина, причем указанный эпитоп расположен в области I, содержащей аминокислотные остатки 296-390 из SEQ ID NO: 57, области II, содержащей аминокислотный остаток 391-486 из SEQ ID NO: 57, или области III, содержащей аминокислотные остатки 487-598 из SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный связывающий белок представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный связывающий белок представляет собой однодоменное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный связывающий белок представляет собой гуманизированное однодоменное антитело.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен однодоменный связывающий мезотелин белок, причем указанный белок содержит одну или более CDR, выбранных из SEQ ID NO: 51-56 и 63-179. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит CDR1, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 51, 54 и 63-101. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит CDR2, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 52, 55 и 102-140. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит CDR3, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 53, 56 и 141-179. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит каркасную область 1 (f1), содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 180-218. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит каркасную область 2 (f2), содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 219-257. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит каркасную область 3 (f3), содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 258-296. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит каркасную область 4 (f4), содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 297-335. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный белок содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-40 и 58.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен полинуклеотид, кодирующий однодоменный связывающий мезотелин белок, в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления. Согласно дополнительному варианту осуществления предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид по вышеуказанному варианту осуществления. Согласно дополнительному варианту осуществления предусмотрена клетка-хозяин, трансформированная вектором, в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая (i) однодоменный связывающий мезотелин белок в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления, полинуклеотид в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления, вектор в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления или клетку-хозяина в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

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

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

Краткое описание графических материалов

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

На фиг. 1 показана эффективность иллюстративных нацеленных на MSLN триспецифических молекул (2A2 и 2A4), содержащих связывающий анти-MSLN белок согласно настоящему раскрытию, в уничтожении клеток OVCAR8, которые экспрессируют белок-мишень MSLN.

На фиг. 2 показано, что триспецифический связывающий антиген-мишень MSLN белок, содержащий иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), направляет Т-клетки от пяти доноров (донор 02; донор 86; донор 41; донор 81 и донор 35) на уничтожение клеток Саov3. На фигуре также показано, что контрольный триспецифический белок (GFP TriTAC) не направлял Т-клетки от пяти доноров (донор 02; донор 86; донор 41; донор 81 и донор 35) на уничтожение клеток Саov3.

На фиг. 3 показано, что триспецифический связывающий антиген-мишень MSLN белок, содержащий иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), направляет Т-клетки от пяти доноров (донор 02; донор 86; донор 41; донор 81 и донор 35) на уничтожение клеток OVCAR3. На фигуре также показано, что контрольный триспецифический белок (GFP TriTAC) не направлял Т-клетки от пяти доноров (донор 02; донор 86; донор 41; донор 81 и донор 35) на уничтожение клеток OVCAR3.

На фиг. 4 показано, что триспецифический связывающий антиген-мишень MSLN белок, содержащий иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), был способен направлять Т-клетки от здорового донора на уничтожение клеток, которые экспрессируют MSLN (клетки OVCAR3; клетки Саov4; клетки OVCAR3 и клетки OVCAR8). На фигуре также показано, что триспецифический связывающий антиген-мишень MSLN белок, содержащий иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), не был способен направлять Т-клетки от здорового донора на уничтожение клеток, которые не экспрессируют MSLN (клетки MDAPCa2b и клетки NCI-H510A).

На фиг. 5 показано, что триспецифический связывающий антиген-мишень MSLN белок, содержащий иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), был способен направлять Т-клетки от яванских макаков на уничтожение раковых клеток яичника человека (клетки OVCAR3; клетки Caov3). На фигуре также показано, что контрольный триспецифический белок (GFP TriTAC) не был способен направлять Т-клетки от яванских макаков на уничтожение клеточных линий рака яичника человека (клетки OVCAR3; клетки Caov3).

На фиг. 6 показано, что триспецифический связывающий антиген-мишень MSLN белок, содержащий иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), был способен направлять уничтожение экспрессирующих MSLN клеток мезотелиомы NCI-H2052 с помощью Т-клеток в присутствии сывороточного альбумина человека (HSA) или в его отсутствие.

На фиг. 7 показано, что триспецифический связывающий антиген-мишень MSLN белок, содержащий иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), был способен активировать Т-клетки от четырех здоровых доноров (донор 2; донор 86; донор 35; и донор 81), как продемонстрировано секрецией TNF- α из Т-клеток, в присутствии экспрессирующих MSLN клеток Caov4.

На фиг. 8 показано, что триспецифический связывающий антиген-мишень MSLN белок, содержащий иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), был способен активировать Т-клетки от четырех здоровых доноров (донор 2; донор 86; донор 35 и донор 81), что продемонстрировано активацией экспрессии CD69 на Т-клетках в присутствии экспрессирующих MSLN клеток OVCAR8.

На фиг. 9 показано связывание триспецифического связывающего антиген-мишень MSLN белка, содержащего иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), с линиями экспрессирующих MSLN клеток или линиями клеток, не экспрессирующих MSLN. На фиг. 9A показано связывание с экспрессирующими MSLN клетками (клетки Caov3 - верхняя левая панель; клетки Caov4 - верхняя правая панель; клетки OVCAR3 - нижняя левая панель; клетки OVCAR8 - нижняя правая панель), связанные с триспецифическим связывающим антиген-мишень MSLN белком, содержащим иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T); на фиг. 9A дополнительно показано отсутствие связывания контрольного триспецифического белка (GFP TriTAC) с теми же клеточными линиями. На фиг. 9B показано отсутствие связывания как триспецифического связывающего антиген-мишень MSLN белка, содержащего иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), так и GFP TriTAC с линиями не экспрессирующих MSLN клеток (клетки MDCA2b на левой панели; клетки NCI-H510A на правой панели).

На фиг. 10 показано связывание триспецифического связывающего антиген-мишень MSLN белка, содержащего иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), с Т-клетками от четырех здоровых доноров (донор 2 - верхняя левая панель; донор 35 - верхняя правая панель; донор 41 - нижняя левая панель; донор 81 - нижняя правая панель).

На фиг. 11 показано, что триспецифический связывающий антиген-мишень MSLN белок, содержащий иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), способен ингибировать рост опухоли у мышей NCG, которым имплантированы экспрессирующие MSLN клетки NCI-H292.

На фиг. 12 показан фармакокинетический профиль триспецифического связывающего антиген-мишень MSLN белка, содержащего иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T). На графике показано содержание в сыворотке триспецифического связывающего антиген-мишень MSLN белка, содержащего иллюстративный связывающий MSLN домен по настоящему раскрытию (MH6T), в различные моменты времени после инъекции двум яванским макакам.

Подробное описание настоящего изобретения

Хотя предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были показаны и описаны в настоящем изобретении, для специалиста в настоящей области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в настоящей области техники очевидно, что будут происходить многочисленные вариации, изменения и замены без отступления от настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы описанным в настоящем документе вариантам осуществления настоящего изобретения могут быть использованы при практическом применении настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и что таким образом будут охватываться способы и структуры в пределах объема этой формулы изобретения и их эквивалентов.

Конкретные определения

Использованная в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных случаев и не предназначена для ограничения. Используемые в настоящем документе формы единственного числа предназначены также для включения форм множественного числа, если контекст явно не указывает на иное. Кроме того, в той мере, в которой термины "включая в себя", "включает в себя", "имеющий", "имеет", "с" или их варианты используются в подробном описании и/или формуле изобретения, такие термины предназначены для того, чтобы быть охватывающими способом, аналогичным термину "содержащий".

Термин "приблизительно" или "примерно" означает в пределах допустимого диапазона ошибок для конкретного значения, определенного специалистом в настоящей области техники, который будет частично зависеть от того, как значение измерено или определено, например, ограничения системы измерения. Например, "приблизительно" может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения в соответствии с практикой в данном значении. Если конкретные значения описаны в настоящей заявке и формуле изобретения, если не указано иное, следует предполагать, что термин "приблизительно" означает приемлемый диапазон ошибок для конкретного значения.

Термины "индивидуум", "пациент" или "субъект" используются взаимозаменяемо. Ни один из терминов не требует и не ограничен ситуацией, характеризуемой наблюдением (например, постоянным или прерывистым) работника здравоохранения (например, врача, дипломированной медсестры, практикующей медсестры, помощника врача, санитаря или работника хосписа).

Термин остаток (или области) "каркаса" или "FR" относится к остаткам переменного домена, отличным от остатков CDR или гиперпеременной области, как определено в настоящем документе. "Консенсусный каркас человека" представляет собой каркас, который представляет собой наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в селекции каркасных последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека.

Используемый в настоящем изобретении термин "переменная область" или "переменный домен" относится к тому факту, что определенные части переменных доменов сильно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности каждого конкретного антигена. Однако переменность неравномерно распределена по переменным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых определяющими комплементарность областями (CDR) или гиперпеременными областями как в переменных доменах легкой цепи, так и в переменной области тяжелой цепи. Более высоко консервативные части переменных доменов называются каркасом (FR). Каждый из переменных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре области FR, в значительной степени принимающих конфигурацию Р-листа, соединенных тремя CDR, которые образуют петли, соединяющие, а в некоторых случаях являющиеся частью структуры Р-листа. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью областей FR и вместе с CDR из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител (смотрите Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности. "Нумерация остатков переменного домена, как в Kabat" или "нумерация аминокислотных положений, как в Kabat" и их варианты относятся к системе нумерации, используемой для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи компиляции антител в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Используя эту систему нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или вставке в FR или CDR переменного домена. Например, переменный домен тяжелой цепи может включать в себя одну аминокислотную вставку (остаток 52a по Kabat) после остатка 52 в H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. по Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной по Kabat. Не предполагается, что CDR настоящего раскрытия обязательно соответствуют приему нумерации Kabat.

Используемый в настоящем документе термин "процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" по отношению к последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалисту в настоящей области техники, например, с использованием общедоступных компьютерных программных обеспечений, таких как программное обеспечение EMBOSS MATCHER, EMBOSS WATER, EMBOSS STRETCHER, EMBOSS NEEDLE, EMBOSS LALIGN, BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в настоящей области техники могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая в себя любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Используемый в настоящем изобретении термин "период полувыведения" используется в его обычном смысле, как описано в Goodman and Gillman's *The Pharmaceutical Basis of Therapeutics* 21-25 (Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman, and Alfred Gilman, eds., 6th ed. 1980). Вкратце, этот термин предназначен для охвата количественного измерения времени выведения лекарственных средств. Выведение

большинства лекарственных средств является экспоненциальным (т.е. соответствует кинетике первого порядка), поскольку концентрации лекарственных средств, как правило, не приближаются к тем, которые требуются для насыщения процесса выведения. Скорость экспоненциального процесса может быть выражена его константой скорости k , которая выражает дробное изменение за единицу времени, или его половинным временем $t_{1/2}$ - временем, требуемым для завершения процесса на 50%. Единицами этих двух констант являются время⁻¹ и время соответственно. Константа скорости первого порядка и полупериод реакции просто связаны ($k \times t_{1/2} = 0,693$) и могут соответственно меняться местами. Поскольку кинетика выведения первого порядка диктует, что постоянная доля лекарственного средства теряется в единицу времени, график зависимости концентрации лекарственного средства от времени является линейным во все времена после начальной фазы распределения (т.е. после того, как поглощение и распределение лекарственного средства завершены). Половина времени для выведения лекарственных средств может быть точно определена из такого графика.

Используемый в настоящем изобретении термин "аффинность связывания" относится к аффинности описанных в настоящем раскрытии белков по отношению к их мишеням связывания и выражается численно с использованием значений " K_d ". Если указано, что два или более белка характеризуются сравнимыми аффинностями связывания с их мишенями связывания, то значения K_d для связывания соответствующих белков с их мишенями связывания находятся в пределах ± 2 -кратного значения друг от друга. Если указано, что два или более белка характеризуются сравнимыми аффинностями связывания с одной мишенью связывания, то значения K_d для связывания соответствующих белков с указанной мишенью связывания находятся в пределах ± 2 -кратного значения друг от друга. Если показано, что белок связывает две или более мишеней с сопоставимой аффинностью связывания, то значения K_d для связывания указанного белка с двумя или более мишенями находятся в пределах ± 2 -кратного значения друг от друга. В целом, более высокое значение K_d соответствует более слабой связи. Согласно некоторым вариантам осуществления " K_d " измеряют с помощью анализа меченного радиоактивным изотопом антигена (RIA) или анализа поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). Согласно некоторым вариантам осуществления также определяют "скорость включения" или "скорость ассоциации" или " k_{on} " и "скорость диссоциации" или " k_{off} " с помощью способа поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Согласно дополнительным вариантам осуществления " K_d ", " k_{on} " и " k_{off} " измеряют с использованием систем OCTET® (Pall Life Sciences). В иллюстративном способе измерения аффинности связывания с использованием систем OCTET® лиганд, например, биотинилированный MSLN человека или яванского макака, иммобилизуют на поверхности наконечника стрептавидинового капиллярного датчика OCTET®, который затем активируют стрептавидиновыми наконечниками в соответствии с инструкциями производителя, используя приблизительно 20-50 мкг/мл белка MSLN человека или яванского макака. Раствор PBS/казеин также вводят в качестве блокирующего средства. Для измерения кинетики ассоциации варианты связывающего MSLN белка вводят в концентрации от приблизительно 10 нг/мл до приблизительно 100 мкг/мл, от приблизительно 50 нг/мл до приблизительно 5 мкг/мл или от приблизительно 2 нг/мл до приблизительно 20 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие MSLN однодоменные белки используют в концентрации от приблизительно 2 нг/мл до приблизительно 20 мкг/мл. Полная диссоциация наблюдается в случае отрицательного контроля, буфера для анализа без связывающих белков. Кинетические параметры реакций связывания затем определяют с использованием соответствующего инструмента, например программного обеспечения ForteBio.

В настоящем документе описаны связывающие MSLN белки, фармацевтические композиции, а также нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения таких связывающих MSLN белков. Также предложены способы применения раскрытых связывающих MSLN белков в профилактике и/или лечении заболеваний, состояний и нарушений. Связывающие MSLN белки способны специфически связываться с MSLN. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие MSLN белки включают в себя дополнительные домены, такие как CD3-связывающий домен и альбумин-связывающий домен.

Мезотелин (MSLN) и его роль в опухолевых заболеваниях.

В настоящем изобретении рассматриваются связывающие мезотелин белки. Мезотелин представляет собой гликопротеин, присутствующий на поверхности клеток мезотелиальной слизистой оболочки полостей брюшины, плевры и перикарда. Ген мезотелина (MSLN) кодирует белок-предшественник размером 71 килодальтон (кДа), который процессируется в белок с молекулярной массой 40 кДа, называемый мезотелином, который представляет собой гликозилфосфатидилинозитол-закрепленный гликопротеин, присутствующий на поверхности клетки (Chang, et al., Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93:136-40). кДНК мезотелина клонировали из библиотеки, полученной из линии клеток HPC-Y5 (Kojima et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:21984-21990). кДНК также клонировали с использованием моноклонального антитела K1, которое распознает мезотелиомы (Chang and Pastan (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:136-40). Мезотелин представляет собой антиген дифференцировки, экспрессия которого в нормальных тканях чело-

века ограничена мезотелиальными клетками, выстилающими полость тела, такими как плевра, перикард и брюшина. Мезотелин также высоко экспрессируется при нескольких различных формах рака человека, включая в себя мезотелиомы, аденокарциномы поджелудочной железы, формы рака яичников, аденокарциномы желудка и легких. (Hassan, et al., *Eur J Cancer* (2008) 44:46-53) (Ordóñez, *Am J Surg Pathol* (2003) 27:1418-28; Ho, et al., *Clin Cancer Res* (2007) 13:1571-5). Мезотелин сверхэкспрессируется в подавляющем большинстве первичных аденокарцином поджелудочной железы с редкой и слабой экспрессией, наблюдаемой в доброкачественной ткани поджелудочной железы. Argani P, et al. *Clin Cancer Res*. 2001; 7(12):3862-3868. Эпителиальная злокачественная плевральная мезотелиома (MPM) универсально экспрессирует мезотелин, в то время как саркоматоидная MPM, вероятно, не экспрессирует мезотелин. Большинство серозных эпителиальных карцином яичников и связанные с ними первичные перитонеальные карциномы экспрессируют мезотелин.

Мезотелин также выделяется из опухолевых клеток как растворимая форма белка, по сравнению с нативной мембраносвязанной версией (Hellstrom, et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2006) 15:1014-20; Ho, et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2006) 15:1751). Структурно мезотелин экспрессируется на клеточной поверхности в виде полипептида-предшественника размером 60 кДа, который протеолитически процессируется в выделяемый компонент 31 кДа (соответствующий MPF) и мембраносвязанный компонент 40 кДа (Hassan et al. (2004) *Clin. Cancer. Res.* 10:3937-3942). Было показано, что мезотелин взаимодействует с CA125 (также известным как MUC-16), муциноподобным гликопротеином, присутствующим на поверхности опухолевых клеток, который ранее был идентифицирован как антиген рака яичника. Кроме того, связывание CA125 с мембраносвязанным мезотелином опосредует гетеротипическую клеточную адгезию, а CA125 и мезотелин коэкспрессируются в распространенной аденокарциноме яичников (Rump, A. et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:9190-9198). Экспрессия мезотелина в слизистой оболочке брюшины коррелирует с предпочтительным местом образования метастазирования рака яичников, и считается, что связывание мезотелина с CA125 способствует перитонеальному метастазированию опухолей яичников (Gubbels, J. A. et al. (2006) *Mol. Cancer.* 5:50).

Мезотелин представляет собой мишень природного иммунного ответа при раке яичников, и было предложено, чтобы он был мишенью для иммунотерапии рака. Bracci L, et al. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(2 Pt 1):644-653; Moschella F, et al. *Cancer Res*. 2011; 71(10):3528-3539; Gross G, et al. *FASEB J*. 1992; 6(15):3370-3378; Sadelain M, et al. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(1):35-45; Muul L M, et al. *Blood*. 2003; 101(7):2563-2569; Yee C, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(25): 16168-16173. Наличие мезотелин-специфических CTL у пациентов, характеризующихся наличием рака поджелудочной железы, коррелирует с общей выживаемостью. Thomas A M, et al. *J Exp Med*. 2004; 200: 297-306. Кроме того, Pastan с соавторами использовали растворимые фрагменты антитела к мезотелину, конъюгированные с иммунотоксинами, для лечения страдающих от рака пациентов с мезотелин-позитивными опухолями. Этот подход продемонстрировал адекватную безопасность и некоторую клиническую активность при раке поджелудочной железы. Hassan R, et al. *Cancer Immun.* 2007; 7:20 and Hassan R, et al. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(17):5144-5149. При раке яичников эта терапевтическая стратегия вызвала один незначительный ответ по критериям RECIST и стабильное заболевание у второго пациента, у которого также было полное разрешение асцита.

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

Было показано, что зрелый мезотелин клеточной поверхности содержит три отдельных домена, а именно области I (содержащие остатки 296-390), II (содержащие остатки 391-486) и III (содержащие остатки 487-598). (Tang et al., A human single-domain antibody elicits potent antitumor activity by targeting an epitope in mesothelin close to the cancer cell surface, *Mol. Can. Therapeutics*, 12(4): 416-426, 2013).

Первые антитела, произведенные против мезотелина для терапевтического вмешательства, были разработаны для вмешательства во взаимодействие между мезотелином и CA-125. Фаговый дисплей идентифицировал Fv SS, который был оптимизирован по аффинности и использован для производства нацеленного на мезотелин рекомбинантного иммунотоксина, SS1P. Антитело MORAb-009 аматуксимаб, которое также использует SS1, распознает нелинейный эпитоп в аминоконцевых 64 аминокислотах мезотелина в области I. Fv SS1 также использовался для производства Т-клеток, сконструированных с химер-

ным антигенным рецептором. Недавно появились новые антитела к мезотелину, которые распознают другие области белка мезотелина.

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

Связывающие MSLN белки.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрены связывающие белки, такие как однодоменные антитела к MSLN или варианты антител, которые связываются с эпитопом в белке MSLN. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок связывается с белком, содержащим последовательность SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок связывается с белком, содержащим усеченную последовательность, по сравнению с SEQ ID NO: 57.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрыты в настоящем документе связывающие MSLN белки распознают полноразмерный мезотелин. В некоторых случаях раскрыты в настоящем документе связывающие MSLN белки распознают эпитоп в области I (содержащей аминокислотные остатки 296-390 SEQ ID NO: 57), области II (содержащей аминокислотные остатки 391-486 SEQ ID NO: 57) или области III (содержащей аминокислотные остатки 487-598 SEQ ID NO: 57) мезотелина. Предполагается, что связывающие MSLN белки по настоящему раскрытию могут, согласно некоторым вариантам осуществления, распознавать и связываться с эпитопами, которые расположены вне областей I, II или III мезотелина. Согласно еще другим вариантам осуществления раскрыты связывающие MSLN белки, которые распознают и связываются с эпитопом, отличным от антитела MORAb-009.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие MSLN белки по настоящему раскрытию экспрессируются в многодоменном белке, который содержит дополнительные домены иммуноглобулина. Такие многодоменные белки могут действовать посредством основанного на иммунотоксине ингибирования опухолевого роста и индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Согласно некоторым вариантам осуществления многодоменные белки, содержащие связывающие MSLN белки по настоящему изобретению, проявляют комплемент-зависимую цитотоксическую (CDC) активность. Согласно некоторым вариантам осуществления многодоменные белки, содержащие связывающие MSLN белки по настоящему изобретению, проявляют активность ADCC и CDC против экспрессирующих мезотелин раковых клеток.

Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления, где многодоменные белки, содержащие связывающие MSLN белки, действуют через CDC, связывающий MSLN белок может распознавать конформационный эпитоп на С-терминальном конце белка мезотелина, близко к поверхности клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок мезотелин содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, и С-терминальный конец содержит аминокислотные остатки 539-588.

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

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

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

сти, пониженной аффинности, пониженной иммуногенности, повышенной зависимости связывания от pH. Например, вариантное антитело с созревшей аффинностью может быть получено, например, с использованием основанных на фаговом дисплее способов созреваания аффинности, таких как описанные в настоящем документе и известные в настоящей области техники.

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

Следует отметить, что как правило, используемый в настоящем документе термин "однодоменное антитело" в своем самом широком смысле не ограничен конкретным биологическим источником или конкретным способом получения. Однодоменные антитела представляют собой антитела, чьи определяющие комплементарность области являются частью однодоменного полипептида. Примеры включают в себя, без ограничения, антитела с тяжелой цепью, антитела, естественно лишенные легких цепей, однодоменные антитела, полученные из обычных 4-цепочечных антител, сконструированные антитела и однодоменные каркасы, отличные от таковых, полученных из антител. Однодоменные антитела могут представлять собой любые из настоящей области техники или любые будущие однодоменные антитела. Однодоменные антитела могут быть получены из любых видов, включая в себя, без ограничения, мышь, человека, верблюда, ламу, козу, кролика, быка. Например, согласно некоторым вариантам осуществления однодоменные антитела по настоящему раскрытию получают: (1) путем выделения домена VHH природного антитела с тяжелой цепью; (2) путем экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей встречающийся в природе домен VHH; (3) путем "гуманизации" встречающегося в природе домена VHH или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой гуманизированный домен VHH; (4) путем "камелизирования" встречающегося в природе домена VH от любых видов животных и, в частности, от вида млекопитающего, такого как человек, или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой камелизированный домен VH; (5) путем "камелизирования" "доменного антитела" или "Dab" или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой камелизированный домен VH; (6) с использованием синтетических или полусинтетических технологий получения белков, полипептидов или других аминокислотных последовательностей; (7) путем получения нуклеиновой кислоты, кодирующей однодоменное антитело, с использованием технологий синтеза нуклеиновой кислоты, известных в настоящей области техники, с последующей экспрессией полученной таким образом нуклеиновой кислоты; и/или (8) любой комбинацией одного или более из вышеперечисленных.

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

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

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

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

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MSLN, как описано в настоящем документе, содержит однодоменное антитело с аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности природного VHH-домена, но которая была "гуманизирована", т.е. путем замещения одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности указанной природной последовательности VHH (и, в частности, в каркасных последовательностях) одним или более аминокислотными остатками, которые находятся в соответствующем положении(ях) в домене VH из обычного 4-цепочечного антитела человека (например, как указано выше). Это может быть выполнено известным в настоящей области техникой способом, который будет понятен специалисту в настоящей области техники, например, на основе дальнейшего описания, приведенного в настоящем документе. Опять же, следует отметить, что такие гуманизированные однодоменные антитела к MSLN по настоящему раскрытию получают любым подходящим способом, известным *per se* (т.е. как указано в пунктах (1) - (8) выше), и, таким образом, строго не ограничиваются полипептидами, которые были получены с использованием полипептида, который содержит природный домен VHH в качестве исходного материала. Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления однодоменное антитело к MSLN, как описано в настоящем документе, содержит однодоменное антитело с аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности природного VH-домена, но которая была "камелизирована", т.е. путем замещения одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности встречающегося в природе домена VH из обычного 4-цепочечного антитела одним или более аминокислотными остатками, которые находятся в соответствующем положении(ях) в домене VHH антитела с тяжелыми цепями. Такие "камелизирующие" замены предпочтительно вставляются в положениях аминокислот, которые образуют и/или присутствуют на границе VH-VL, и/или в так называемых характерных для Camelidae остатках (смотрите, например, WO 94/04678 и Davies and Riechmann (1994 and 1996)). Предпочтительно, последовательность VH, которая используется в качестве исходного материала или отправной точки для создания или разработки камелизированного однодоменного домена, предпочтительно представляет собой последовательность VH от млекопитающего, более предпочтительно последовательность VH человека, такую как последовательность VH3. Однако следует отметить, что такие камелизированные однодоменные антитела к MSLN по настоящему раскрытию согласно определенным вариантам осуществления получают любым подходящим способом, известным в настоящей области техники (т.е. как указано в пунктах (1) - (8) выше), и таким образом, строго не ограничиваются полипептидами, которые были получены с использованием полипептида, который содержит природный домен VH в качестве исходного материала. Например, как дополнительно описано в настоящем документе, как "гуманизация", так и "камелизация" выполняются путем предоставления нуклеотидной последовательности, которая кодирует встречающийся в природе домен VHH или домен VH, соответственно, и затем путем изменения одного или более кодонов в указанной нуклеотидной последовательности таким образом, чтобы новая нуклеотидная последовательность кодировала "гуманизованное" или "камелизированное" однодоменное антитело соответственно. Затем эту нуклеиновую кислоту можно экспрессировать, чтобы получить желаемое однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию. Альтернативно, согласно другим вариантам осуществления на основе аминокислотной последовательности встречающегося в природе домена VHH или домена VH, соответственно, разрабатывают аминокислотную последовательность требуемого гуманизованного или камелизированного однодоменного антитела к MSLN по настоящему раскрытию, соответственно, и затем синтезируют *de novo* с использованием известных технологий синтеза пептидов. Согласно некоторым вариантам осуществления на основе аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности встречающегося в природе домена VHH или домена VH, соответственно, разрабатывают нуклеотидную последовательность, кодирующую требуемое гуманизованное или камелизированное однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию, соответственно, и затем синтезируют *de novo* с использованием известных технологий синтеза нуклеиновой кислоты, после чего полученную таким образом нуклеиновую кислоту экспрессируют с использованием известных технологий экспрессии, чтобы получить требуемое однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию.

Другие подходящие способы и технологии получения однодоменного антитела к MSLN по настоящему раскрытию и/или кодирующих его нуклеиновых кислот, например, начиная с встречающихся в природе последовательностей VH или последовательностей VHH, например, включают в себя объединение одной или более частей одной или более встречающихся в природе последовательностей VH (таких как одна или более каркасных (FR) последовательностей и/или последовательностей определяющей комплементарности области (CDR)), одной или более частей одной или более встречающихся в природе последовательностей VHH (таких как одна или более последовательностей FR или последовательностей CDR) и/или одной или более синтетических или полусинтетических последовательностей подходящим образом, чтобы обеспечить однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию или кодирующую его нуклеотидную последовательность или нуклеиновую кислоту.

Предполагается, что согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок является довольно небольшим и согласно некоторым вариантам осуществления не более чем 25 кДа, не более чем 20 кДа, не более чем 15 кДа или не более чем 10 кДа. В некоторых случаях связывающий MSLN белок составляет 5 кДа или менее, если он представляет собой пептид или низкомолекулярный объект.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок по настоящему изобретению представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая состоит из четырех каркасных областей/последовательностей (f1-f4), прерываемых тремя определяющими комплементарность областями/последовательностями, как представлено формулой:

$$f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4,$$

где r1, r2 и r3 представляют собой определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, а f1, f2, f3 и f4 представляют собой остатки каркаса. Остатки каркаса связывающего MSLN белка по настоящему изобретению содержат, например, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 или 94 аминокислотных остатка, и определяющие комплементарность области содержат, например, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 аминокислотных остатков. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий MSLN белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-40.

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

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

Связывающие MSLN белки по настоящему раскрытию в некоторых примерах содержат одну или более консервативных областей. Консервативные области содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 41-50, или варианты, содержащие одну или более замен аминокислотных остатков относительно указанных последовательностей. Иллюстративные варианты осуществления включают в себя связывающие MSLN белки, содержащие одну или более консервативных областей, выбранных из SEQ ID NO: 41-44, или варианты, содержащие одну или более замен аминокислотных остатков относительно указанных последовательностей. В некоторых случаях связывающий MSLN белок содержит (i) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 41, (ii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 42, (iii) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 43, и (iv) участок аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 44.

Дополнительные иллюстративные варианты осуществления включают в себя связывающие MSLN белки, содержащие одну или более консервативных областей, выбранных из SEQ ID NO: 45-50, или варианты, содержащие одну или более замен аминокислотных остатков относительно указанных последо-

антам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 200 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 150 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 100 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 90 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,2 нМ до приблизительно 80 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,3 нМ до приблизительно 70 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,4 нМ до приблизительно 50 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 30 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,6 нМ до приблизительно 10 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,7 нМ до приблизительно 8 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,8 до приблизительно 6 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 0,9 нМ до приблизительно 4 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd и cKd находятся в диапазоне от приблизительно 1 нМ до приблизительно 2 нМ.

Согласно некоторым вариантам осуществления любой из указанных выше связывающих MSLN белков (например, однодоменные антитела к MSLN с SEQ ID NO: 1-40 и 58) представляет собой аффинный пептид, меченный для простоты очистки. Согласно некоторым вариантам осуществления аффинная пептидная метка представляет собой шесть последовательных остатков гистидина, также называемых 6X-his.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие MSLN белки согласно настоящему раскрытию могут быть включены в нацеленные на MSLN триспецифические белки. В некоторых примерах триспецифический связывающий белок содержит связывающий домен CD3, связывающий домен человеческого сывороточного альбумина (HSA) и связывающий домен против MSLN в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых случаях триспецифический связывающий белок содержит описанные выше домены в следующей ориентации: MSLN-HSA-CD3.

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

Интеграция в химерные антигенные рецепторы (CAR).

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

Свойства снижения роста опухоли.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие MSLN белки по настоящему изобретению уменьшают рост опухолевых клеток *in vivo* при введении субъекту, у которого есть опухолевые клетки, которые экспрессируют мезотелин. Измерение уменьшения роста опухолевых клеток может быть определено множеством различных методологий, хорошо известных в настоящей области техники. Неограничивающие примеры включают в себя прямое измерение размера опухоли, измерение массы иссеченной опухоли и сравнение с контрольными субъектами, измерение с помощью способов визуализации (например, КТ или МРТ), которые могут использовать или не использовать изотопы или люминесцентные молекулы (например, люциферазу) для расширенного анализа, и т.п. Согласно конкретным вариан-

там осуществления введение антигенсвязывающих средств по настоящему раскрытию приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим средством по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, с приблизительно 100% снижением роста опухоли, указывающим на полный ответ и исчезновение опухоли. Согласно дополнительным вариантам осуществления введение антигенсвязывающих средств по настоящему раскрытию приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим средством приблизительно на 50-100%, приблизительно на 75-100% или приблизительно на 90-100%. Согласно дополнительным вариантам осуществления введение антигенсвязывающих средств по настоящему раскрытию приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим средством приблизительно на 50-60%, приблизительно на 60-70%, приблизительно на 70-80%, приблизительно на 80-90% или приблизительно на 90-100%.

Модификации связывающих MSLN белков.

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

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

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

Полинуклеотиды, кодирующие связывающие MSLN белки.

Согласно некоторым вариантам осуществления также предусмотрены полинуклеотидные молекулы, кодирующие связывающий MSLN белок, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотидные молекулы предусмотрены в виде конструкций ДНК. Согласно другим вариантам осуществления полинуклеотидные молекулы предусмотрены в качестве транскриптов информационной РНК.

Молекулы полинуклеотидов конструируют известными способами, такими как объединение генов, кодирующих связывающий анти-MSLN белок, функционально связанных с подходящим промотором и, необязательно, подходящим терминатором транскрипции, и экспрессия его в бактериях или другой подходящей системе экспрессии, такой как, например, клетки CHO.

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

Различные системы вектора/хозяина экспрессии могут быть использованы для содержания и экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид описанного связывающего MSLN белка. Примерами векторов экспрессии для экспрессии в *E. coli* являются pSKK (Le Gall et al., J Immunol Methods. (2004) 285(1): 111-27), pcDNA5 (Invitrogen) для экспрессии в клетках млекопитающих, системы дрожжевой экспрессии PICHIA PINK™ (Invitrogen), система экспрессии бакуловируса BACUVANCE™ (GenScript).

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

Фармацевтические композиции.

Согласно некоторым вариантам осуществления также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие описанный в настоящем документе связывающий MSLN белок, вектор, содержащий

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

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтических композиций описанный в настоящем документе связывающий MSLN белок инкапсулирован в наночастицы. Согласно некоторым вариантам осуществления наночастицы представляют собой фуллерены, жидкие кристаллы, липосомы, квантовые точки, суперпарамагнитные наночастицы, дендримеры или наностержни. Согласно дополнительным вариантам осуществления фармацевтических композиций связывающий MSLN белок присоединен к липосомам. В некоторых случаях связывающий MSLN белок конъюгируют с поверхностью липосом. В некоторых случаях связывающий MSLN белок инкапсулируют в оболочку липосомы. В некоторых случаях липосома представляет собой катионную липосому.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие MSLN молекулы по настоящему раскрытию вводят в дозировке до 10 мг/кг с частотой один раз в неделю. В некоторых случаях дозировка составляет от приблизительно 1 нг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10 нг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 15 нг/кг, от приблизительно 12 до приблизительно 20 нг/кг, от приблизительно 18 до приблизительно 30 нг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 50 нг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 60 нг/кг, от приблизительно 45 до приблизительно 70 нг/кг, от приблизительно 65 до приблизительно 85 нг/кг, от приблизительно 80 нг/кг до приблизительно 1 мкг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мкг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 10 мкг/кг, от приблизительно 7 до приблизительно 15 мкг/кг, от приблизительно 12 до приблизительно 25 мкг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мкг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 70 мкг/кг, от приблизительно 45 до приблизительно 80 мкг/кг, от приблизительно 65 до приблизительно 90 мкг/кг, от приблизительно 85 мкг/кг до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,095 до приблизительно 10 мг/кг. В некоторых случаях дозировка составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,2 мг/кг; от приблизительно 0,25 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,45 до приблизительно 1 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 4 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 6 мг/кг, от приблизительно 5,5 до приблизительно 7 мг/кг, от приблизительно 6,5 до приблизительно 8 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 9 мг/кг или от приблизительно 8,5 до приблизительно 10 мг/кг. Частота введения согласно некоторым вариантам осуществления составляет приблизительно менее чем ежедневно, через день, менее одного раза в день, два раза в неделю, еженедельно, один раз в 7 дней, один раз в две недели, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели или раз в месяц. В некоторых случаях частота введения составляет раз в неделю. В некоторых случаях частота введения составляет раз в неделю, а дозировка составляет до 10 мг/кг. В некоторых случаях продолжительность введения составляет от приблизительно 1 дня до приблизительно 4 недель или более.

Способы лечения.

Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления представлены спосо-

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

В настоящем документе также представлены способы и применения для лечения заболевания, нарушения или состояния, связанного с антигеном-мишенью, предусматривающие введение нуждающемуся в этом индивидууму связывающего MSLN белка или мультиспецифического связывающего белка, содержащего описанный в настоящем изобретении связывающий MSLN белок. Заболевания, нарушения или состояния, связанные с антигеном-мишенью, включают в себя, без ограничения, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, аутоиммунное заболевание, отторжение трансплантата, атеросклероз или фиброз. Согласно дополнительным вариантам осуществления заболевание, нарушение или состояние, связанное с антигеном-мишенью, представляет собой пролиферативное заболевание, опухолевое заболевание, воспалительное заболевание, иммунологическое нарушение, аутоиммунное заболевание, инфекционное заболевание, вирусное заболевание, аллергическую реакцию, паразитарную реакцию, болезнь "трансплантат против хозяина" или болезнь "хозяин против трансплантата". Согласно одному варианту осуществления связанное с антигеном-мишенью заболевание, нарушение или состояние представляет собой рак. Рак, который можно лечить, предотвращать или держать под контролем с помощью связывающих MSLN белков по настоящему изобретению, и способы их применения включают в себя, без ограничения, раковые опухоли эпителиального происхождения. Примеры таких форм рака включают в себя следующие: лейкозы, такие как, без ограничения, острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острые миелоцитарные лейкозы, такие как миелобластные, промиелоцитарные, миеломоноцитарные, моноцитарные лейкозы и эритролейкоз, и миелодиспластический синдром; такие хронические лейкозы, как, без ограничения, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, лейкоз ворсистых клеток; истинная полицитемия; такие лимфомы, как, помимо прочего, болезнь Ходжкина, неходжкинская болезнь; такие множественные миеломы, как, без ограничения, тлеющая множественная миелома, несекреторная миелома, остеосклеротическая миелома, лейкоз плазматических клеток, солитарная плазмоцитома и экстремедуллярная плазмоцитома; макроглобулинемия Вальденстрема; моноклональная гаммапатия неопределенного значения; доброкачественная моноклональная гаммапатия; болезнь тяжелых цепей; такие саркомы костей и соединительной ткани, как, без ограничения, костная саркома, остеосаркома, хондросаркома, саркома Юинга, злокачественная гигантоклеточная опухоль, фибросаркома кости, хордома, периостальная саркома, саркома мягких тканей, ангиосаркома (гемангиосаркома), фибросаркома, саркома Капоши, лейомиосаркома, липосаркома, лимфангиосаркома, нейрилеммома, рабдомиосаркома, синовиальная саркома; такие опухоли головного мозга, как, без ограничения, глиома, астроцитомы, глиома ствола головного мозга, эпендимомы, олигодендроглиомы, неглиома, акустическая невринома, краниофарингиома, медуллобластома, менингиома, пинеоцитомы, пинеобластома, первичная лимфома головного мозга; рак молочной железы, включая в себя, без ограничения, протоковую карциному, аденокарциному, лобулярную (мелкоклеточную) карциному, внутрипротоковую карциному, медуллярный рак молочной железы, слизистый рак молочной железы, трубчатый рак молочной железы, папиллярный рак молочной железы, болезнь Педжета и воспалительный рак молочной железы; рак надпочечника, такой как, без ограничения, феохромоцитомы и адренокортикальная карцинома; такой рак щитовидной железы, как, без ограничения, папиллярный или фолликулярный рак щитовидной железы, медуллярный рак щитовидной железы и анапластический рак щитовидной железы; такой рак поджелудочной железы, как, без ограничения, инсулинома, гастринома, глюкагонома, вилома, секретирующая соматостатин опухоль и опухоль карциноидных или островковых клеток; такой рак гипофиза, как, без ограничений, болезнь Кушинга, пролактин-секретирующая опухоль, акромегалия и несахарный диабет; такие формы рака глаз, как, без ограничения, меланома глаза, такая как меланома радужки, меланома хориоидеи и меланома цилиарного тела, и ретинобластома; формы рака влагалища, такие как плоскоклеточный рак, аденокарцинома и меланома; такой рак вульвы, как плоскоклеточный рак, меланома, аденокарцинома, базальноклеточный рак, саркома и болезнь Педжета; рак шейки матки, такой как, без ограничения, плоскоклеточный рак и аденокарцинома; формы рака матки, такие как, без ограничения, рак эндометрия и саркома матки; такой рак яичников, как, без ограничения, эпителиальный рак яичников, пограничная опухоль, герминогенная опухоль и стромальная опухоль; такие формы рака пищевода, как, без ограничения, плоскоклеточный рак, аденокарцинома, аденоидно-кистозная карцинома, мукоэпидермоидная карцинома, аденосквамозная карцинома, саркома, меланома, плазмоцитома, веррукозная карцинома и карцинома мелких клеток; такой рак желудка, как, без ограничения, аденокарцинома, некротическое (полипозное) изъязвление, поверхностно распространенные, диффузно распространенные злокачественные лимфомы, липосаркома, фибросаркома и карциносаркома; формы рака толстой кишки; формы рака прямой кишки; такие формы рака печени, как, без ограничения, гепатоцеллюлярная карцинома и гепатобластома; такие формы рака желчного пузыря, как аденокарцинома; такие

холангиокарциномы, как, без ограничения, папиллярная, узловая и диффузная; такие формы рака легких, как немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный рак (эпидермоидная карцинома), аденокарцинома, крупноклеточная карцинома и мелкоклеточный рак легкого; такой рак яичка, как, без ограничения, зародышевая опухоль, семинома, анапластическая, классическая (типичная), сперматоцитарная, несеминозная, эмбриональная карцинома, тератома, хориокарцинома (опухоль желточного мешка), такой рак предстательной железы, как, без ограничения, интраэпителиальная неоплазия предстательной железы аденокарцинома, лейомиосаркома и рабдомиосаркома; формы рака полового члена; такой рак полости рта, как, без ограничения, плоскоклеточный рак; базальный рак; такие формы рака слюнных желез, как, без ограничения, аденокарцинома, мукоэпидермоидная карцинома и аденоидно-кистозная карцинома; такой рак глотки, как, без ограничения, плоскоклеточный рак и веррукоз; такие формы рака кожи, как, без ограничения, базальноклеточный рак, плоскоклеточный рак и меланома, меланома с поверхностным распространением, узелковая меланома, злокачественная меланома лентиго, акральная лентигинозная меланома; такие формы рака почек, как, без ограничения, почечно-клеточная карцинома, аденокарцинома, гипернефрома, фибросаркома, переходно-клеточный рак (почечной лоханки и/или мочеточника); опухоль Вильмса; такие формы рака мочевого пузыря, как, без ограничения, переходно-клеточная карцинома, плоскоклеточный рак, аденокарцинома, карциносаркома. Кроме того, формы рака включают в себя злокачественную миксому, липосаркому, остеогенную саркому, эндотелиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, мезотелиому, синовиому, гемангиобластому, эпителиальную карциному, цистаденокарциному, бронхогенную карциному, карциному потовых желез, карциному сальной железы, папиллярную карциному и папиллярные аденокарциномы (обзор таких нарушений, см. Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America).

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

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

(например, человек, который несет генетический маркер для заболевания, такого как рак молочной железы).

Согласно некоторым вариантам осуществления описанных в настоящем документе способов описанные в настоящем документе связывающие MSLN белки вводят в комбинации со средством для лечения конкретного заболевания, нарушения или состояния. Средства включают в себя, без ограничения, терапию, включающую в себя антитела, небольшие молекулы (например, химиотерапевтические средства), гормоны (стероидные, пептидные и т.п.), радиотерапию (γ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов, микроволны, УФ-излучение и т.п.), генную терапию (например, антисмысловую, ретровирусную терапию и т.п.) и другие иммунотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе связывающий MSLN белок вводят в комбинации с противодиарейными средствами, противорвотными средствами, анальгетиками, опиоидами и/или нестероидными противовоспалительными средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе связывающий MSLN белок вводят в комбинации с противораковыми средствами. Неограничивающие примеры противораковых средств, которые можно использовать согласно различным вариантам осуществления настоящего раскрытия, включая в себя фармацевтические композиции и лекарственные формы и наборы по настоящему раскрытию, включают в себя следующие: ацивирин; акларубин; акадола гидроксид; акронин; адозелезин; алдеслейкин; алтреамин; амбоницин; аметантрона ацетат; аминоклотетимид; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназа; асперлин; азацидин; азетеп; азотимицин; батимастат; бензодепа; бикалутамид; бисантрена гидроксид; биснафид димезилат; бизелезин; блеомицина сульфат; бреквинар натрия; бропиримин; бусульфид; кантиномицин; калустерон; карацемид; карбетимер; карбоплатин; кармустин; карубицина гидроксид; карзелезин; седефингол; хлорамбуцил; циролемицин; цисплатин; кладрибин; криснатола мезилат; циклофосфамид; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; даунорубицина гидроксид; децитабин; дексормеплатин; дезагуанин; дезагуанина мезилат; диазиквон; доцетаксел; доксорубин; доксорубицина гидроксид; дролоксифен; дролоксифена цитрат; дромостанолон пропионат; дузомицин; эдотрексат; эфлорнитина гидроксид; элсамитруцин; энлоплатин; энпромаг; эпипропидин; эпирубицина гидроксид; эрбулозол; эзорубицина гидроксид; эстрамустин; эстрамустинфосфат натрия; этанидазол; этопозид; этопозид фосфат; этоприл; фадрозол гидроксид; фазарабин; фенретирид; флоксурин; флударабина фосфат; фторурацил; фторцитидин; фоскидон; фостриecin натрия; гемцитабин; гемцитабина гидроксид; гидроксимочевина; идарубицина гидроксид; ифосфамид; илмофозин; интерлейкин II (включая в себя рекомбинантный интерлейкин II или rIL2), интерферон альфа-2a; интерферон альфа-2b; интерферон альфа-n1; интерферон альфа-n3; интерферон бета-1a; интерферон гамма-1b; ипроплатин; иринотекана гидроксид; лантеотид ацетат; летрозол; леупролида ацетат; лиарозол гидроксид; лометрексол натрия; ломустин; лозоксантрона гидроксид; масопрокол; майтанзин; мехлорэтамид гидроксид; мегестрола ацетат; мегестрола ацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрия; метоприн; метуредеп; митиндомид; митокарцин; митокромин; митогиллин; митомалцин; митомидин; митоспер; митотан; митоксантрона гидроксид; микофеноловая кислота; нокадазол; ногаламицин; ормаплатин; оксисуран; паклитаксел; пегаспаргаза; пелиомицин; пентамустин; пепломицина сульфат; перфосфамид; пипоброман; пипосульфид; пироксантрона гидроксид; пликамицин; пломестан; порфирин натрия; порфириомидин; преднимустин; прокарбазина гидроксид; пуриноидин; пуриноидина гидроксид; пиразофурил; рибоприн; роглетимид; сафингол; сафингола гидроксид; семустин; симтразен; спарфозат натрия; спарсомицин; спирогермания гидроксид; спироустин; спиролатин; стрептонигрин; стрептозоцин; сулофенур; тализомицин; текогалан натрия; тегафур; телоксантрона гидроксид; темопорфин; тенипозид; тероксирон; тестолактон; тиамиприн; тиогуанин; тиотеп; тиазофурил; тирапазамин; торемифена цитрат; трестолон ацетат; трицирибин фосфат; триметрексат; триметрексата глюкуроонат; трипторелин; тубузол гидроксид; урамустин; уредеп; вапреотид; вертепорфин; винбластин сульфат; винкристина сульфат; виндизин; виндизина сульфат; винепидина сульфат; винглицината сульфат; винлеуридина сульфат; винорелбин тартрат; винрозидина сульфат; винзолидина сульфат; ворозол; зениплатин; зиностагин; зорубицина гидроксид. Другие примеры противораковых лекарственных средств включают в себя, без ограничения, следующие: 20-эпи-1,25 дигидроксивитамин D3; 5-этинилурацил; абиратерон; акларубин; ацилфулвен; адецилленол; адозелезин; алдеслейкин; антагонисты ALL-TK; алтреамин; амбамустин; амидокс; амифостин; аминоклевулиновая кислота; амрубин; амсакрин; анагелид; анастрозол; андрографолит; ингибиторы ангиогенеза; антагонист D; антагонист G; антареликс; анти-дорзализационный морфогенетический белок-1; антиандроген, карцинома предстательной железы; антиэстроген; антинеопластон; антисмысловые олигонуклеотиды; афидиколина глицинат; модуляторы гена апоптоза; регуляторы апоптоза; апуриновая кислота; ара-CDP-DL-PTBA; аргининдезаминаза; асулакрин; атаместан; атримустин; аксинастатин 1; аксинастатин 2; аксинастатин 3; азастрон; азатоксин; азатирозин; производные баккатина III; баланол; батимастат; антагонисты BCR/ABL; бензохлорины; бензоилстауроспорин; бета-лактамы производные; бета-алетин; бетакламицин B; бетулиновая кислота; ингибитор bFGF; бикалутамид; бисантрин; бисазиридинилспермин; биснафид; бистратен A; бизелезин; брелат; бропиримин; будотитан; бутионина сульфоксимин; кальципотриол; кальфостин C; производные камптотецина; канарипокс IL-2; капецитабин; карбоксамид-амино-триазол; карбок-

сиамидотриазол; CaRest M3; CARN 700; производная ингибитора хряща; карзелезин; ингибиторы казеинкиназы (ICOS); кастаноспермин; цекропин В; цетрореликс; хлорины; хлорхиноксалина сульфонамид; цикапрост; цис-порфирин; кладрибин; аналоги кломифена; клотримазол; коллисмидин; коллисмидин В; комбретастидин А4; аналог комбретастидина; конагенин; крамбесцидин 816; криснотол; криптофицин 8; производные криптофицина А; курацин А; циклопентантрахиноны; циклоплатам; ципемидин; окфосфат цитарабина; цитолитический фактор; цитостатин; дакликсимаб; децитабин; дегидродидемнин В; деслорелин; дексаметазон; дексифосфамид; дексразоксан; дексверапамил; диазиквон; дидемнин В; дидокс; диэтилнорспермин; дигидро-5-азациитидин; дигидротаксол, 9-; диоксацидин; дифенилспиромустин; доцетаксел; докозанол; доласетрон; доксифлуридин; дролоксифен; дронабинол; дуокармицин SA; эбселен; экомустин; эделфозин; эдреклоламаб; эфлорнитин; элемен; эмитефур; эпирубицин; эпистерид; аналог эстрамустина; агонисты эстрогена; антагонисты эстрогена; этанидазол; этопозида фосфат; эксеместан; фадрозол; фазарабин; фенретинид; филграстим; финастерид; флавопиридол; флезеластин; фластерон; флударабин; фтордауноруницина гидрохлорид; форфенимекс; форместан; фостриецин; фотемустин; гадолиния тексафирин; нитрат галлия; галоцитабин; ганиреликс; ингибиторы желатиназы; гемцитабин; ингибиторы глутатиона; гепсульфам; херегулин; гексаметилен бисацетамид; гиперидин; ибандроновая кислота; идарубицин; идоксифен; идрамантон; илмофозин; иломастат; имидазоакридоны; имиквимод; иммуностимуляторные пептиды; инсулиноподобный ингибитор рецептора фактора-1 роста; агонисты интерферона; интерфероны; интерлейкины; иобенгуан; иододоксорубицин; ипомеанол, 4-; ироплакт; ирзогландин; иобенгазол; изогомогаликондрин В; итасетрон; джасплакинолид, кахалалид F; ламелларин-N триацетат; ланреотид; леинамицин; ленограстим; сульфат лентинана; лептолстатин; летрозол; ингибирующий лейкоз фактор; лейкоцитарный альфа-интерферон; леупролид+эстроген+прогестерон; лейпро-релин; левамизол; лиарозол; аналог линейного полиамина; липофильный пептид дисахарида; липофильные платиновые соединения; лиссоклинамид 7; лоблаплатин; ломбрицин; лометрексол; лонидамин; лозоксантрон; ингибитор редуктазы HMG-CoA (такой как, без ограничения, ловастатин; правастатин, флувастатин, статин, симвастатин и аторвастатин); локсорибин; луртотекан; лютеция тексафирин; лизофиллин; литические пептиды; мейтанзин; манностатин А; маримастат; мазопротекс; маспин; ингибиторы матрилизина; ингибиторы матричной металлопротеиназы; меногарил; мербарон; метерелин; метиониназа; метоклопрамид; ингибитор MIF; мифепристон; милтефозин; миримостим; ошибочно спаренная двухцепочечная РНК; митогуазон; митолактол; аналоги митомицина; митонафид; митотоксиновый фактор роста фибробластов-сапорин; митоксантрон; мофаротен; молграмостим; моноклональное антитело, человеческий хорионический гонадотропин; монофосфорилипид A+sk клеточной стенки микобактерии; мопидамол; ингибитор гена множественной лекарственной устойчивости; терапия на основе множественного опухолевого супрессора 1; ипритовое противораковое средство; микапероксид В; экстракт клеточной стенки микобактерии; мирапапорон; N-ацетилдиналин; N-замещенные бензамиды; нафарелин; нагрестип; налоксон+пентазоцин; напавин; нафтерпин; нартограстим; недаплатин; неморубицин; неридроновая кислота; нейтральная эндопептидаза; нилутамид; низамидин; модуляторы азотного оксида; нитроксидный антиоксидант; нитруллин; Об-бензилгуанин; октреотид; оксикенон; олигонуклеотиды; онапристон; ондансетрон; ондансетрон; орацин; пероральный цитокинный индуктор; ормаплатин; осатерон; оксалиплатин; оксауномицин; паклитаксел; аналоги паклитаксела; производные паклитаксела; палауамин; пальмитоилтризоксин; памидроновая кислота; панацитриол; паномифен; парабактин; пазеллиптин; пегаспаргаза; пелдезин; пентозанполисульфат натрия; пентостатин; пентрозол; перфлуброн; перфосфамид; периллиловый спирт; феназиномицин; фенилацетат; ингибиторы фосфатазы; пицибанил; пилокарпина гидрохлорид; пирарубицин; пиритрексим; плацетин А; плацетин В; ингибитор активатора плазминогена; комплексы платины; соединения платины; триамин-платиновый комплекс; порфимер натрия; порфирамицин; преднизолон; пропилен бис-акридон; простагландин J2; протеасомные ингибиторы; иммуномодулятор на основе белка А; ингибитор протеинкиназы С; ингибиторы протеинкиназы С, микроводоросли; ингибиторы протеинтирозинфосфатазы; ингибиторы пуриновой нуклеозидфосфорилазы; пурпурины; пиразолоакридин; пиридокселированный конъюгат гемоглобина и полиоксиэтилена; антагонисты гаf; ралтитрексед; рамосетрон; ингибиторы фарнезилпротеинтрансферазы ras; ингибиторы ras; ингибитор gas-GAP; деметилированный ретеллиптин; рения Re 186 этидронат; ризоксин; рибозимы; RII ретинамид; роглетимид; рохитукин; ромуртид; рохинимекс; рубигинон B1; рубоксил; сафингол; сейнтопин; SarCNU; саркофитол А; сарграмостим; миметики Sdi 1; семустин; производное ингибитора старения 1; смысловые олигонуклеотиды; ингибиторы передачи сигнала; модуляторы передачи сигнала; одноцепочечный антигенсвязывающий белок; сизофиран; собузоксан; натрия борокапат; натрия фенилацетат; солверол; связывающий соматомедин белок; сонермин; спарфозовая кислота; спикамицин D; спирумустин; спленопентин; спонгистатин 1; скваламин; ингибитор стволовых клеток; ингибиторы деления стволовых клеток; стипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфинозин; суперактивный вазоактивный кишечный пептидный антагонист; сурадиста; сурамин; свейнзонин; синтетические глюкозаминогликаны; таллимустин; тамоксифена метиодид; тауромустин; тазаротен; текогалан натрия; тегафур; теллурапирил; ингибиторы теломеразы; темопорфин; темозоломид; тенипозид; тетрахлордекаоксид; тетразомин; талибластин; тиюоралин; тромбозептин; миметик тромбозептина; тималфазин; агонист рецептора тимопоэтина; тимотринан; тиреотропный гормон; олова этилэтиопурпурин; тирапазамин; титаноцена бихлорид; топсентин;

торемифен; тотипотентный фактор стволовых клеток; ингибиторы трансляции; третиноин; триацетилуридин; трицирибин; триметрексат; трипторелин; трописетрон; туростерид; ингибиторы тирозинкиназы; тирфостины; ингибиторы UBC; убенимекс; происходящий из мочеполювого синуса ингибирующий фактор роста; антагонисты рецепторов урокиназы; вапреотид; вариолин В; векторная система, эритроцитарная генная терапия; веларесол; верамин; вердинс; вертепорфин; винорелбин; винкалтин; витаксин®; ворозол; занотерон; зениплатин; зиласкорб и стимуламер зиностатино. Дополнительными противораковыми лекарственными средствами представляют собой 5-фторурацил и лейковорин. Эти два средства особенно применимы при использовании в способах, использующих талидомид и ингибитор топоизомеразы. Согласно некоторым вариантам осуществления однодоменный связывающий белок против MSLN применяется в сочетании с гемцитабином.

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

Способы обнаружения экспрессии мезотелина и диагностики мезотелин-ассоциированного рака.

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

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

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

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

В некоторых примерах раскрытых способов однодоменное антитело метят прямо.

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

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

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

В некоторых случаях антитело, которое связывается (например, специфически связывается) с мезотелином, непосредственно метится обнаруживаемой меткой. Согласно другому варианту осуществления антитело, которое связывается (например, специфически связывается) с мезотелином (первое антитело), является немеченым, и метят второе антитело или другую молекулу, которая может связываться с антителом, которое специфически связывается с мезотелином. Второе антитело выбирают таким, чтобы оно могло специфически связываться с конкретными формами и классами первого антитела. Например, если первое антитело представляет собой IgG ламы, тогда вторичное антитело может представлять собой антитело к IgG ламы. Другие молекулы, которые могут связываться с антителами, включают в себя, без ограничения, белок А и белок G, оба из которых имеются в продаже. Подходящие метки для антитела или вторичного антитела описаны выше и включают в себя различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, магнитные средства и радиоактивные материалы. Неограничивающие примеры подходящих ферментов включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу. Неограничивающие примеры подходящих комплексов простетических групп включают в себя стрептавидин/биотин и авидин/биотин. Неог-

раничивающие примеры подходящих флуоресцентных материалов включают в себя умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин. Неограничивающим иллюстративным люминесцентным материалом является люминол; неограничивающим иллюстративным магнитным средством является гадолиний, а неограничивающие иллюстративные радиоактивные метки включают в себя ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H .

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

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

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен набор для обнаружения мезотелина в биологическом образце, таком как образец крови или образец ткани. Например, чтобы подтвердить диагноз рака у субъекта, может быть выполнена биопсия для получения образца ткани для гистологического исследования. Альтернативно, может быть получен образец крови для обнаружения присутствия растворимого белка или фрагмента мезотелина. Наборы для обнаружения полипептида, как правило, содержат однодоменное антитело, согласно настоящему раскрытию, которое специфически связывается с мезотелином. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент антитела, такой как фрагмент scFv, домен VH или Fab, включен в набор. В следующем варианте осуществления антитело мечено (например, флуоресцентной, радиоактивной или ферментативной меткой).

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

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

Способы определения наличия или отсутствия маркера клеточной поверхности хорошо известны в настоящей области техники. Например, антитела могут быть конъюгированы с другими соединениями, включая в себя, без ограничения, ферменты, магнитные шарики, коллоидные магнитные шарики, гаптены, флуорохромы, соединения металлов, радиоактивные соединения или лекарственные средства. Антитела также могут быть использованы в иммуноанализах, таких как, без ограничения, радиоиммунологические анализы (RIA), ELISA или иммуногистохимические анализы. Антитела также можно использовать для сортировки флуоресцентно-активируемых клеток (FACS). FACS использует множество цветовых каналов, каналов обнаружения светорассеиванием под малым и тупым углом и каналов импеданса, среди других более сложных уровней обнаружения, для разделения или сортировки клеток (смотрите патент США № 5061620). Любое из однодоменных антител, которые связываются с мезотелином, как описано в настоящем изобретении, можно использовать в этих анализах. Таким образом, антитела можно использовать в обычном иммуноанализе, включая в себя, без ограничения, ELISA, RIA, FACS, тканевую иммуногистохимию, вестерн-блоттинг или иммунопреципитацию.

Примеры

Приведенные ниже примеры дополнительно иллюстрируют описанные варианты осуществления без ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1. Способность иллюстративного однодоменного антитела к MSLN по настоящему изобретению опосредовать уничтожение Т-клетками экспрессирующих мезотелин раковых клеток.

Иллюстративную последовательность однодоменного антитела к MSLN трансфицируют в клетки Expi293 (Invitrogen). Количество иллюстративного антитела к MSLN в кондиционированной среде из трансфицированных клеток Expi293 количественно оценивают с использованием прибора Octet с наконечниками с белком А и с использованием контрольного антитела к MSLN в качестве стандартной кривой.

Титры кондиционированной среды добавляют в анализы TDCC (Т-клеточно-опосредованные анализы цитотоксичности), чтобы оценить, способно ли однодоменное антитело к MSLN образовывать синапс между Т-клетками и клеточной линией рака яичника, экспрессирующей мезотелин, OVCAR8. Жизнеспособность клеток OVCAR8 измеряют через 48 ч. Видно, что иллюстративное однодоменное антитело к MSLN опосредует уничтожение Т-клеток.

Кроме того, видно, что активность TDCC иллюстративного однодоменного антитела к MSLN специфична в отношении клеток, экспрессирующих мезотелин, поскольку иллюстративное антитело не опосредует уничтожение Т-клетками клеток LNCaP, которые не экспрессируют мезотелин.

Пример 2. Способы оценки связывающей и цитотоксической активности нескольких нацеленных на MSLN триспецифических антигенсвязывающих белков, содержащих домен связывания MSLN, согласно настоящему раскрытию.

Производство белка.

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

Анализ цитотоксичности.

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

В настоящем исследовании титры кондиционированной среды добавляли в анализы TDCC (Т-клеточно-опосредованные анализы цитотоксичности), чтобы оценить, способно ли однодоменное антитело к MSLN образовывать синапс между Т-клетками и экспрессирующей мезотелин клеточной линией рака яичника, OVCAR8. Жизнеспособность клеток OVCAR8 измеряли через 48 ч. Было видно, что триспецифические белки опосредуют уничтожение Т-клетками. На фиг. 1 показан пример анализа жизнеспособности клеток с использованием исследуемых триспецифических белков 2A2 и 2A4. EC₅₀ для активности TDCC некоторых других исследуемых триспецифических белков перечислены в табл. I.

Таблица I

TDCC-активность нацеленных на MSLN триспецифических белков, содержащих связывающий MSLB белок в соответствии с настоящим изобретением

ТiTAC к MSLN	Средняя EC50 [M]
2A2	1,6E-12
2A4	1,9E-09
11F3	2,2E-12
5D4	1,0E-09
9H2	1,1E-12
5C2	1,5E-12
5G2	3,6E-09
10B3	1,4E-12
2F4	7,3E-13
2C2	9,5E-09
5F2	5,3E-12
7C4	1,0E-08
7F1	2,4E-12
5D2	1,4E-11
6H2	2,0E-09
2D1	5,2E-11
12C2	8,0E-13
3F2	2,4E-08
1H2	2,5E-08
6F3	8,2E-10
2A1	1,2E-09
3G1	4,0E-09
12D1	1,1E-09
5H1	5,9E-12
4A2	1,7E-09
3B4	1,8E-12
7H2	5,5E-12
9F3	>1E-7
9B1	>1E-7

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

Пример 3. ADCC-активность иллюстративного однодоменного антитела к MSLN по настоящему изобретению.

Настоящее исследование направлено на определение способности иллюстративного однодоменного антитела к MSLN по настоящему раскрытию опосредовать ADCC по сравнению с антителом сравнения к MSLN ламы, которое не содержит модификаций или замен последовательности как иллюстративное антитело по настоящему раскрытию. Оба антитела экспрессируются в виде многодоменных белков, которые содержат дополнительные домены иммуноглобулина.

Материалы.

Доноры подвергаются лейкофору, и NK-клетки выделяют из лейкоцитарной массы группой очистки клеток с использованием системы отрицательного отбора Miltenyi AutoMacs Pro. NK-клетки выдерживают в течение ночи при температуре 4°C на качалке, затем промывают, подсчитывают и ресуспендируют в количестве 4×10^6 клеток/мл в полной RPMI для использования в анализе ADCC.

Мишени. Мишени опухолевых клеток отбирают на основании экспрессии мезотелина. Мишени промывают и подсчитывают. 6×10^6 мишеней ресуспендируют в полной RPMI и метят в конечной концентрации 10 мкМ кальцеина (Sigma # C1359-00UL CALCEIN AM 4 MM в безводном ДМСО) в течение 40 мин при температуре 37°C, 5% CO₂. Клетки дважды промывают в PBS, ресуспендируют в полной RPMI и инкубируют при температуре 37°C, 5% CO₂ в течение 2 ч. После мечения клетки-мишени промывают, пересчитывают и ресуспендируют в количестве $0,2 \times 10^6$ клеток/мл в полной RPMI для использования в анализе ADCC.

Способы.

Анализ ADCC проводят в 96-луночном круглодонном планшете для культуры ткани (Corning 3799). Исследуемые белки титруют от 20 мкг/мл до 0,0002 мкг/мл путем переноса 10 мкл в 1000 мкл полной RPMI, содержащей 10% FCS (разведение 1:10). Добавляют меченые кальцеином мишени, 50 мкл, чтобы содержать 10000 клеток. Клетки-мишени и различные концентрации многодоменных белков, содержащих либо иллюстративное однодоменное антитело к MSLN, либо антитело сравнения, инкубируют в течение 40 мин при температуре 4°C, затем добавляют эффекторы NK-клетки, 50 мкл, чтобы содержать 100000 клеток (10:1 соотношение Е:Т). Культуры инкубируют в течение 4 ч при температуре 37°C, затем

отбирают супернатанты и анализируют высвобождение кальцеина путем измерения флуоресценции при 485-535 нм на счетчике Wallac Victor II 1420 Multilable HTS. Значения 100% лизиса определяют путем лизиса шести лунок меченых мишеней детергентом Igepal 630 (3 мкл на лунку), а значения спонтанного лизиса определяют путем измерения флуоресценции в супернатантах только от мишеней.

Статистический анализ.

Процент (%) специфического лизиса определяют как (флуоресценция образца)-(флуоресценция при спонтанном лизисе)/(100% лизис-флуоресценция при спонтанном лизисе). Спонтанный лизис определяют в лунках, содержащих только мишени, а 100%-ный лизис определяют в лунках, в которых мишени лизируют с помощью детергента IGEPAL CA 630. Необработанные данные вводят в электронную таблицу Excel со встроенными формулами для расчета % специфического лизиса и полученные в результате значения передают в графическую программу (GraphPad Prism), где данные преобразуются в график построенной по точкам кривой. Последующие анализы (вычисления линейной регрессии) выполняют в GraphPad для получения значений EC_{50} .

Результаты и обсуждение.

Эффекторные NK-клетки в лунках, инкубированные с многодоменным белком, содержащим антитело сравнения к MSLN, не способны опосредовать уничтожение меченных кальцеином клеток-мишеней, тогда как эффекторы в лунках с многодоменным белком, содержащим иллюстративное однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию, как измерено по специфической литической активности (% специфического лизиса), способны опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность.

Выводы.

Иллюстративное однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию опосредует значительно более высокий уровень уничтожения клеток-мишеней, экспрессирующих мезотелин, чем однодоменное антитело сравнения к MSLN ламы, без замен, модификации или гуманизации последовательности.

Пример 4. CDC-активность иллюстративного однодоменного антитела к MSLN по настоящему изобретению.

Для оценки противоопухолевой активности иллюстративного однодоменного антитела к MSLN согласно настоящему раскрытию против раковых клеток, исследовали цитотоксическую активность на моделях клеток A431/H9 и NCI-H226 в присутствии человеческой сыворотки в виде источник дополнения. Иллюстративное однодоменное антитело к MSLN экспрессируется в виде многодоменного белка, содержащего дополнительные домены иммуноглобулина. Видно, что многодоменный белок, содержащий иллюстративное однодоменное антитело к MSLN по настоящему раскрытию, проявляет сильную CDC-активность посредством уничтожения приблизительно 40% A431/H9 и более чем 30% клеточных линий мезотелиомы NCI-H226 и не проявляет активности в отношении мезотелин-отрицательной клеточной линии A431. Антитело сравнения ламы к MSLN, которое не имеет модификаций или замен последовательности как иллюстративное антитело по настоящему раскрытию, не проявляет активности при тех же концентрациях.

Чтобы проанализировать роль комплемента в противоопухолевой активности иллюстративного однодоменного антитела к MSLN, используют проточную цитометрию для определения связывания C1q с раковыми клетками, реагирующими с человеческими mAb к мезотелину, после хорошо установленного протокола для характеристики ритуксимаба, офатумумаба и других терапевтических mAb к CD20 (Pawluczko-wycz et al., J Immunol 183:749-758, 2009; Li et al., Cancer Res 68:2400-2408, 2008). Ранее было показано, что подобно MORAb-009, человеческое mAb HN1, специфическое к области I мезотелина клеточной поверхности (вдали от клеточной поверхности), не проявлял какой-либо CDC-активности против экспрессирующих мезотелин раковых клеток (Ho et al., Int J Cancer 128:2020-2030, 2011).

Однако видно, что комплемент C1q связывается с клетками A431/H9 или NCI-H226 в присутствии иллюстративного однодоменного антитела к MSLN. Напротив, не обнаружено связывания C1q в присутствии антитела сравнения ламы к MSLN. Кроме того, связывание C1q с раковыми клетками связано со связыванием клеток иллюстративного однодоменного антитела к MSLN зависимым от дозы способом. Эти результаты демонстрируют, что иллюстративное однодоменное антитело к MSLN демонстрирует улучшенную активность CDC по сравнению с антителом сравнения ламы к MSLN.

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

Пример 5. Нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий свя-

звующий MSLN домен (MH6T), в соответствии с настоящим изобретением направляет Т-клетки на уничтожение экспрессирующих MSLN раковых клеток яичника.

Анализ Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности человека (TDCC) использовали для измерения способности захватчиков Т-клеток, включающих в себя триспецифические молекулы, направлять Т-клетки на уничтожение опухолевых клеток (Nazarian et al. 2015. J Biomol Screen. 20:519-27). Клетки Саov3, использованные в этом анализе, конструировали для экспрессии люциферазы. Т-клетки от 5 различных здоровых доноров (донор 02, донор 86, донор 41, донор 81 и донор 34) и раковые клетки-мишени Саov3 смешивали вместе, и добавляли различные количества нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка, содержащего домен связывания MSLN (MH6T) (SEQ ID NO: 58), и смесь инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C. Клетки Саov3 и Т-клетки также инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C с контрольной триспецифической молекулой GFP TriTAC (SEQ ID NO: 59), которая нацелена на GFP. Через 48 ч оставшиеся жизнеспособные опухолевые клетки количественно определяли с помощью люминесцентного анализа.

Было отмечено, что нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий связывающий MSLN домен (MH6T), мог направлять Т-клетки от всех 5 здоровых доноров на уничтожение раковых клеток-мишеней Саov3 (как показано на фиг. 2), тогда как контрольная молекула GFP TriTAC не была способна направить Т-клетки от любого из 5 здоровых доноров на уничтожение клеток Саov3 (также показано на фиг. 2).

Дальнейший анализ с использованием того же протокола, который описан выше, проводили с использованием клеток OVCAR3. Было отмечено, что нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий связывающий MSLN домен (MH6T), способен направлять Т-клетки от всех 5 здоровых доноров на уничтожение раковых клеток-мишеней OVCAR3 (как показано на фиг. 3), тогда как контрольная молекула GFP TriTAC не была способна направлять Т-клетки от любого из 5 здоровых доноров на уничтожение клеток OVCAR3 (также показано на фиг. 3).

Значения EC_{50} для уничтожения клеток-мишеней, экспрессирующих MSLN, перечислены в табл. II.

Таблица II

Значения EC_{50} для направленного нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен MH6T) уничтожения экспрессирующих MSLN клеточных линий рака яичника Т-клетками от 5 различных здоровых доноров. Типичные графики необработанных данных представлены на фиг. 2 и 3

	Значения EC_{50} (M)				
	Донор 02	Донор 86	Донор 41	Донор 81	Донор 35
Саov3	6,0E-13	6,8E-13	3,9E-13	5,9E-13	4,6E-13
Саov4	7,3E-12	1,1E-11	3,7E-12	4,7E-12	2,2E-12
OVCAR3	1,6E-12	2,5E-12	1,4E-12	1,6E-12	1,3E-12
OVCAR8	2,2E-12	3,2E-12	1,4E-12	1,9E-12	1,7E-12

Пример 6. Нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий связывающий MSLN домен (MH6T) согласно настоящему раскрытию, направляет Т-клетки на уничтожение клеток, экспрессирующих MSLN, но не клеток, которые не экспрессируют MSLN.

В этом анализе Т-клетки от здорового донора инкубировали с раковыми клетками-мишенями, которые экспрессируют MSLN (клетки Саov3, клетки Саov4, клетки OVCAR3 и клетки OVCAR8) или раковыми клетками-мишенями, которые не экспрессируют MSLN (клетки NCI-H510A, клетки MDAPCa2b). Каждая из клеток-мишеней, использованных в этом исследовании, была разработана для экспрессии люциферазы. Различные количества нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка, содержащего домен MH6T (SEQ ID NO: 58), добавляли к смеси Т-клеток и раковых клеток-мишеней, перечисленных выше. Смесь инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C. Через 48 ч оставшиеся жизнеспособные клетки-мишени количественно оценивали с использованием люминесцентного анализа.

Было отмечено, что нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий домен MH6T, способен направлять Т-клетки на уничтожение экспрессирующих MSLN раковых клеток-мишеней (т.е. клеток Саov3, Саov4, OVCAR3 и OVCAR8, как показано на фиг. 4). Однако направленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий домен MH6T, не был способен направлять Т-клетки на уничтожение неэкспрессирующих MSLN раковых клеток-мишеней (клетки MDAPCa2b и NCI-H510A), также показанных на фиг. 4.

Значения EC_{50} для уничтожения экспрессирующих MSLN раковых клеток приведены в табл. III.

Таблица III

Значения EC_{50} для направленного нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т) уничтожения Т-клетками экспрессирующих MSLN линий раковых

клеток

Происхождение опухоли	Клеточная линия	EC_{50} (пМ)	Сайты MSLN на клетку
Яичник	Caov3	0,6	51262
	Caov4	7,3	101266
	OVCAR3	1,6	40589
	OVCAR8	2,2	40216
	SKOV3	3,6	10617
Поджелудочная железа	Hs766T	7,8	5892
	CaPan2	3,2	27413
	HPaFII	15	17844
NSCLC	NCI-H596	1,5	103769
	NCI-H292	3,8	5977
	NCI-H1563	2,6	17221
Мезотелиома	NCI-H2052	8,0	Не определены
	NCI-H2452	2,3	Не определены
Сконструированные (неопухолевые)	HEK293, экспрессирующие MSLN человека	0,9	128091
	HEK293, экспрессирующие MSLN яванского макака	0,7	140683

Пример 7. Нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий связывающий MSLN белок (МН6Т) в соответствии с настоящим изобретением, направляет Т-клетки от яванского макака на уничтожение клеточных линий рака яичника человека.

В этом анализе мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC; Т-клетки представляют собой компонент PBMC) от донора яванского макака смешивали с раковыми клетками-мишенями, которые экспрессируют MSLN (клетки CaOV3 и клетки OVCAR3) и к смеси добавляли различные количества нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т, SEQ ID NO: 58) и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C. Параллельно смесь PBMC яванского макака и экспрессирующих MSLN клеток, как указано выше, инкубировали с различными количествами контрольной молекулы TriTAC GFP TriTAC (SEQ ID NO: 59), которая нацелена на GFP, в течение 48 ч при температуре 37°C. Раковые клетки-мишени, использованные в этом анализе, были сконструированы для экспрессии люциферазы. Через 48 ч оставшиеся жизнеспособные клетки-мишени количественно определяли с использованием люминесцентного анализа.

Было отмечено, что нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок (содержащий домен МН6Т) был способен эффективно направлять PBMC яванского макака на уничтожение экспрессирующих MSLN клеток (т.е. Caov3 и OVCAR), как показано на фиг. 5, тогда как контрольная молекула GFP TriTAC не была способна направлять PBMC яванского макака на уничтожение клеток (также показано на фиг. 5). Значения EC_{50} для нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) составляли 2,9 пМ для клеток OVCAR3 и 3,0 пМ для клеток Caov3, которые существенно не отличались от значений EC_{50} , наблюдаемых с Т-клетками человека, как показано в табл. II.

Пример 8. Нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок (содержащий домен МН6Т) направлял уничтожение экспрессирующих MSLN клеток мезотелиомы NCI-H2052 Т-клетками в присутствии или в отсутствие человеческого сывороточного альбумина.

Целью настоящего исследования было оценить, влияло ли связывание с человеческим сывороточным альбумином (HSA) посредством нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т; SEQ ID NO: 58) на способность белка направлять Т-клетки на уничтожение экспрессирующих MSLN клеток. Клетки мезотелиомы NCI-H2052, использованные в этом исследовании, были сконструированы для экспрессии люциферазы. Т-клетки от здорового донора и экспрессирующие MSLN клетки (NCI-H2052) смешивали и в смесь добавляли различные количества нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т). Смесь инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C в присутствии или в отсутствие HSA. Смесь клеток NCI-H2052 и Т-клеток также инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C с контрольной триспецифической молекулой GFP TriTAC (SEQ ID NO: 59), которая нацелена на GFP, в присутствии или в отсутствие HSA. Через 48 ч оставшиеся жизнеспособные клетки-мишени количественно определяли с ис-

пользованием люминесцентного анализа.

Было отмечено, что нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок (содержащий домен МН6Т) был способен эффективно направлять Т-клетки на уничтожение клеток NCI-H2052 (как показано на фиг. 6) в присутствии или в отсутствие HSA, тогда как контрольная молекула GFP TriTAC не смогла это сделать (также показано на фиг. 6). Также было отмечено, что в присутствии HSA значение EC_{50} для уничтожения клеток увеличивалось приблизительно в 3,2 раза (как показано в табл. IV).

Дополнительные анализы TDCC проводили с нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т) в присутствии или в отсутствие HSA в концентрации 15 мг/мл, с дополнительными линиями клеток, экспрессирующих MSLN, и значения EC_{50} представлены в табл. IV.

Таблица IV

Значения EC_{50} для направленного нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т) уничтожения экспрессирующих MSLN раковых клеток Т-клетками в присутствии или в отсутствие HSA

Клеточная линия	EC_{50} без HSA (пМ)	EC_{50} с HSA (пМ)	Сдвиг EC_{50} (разы)
OVCAR8	2,7	8,7	3,2
SKOV3	3,9	11	2,8
NCI-H2052	8,0	26	3,2
NCI-H24522	2,3	6,3	2,7
Caov3	0,8	3,6	4,3
OVCAR3	1,6	3,8	2,4

Пример 9. Т-клетки от 4 разных доноров секретируют TNF- α в присутствии нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) и экспрессирующих MSLN клеток Caov4.

Раковые клетки-мишени CaOv4, использованные в этом анализе, были сконструированы для экспрессии люциферазы. В этом анализе Т-клетки от 4 различных здоровых доноров (донор 02, донор 86, донор 35 и донор 81) и клетки Caov4 смешивали вместе и добавляли различные количества нацеленных на MSLN триспецифических антигенсвязывающих белков (содержащих домен МН6Т; SEQ ID NO: 58) и смесь инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C. Клетки Caov4 и Т-клетки также инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C с контрольной триспецифической молекулой GFP TriTAC (SEQ ID NO: 59), которая нацелена на GFP. Кондиционированную среду из анализа TDCC собирали за 48 ч до измерения жизнеспособности раковых клеток-мишеней с использованием анализа люминесценции. Концентрацию TNF- α в кондиционированной среде измеряли с использованием набора для анализа Al-phaLISA (Perkin Elmer).

Было отмечено, что TNF- α секретируется в среду в присутствии клеток Caov4 и нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т), но не в присутствии клеток Caov4 и контрольной молекулы GFP TriTAC, как показано на фиг. 7.

Кроме того, эффективное уничтожение наблюдали с Т-клетками от всех 4 здоровых доноров в присутствии нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т), но не в присутствии контрольной молекулы TriFP TF GFP. Анализы TDCC также проводили для дополнительных линий клеток, экспрессирующих MSLN (клетки Caov3, клетки OVCAR3 и клетки OVCAR8), и наблюдалась сходная экспрессия TNF- α . Значения EC_{50} для индуцированной нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т) экспрессии TNF- α представлена в табл. V. Однако, когда анализ проводили с использованием раковых клеток, которые не экспрессируют MSLN (клетки NCI-H510A или клетки MDAPCa2b), не было обнаружено направленной нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т) секреции TNF- α (данные не показаны). Таким образом, это исследование продемонстрировало, что нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок (содержащий домен МН6Т) способен активировать Т-клетки в присутствии экспрессирующих MSLN раковых клеток-мишеней.

Таблица V

Значения EC_{50} для индуцированной нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т) экспрессии TNF- α Т-клетками от 4 различных доноров Т-клеток и 4 различных линий клеток, экспрессирующих MSLN

	Значения EC_{50} TNF α (M)			
	Содержащий МН6Т триспецифический антигенсвязывающий белок Донор 2	Содержащий МН6Т триспецифический антигенсвязывающий белок Донор 86	Содержащий МН6Т триспецифический антигенсвязывающий белок Донор 35	Содержащий МН6Т триспецифический антигенсвязывающий белок Донор 81
Caov3	5,2E-12	5,4E-12	5,9E-12	4,9E-12
Caov4	7,2E-12	6,0E-12	5,5E-12	5,5E-12
OVCAR3	9,2E-12	4,0E-12	1,7E-11	8,9E-12
OVCAR8	1,3E-11	9,1E-12	5,1E-12	5,0E-12

Пример 10. Активация экспрессии CD69 на Т-клетках от 4 разных доноров в присутствии нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) и экспрессирующих MSLN клеток OVCAR8.

Клетки OVCAR8, использованные в этом анализе, были сконструированы для экспрессии люциферазы. В этом анализе Т-клетки от 4 различных здоровых доноров (донор 02, донор 86, донор 35 и донор 81) и клетки OVCAR8 смешивали вместе и добавляли различные количества нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т; SEQ ID NO: 58), и смесь инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C. Клетки OVCAR8 и Т-клетки также инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C с контрольной триспецифической молекулой GFP TriTAC (SEQ ID NO: 59), которая нацелена на GFP. Через 48 ч Т-клетки собирали и экспрессию CD69 на Т-клетках измеряли проточной цитометрией.

Экспрессию CD69 обнаруживали на Т-клетках от всех 4 здоровых доноров в присутствии клеток OVCAR8 и нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т), но не в присутствии отрицательного контроля GFP TriTAC и клеток OVCAR8, как показано на фиг. 8. Анализы TDCC также проводили для дополнительных клеток, экспрессирующих MSLN (клетки Caov3, клетки OVCAR3 и клетки OVCAR8), и наблюдали аналогичную экспрессию CD69. Значения EC_{50} для индуцированной нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т) активации CD69 в клетках Caov3 и клетках OVCAR8, представлены в табл. VI.

Таблица VI

Значения EC_{50} для активации экспрессии CD69 на Т-клетках от 4 различных доноров в присутствии нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) и экспрессирующих MSLN клеток OVCAR8 или клеток Caov3

	Caov3	OVCAR8
Таблица EC_{50}	CD69 (M)	CD69 (M)
Донор 35	~ 1,5E-13	1,4E-13
Донор 2	2,5E-13	4,2E-13
Донор 81	2,5E-13	2,5E-13
Донор 86	3,7E-13	3,7E-13

Когда анализ проводили с использованием раковых клеток, которые не экспрессируют MSLN (клетки NCI-H510A или клетки MDAPCa2b), не наблюдали индуцированной нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т) активации CD69 (данные не показаны). Таким образом, это исследование продемонстрировало, что нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок (содержащий домен МН6Т) способен активировать Т-клетки в присутствии экспрессирующих MSLN раковых клеток-мишеней.

Пример 11. Измерение связывания нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) с линиями клеток, экспрессирующих/не экспрессирующих MSLN.

Для этого исследования определенные раковые клетки-мишени, которые экспрессируют MSLN (клетки Caov3, клетки CaOV4, клетки OVCAR3 и клетки OVCAR8) и некоторые раковые клетки, которые не экспрессируют MSLN (клетки MDAPCa2b и клетки NCI-H510A), инкубировали с нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т; SEQ ID NO: 58) или контрольной молекулой GFP TriTAC (SEQ ID NO: 59). После инкубации клетки промывали для удаления несвязанных молекул TriTAC МН6Т или GFP и затем инкубировали со вторичным антителом, которое способно распознавать анти-альбуминовый домен в молекулах TriTAC, конъюгированных с Alexa Fluor 647. Связывание нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) или белка GFP TriTAC с клетками, экспрессирующими MSLN или не экспрессирующими MSLN, измеряли проточной цитометрией.

Наблюдалось устойчивое связывание нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего

щего белка (содержащего домен МН6Т) с клеточными линиями, которые экспрессируют MSLN (Caov3, Caov4, OVCAR3 и OVCAR8), как видно на фиг. 9А (на верхней левой панели показано связывание нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка, содержащего домен МН6Т, с клетками Caov3; на верхней правой панели показано связывание нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка, содержащего домен МН6Т, с клетками Caov4, на нижней левой панели показано связывание нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка, содержащего домен МН6Т, с клетками OVCAR3; на нижней правой панели показано связывание нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка, содержащего домен МН6Т, с клетками OVCAR8); и, как видно на фиг. 9В, связывание не наблюдалось в клеточных линиях, которые не экспрессируют MSLN (на левой панели показано отсутствие связывания нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) с клетками MDAPCa2b, а на правой панели показано отсутствие связывания нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) с клетками NCI-H510A). Кроме того, никакого связывания не наблюдалось, когда клетки любого из типов инкубировали с молекулой GFP TriTAC, как показано на обеих фиг. 9А и 9В.

Пример 12. Измерение связывания нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) с Т-клетками доноров.

Для этого исследования Т-клетки от 4 здоровых доноров инкубировали с нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т; SEQ ID NO: 58) или буфером в качестве отрицательного контроля. После инкубации клетки промывали для удаления несвязанного нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т), и затем инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с Alexa Fluor 647, которое было способно распознавать домен анти-альбумина в нацеленном на MSLN триспецифическом антигенсвязывающем белке (содержащем домен МН6Т). Связывание измеряли проточной цитометрией.

Надежное связывание наблюдалось в Т-клетках от всех четырех доноров, обработанных нацеленным на MSLN триспецифическим антигенсвязывающим белком (содержащим домен МН6Т), как показано на фиг. 10 (на верхней левой панели показано связывание нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) с Т-клетками донора 2; на верхней правой панели показано связывание нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) с Т-клетками донора 35; на нижней левой панели показано связывание нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) с Т-клетками донора 41; на нижней правой панели показано связывание нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) с Т-клетками донора 81).

Пример 13. Ингибирование роста опухоли у мышей, которым вводили нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок (содержащий домен МН6Т).

Для этого исследования 10^7 клеток NCI-H292 и 10^7 PBMC человека совместно имплантировали подкожно двум группам мышей NCG (8 мышей в группе). Через 5 дней мышам в одной группе инъектировали нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок (содержащий домен МН6Т; SEQ ID NO: 58) ежедневно в течение 10 дней (дни 5-14) в дозе 0,25 мг/кг; а мышам в другой группе вводили контрольный наполнитель. Объемы опухолей измеряли через каждые несколько дней, и исследование прекращали на 36 день. Значительное ингибирование роста опухоли наблюдалось у мышей, которым инъектировали нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок (содержащий домен МН6Т), по сравнению с теми, кому вводили контроль-наполнитель, как показано на фиг. 11.

Пример 12. Фармакокинетика нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) у яванских макаков.

Для этого исследования двум яванским макакам инъектировали дозу 10 мг/кг нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т; SEQ ID NO: 58), внутривенно, и образцы сыворотки собирали в различные моменты времени после инъекции. Количество нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) в сыворотке крови измеряли с использованием антиидиотипических антител, распознающих нацеленный на MSLN триспецифический антигенсвязывающий белок (содержащий домен МН6Т), в электрохимическом анализе. На фиг. 12 показан график содержания в сыворотке нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т) в различные моменты времени. Затем эти данные использовали для расчета фармакокинетических свойств нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т), как показано в табл. VII.

Таблица VII

Фармакокинетические параметры для нацеленного на MSLN триспецифического антигенсвязывающего белка (содержащего домен МН6Т)

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

Таблица последовательностей

SEQ ID NO: 1	9B1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSVRGMAWYRQAGNNRAL VATMNPDGFPNYADAVKGRFTISWDIAENTVYLMNSLNSEDTTVY YCNSGPYWGGGTQVTVSS
SEQ ID NO: 2	9F3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIPISEQMGWYRQAPGKQRE LVAALTSGGRANYADSVKGRFTISGDVVRNMVYLMNSLKPEDTAI YYCSAGRFGDYAQRSGMDYWGKGLTVTVSS
SEQ ID NO: 3	7H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAFSGTTYTFDLMSWYRQAPGKQRT VVASISSDGRTSYADSVRGRFTISGENGKNTVYLMNSLKLIEDTAV YYCLGQRSQVRAFWGGGTQVTVSS
SEQ ID NO: 4	3B4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSGTSNINNMWYRQAPGKERE LVAVITRGGYAIYLDVAVKGRFTISRDNANNAIYLEMNSLKPEDTAV YVCNADRVEGTSGGPQLRDYFGGTQVTVSS
SEQ ID NO: 5	4A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFGINAMGWYRQAPGKQRE LVAVLSRGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAENTVSLQMN'LLKPEDTAV YFCNARTYTRHDYWGGTQVTVSS
SEQ ID NO: 6	12D1	QVRLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASISAFRLMSVRWYRQDPSKQRE WVATIDQLGRNTYADSVKGRFAISKDSTRNTVYLMNMLRPEDTAV YYCNAGGGPLGSRWLGRHWGGGTQVTVSS
SEQ ID NO: 7	3G1	QVRLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGRPFISINTMGWYRQAPGKQRE LVASISSSGDFTYTDVSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAV YYCNARTYLPRRFGSWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 8	2A1	QVQPVESGGGLVQPGGSLRLSCVVGSDFTEDAMAWYRQASGKERE SVAFVSKDGKRIYLDVVRGRFTISRDIKKTVYLMNDNLKPEDTG VYYCNSAPGAARNYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 9	6F3	QVQPVESGGGLVQPGGSLRLSCVVGSDFTEDAMAWYRQASGKERE SVAFVSKDGKRIYLDVVRGRFTISRDIYKKTVYLMNDNLKPEDTG VYYCNSAPGAARNVWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 10	1H2	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTGLTVTVSS
SEQ ID NO: 11	3F2	QVQIVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGLTYSIVAVGWYRQAPGKERE MVADISPVGNTNYADSVKGRFTISKENAKNTVYLMNSLKPEDTAV YYCHIVRGWLDERPGGPIVYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 12	12C2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGLTFGVYGMWFRQAPGKQRE WVASHTSTGYVYYRDSVKGRFTISRDNASTVYLMNSLKPEDTAI YYCKANRGSYEYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 13	2D1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASTSSINSMWYRQAPGKQREP VAVITDRGSTSYADSVKGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAIY TCHVIADWRGYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 14	6H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTLRYAMGWFRQAPGKERQ FVAAISRSGGTTRYSDSVKGRFTISRDNANTFYLMNNLRPDSTA VYYCNVRRRGWGRITLEYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 15	5D2	QVQLGESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSPNAMIWHRQAPGKQRE PVASINSSGSTNYGDSVKGRFTVSRDIVKNTMYLMNSLKPEDTAV YYCSYSDFRRGTQYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 16	7C4	QVQLVESGGGLVPSGGSLRLSCAASGATSAITNLGWYRRAPGQVRE MVARISVREDKEDYEDSVKGRFTISRDNATQNLVYLMNNLQPHDTA IYYCGAQRWGRGPGTTWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 17	5F2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFRIRVMRWYRQAPGTERD LVAVISGSSTYYADSVKGRFTISRDNANTLYLMNNLKPEDTAVY YCNADDSGIARDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 18	2C2	QVQLVESGGGLVQAGESRRLSCAVSGDTSKFKAVGWYRQAPGAQRE LLAWINNSGVGNTAESVKGRFTISRDNANTVYLMNRLTPEDTDV YYCRFYRRFGINKNYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 19	5G2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFGNKPMGWYRQAPGKQRE LVAVISSDGGSTRYAALVKGRFTISRDNANTVYLMESLVAEDTA VYYCNALRTYYLNDPVVFSWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 20	9H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKERE LVAFISSGGSTNVRDSVKGRFSVSRDSAKNIVYLMNSLTPEDTAV YYCNTYIPLRGTLHDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 21	5D4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTDRITTMGWYRQAPGKQRE LVATISNRGTSNYANSVKGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAV YYCNARKWGRNYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 22	2A4	QVQLVESGGGLVQARGSLRLSCTASGRTIGINDMAWYRQAPGNQRE LVATITKGGTTDYADSVDRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAV YYCNTKRREWAKDFEYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 23	7F1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASAIGSINSMWYRQAPGKQREP VAVITDRGSTSYADSVKGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAIY TCHVIADWRGYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 24	5C2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWFRQAPGEERE LVATINRGGSTNVRDSVKGRFSVSRDSAKNIVYLMNRLKPEDTAV YYCNTYIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 25	2F4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTTSTTFSINSMWYRQAPGNQREP VAVITNRRGTTSTYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMDSLKPEDTAIY TCHVIADWRGYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 26	2A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLTSLCAASGSTFSIRAMRWYRQAPGTERD LVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVY YCNADTIGTARDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 27	11F3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTSTIDTMYWHRQAPGNERE LVAYVTSRGTSNVADSVKGRFTISRDNKNTAYLQMNLSLKPEDTAV YYCSVRTTSTYPVDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 28	10B3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKERE LVAFISSGGSTNVRDSVKGRFSVSRDSAKNIVYLQMNLSLKPEDTAV YYCNTYIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 29	5H1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYWYRQAPGKQRE LVARISGRGVVDYVESVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAV YYCAVASYWGGGTQVTVSS
SEQ ID NO: 30	МН1 (гуманизирован ная версия 5H1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYWYRQAPGKQRE LVARISGRGVVDYVESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAV YYCAVASYWGGTLVTVSS
SEQ ID NO: 31	МН2 (гуманизированная версия 5H1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYWYRQAPGKGLE WVSRIISGRGVVDYVESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAV YYCAVASYWGGTLVTVSS
SEQ ID NO: 32	МН3 (гуманизированная версия 10B3)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKERE LVAFISSGGSTNVRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAV YYCNTYIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 33	МН4 (гуманизированная версия 10B3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKERE LVAFISSGGSTNVRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAV YYCNTYIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 34	МН5 (гуманизированная версия 10B3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKGLE WVSFIISGGSTNVRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAV YYCNTYIPYGGTLHDFWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 35	МН6-GG (гуманизированная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFSIRAMRWYRQAPGTERD LVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVY YCNADTIGTARDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 36	МН7-GG (гуманизированная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFSIRAMRWYRQAPGKERE LVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVY YCNADTIGTARDYWGQGTQVTVSSGG
SEQ ID NO: 37	МН8-GG (гуманизированная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFSIRAMRWYRQAPGKGLE WVSVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVY YCNADTIGTARDYWGQGTQVTVSSGG

SEQ ID NO: 38	MH9 (гуманизированная версия 11F3)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTSTIDTMYWHRQAPGNERE LVAYVTSRGTSNVADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCSVRTTSYPVDFWQGGLVTVSGG
SEQ ID NO: 39	MH10 (гуманизированная версия 11F3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSTIDTMYWHRQAPGKERE LVAYVTSRGTSNVADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCSVRTTSYPVDFWQGGLVTVSS
SEQ ID NO: 40	MH11 (гуманизированная версия 11F3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSTIDTMYWVRQAPGKGLE WVS YVTSRGTSNVADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCSVRTTSYPVDFWQGGLVTVSS
SEQ ID NO: 41	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	ESGGGLV
SEQ ID NO: 42	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	LSC
SEQ ID NO: 43	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	GRF
SEQ ID NO: 44	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	VTVSS
SEQ ID NO: 45	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	QLVESGGG
SEQ ID NO: 46	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	GGSLRLSCAASG
SEQ ID NO: 47	Иллюстративная консервативная	ASG

	область в связывающем MSLN домене	
SEQ ID NO: 48	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	RQAPG
SEQ ID NO: 49	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
SEQ ID NO: 50	Иллюстративная консервативная область в связывающем MSLN домене	WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 51	Иллюстративная CDR1 связывающего MSLN домена	GRTFSVRGMA
SEQ ID NO: 52	Иллюстративная CDR2 связывающего MSLN домена	INSSGSTNYG
SEQ ID NO: 53	Иллюстративная CDR3 связывающего MSLN домена	NAGGGPLGSR
SEQ ID NO: 54	Иллюстративная CDR1 связывающего MSLN домена	GGDWSANFMY
SEQ ID NO: 55	Иллюстративная CDR2 связывающего MSLN домена	ISSGGSTNVR
SEQ ID NO: 56	Иллюстративная CDR3 связывающего MSLN домена	NADTIGTARD
SEQ ID NO: 57	Последовательность белка мезотелина	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNIISSLSRQLLGFPCEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESA EVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGPPYPGPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSI PQGIVA AWRQRSS

		RDPQSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWE LEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESV IQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALKALLEVNKGHEMSPQAPRR PLPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSV PPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQS FLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLG PHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLTLGLGLQGGIPNGYLVLD LSMQEALSGTPCLLGGPGPVLTVLALLLASTLA
SEQ ID NO: 58	МН6Т (иллюстративный связывающий MSLN домен)	QVQLVESGGGVVQAGGSLTSLCAASGSTFISIRAMRWYRQAPGTERD LVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCNADTIGTARDYWGQGTITVTVSS
SEQ ID NO: 59	Триспецифическая молекула, содержащая связывающий GFP домен	QVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKERE WVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLYLQMNSLKPEDTA VYYCNVNVGFYEWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPP GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS QGTITVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTI VTVSSGGGGSGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGETPARFSGSLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
SEQ ID NO: 60	МН6 (иллюстративная гуманизированная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFISIRAMRWYRQAPGTERD LVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCNADTIGTARDYWGQGTITVTVSS
SEQ ID NO: 61	МН7 (иллюстративная гуманизированная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFISIRAMRWYRQAPGKERE LVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCNADTIGTARDYWGQGTITVTVSS
SEQ ID NO: 62	МН8 (гуманизированная версия 2A2)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFISIRAMRWVRQAPGKGLE WVSVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCNADTIGTARDYWGQGTITVTVSS

Последовательности CDR1 для различных иллюстративных связывающих MSLN доменов по настоящему изобретению.

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN домен	Последовательность CDR1
63	9B1	GRTFSVRGMA
64	9F3	GSIPSIEQMG
65	7H2	GTTYTFDLMS
66	3B4	GSTSNINMR
67	4A2	GSTFGINAMG
68	12D1	ISAFRLMSVR
69	3G1	GRPFSINTMG
70	2A1	GSDFTEDAMA
71	6F3	GSDFTEDAMA
72	1H2	GFTFSSFGMS
73	3F2	GLTYSIVAVG
74	12C2	GLTFGVYGME
75	2D1	TTSSINSMS
76	6H2	GRTLRYAMG
77	5D2	GSIFSPNAMI
78	7C4	GATSAITNLG
79	5F2	GSTFRIVMR
80	2C2	GDTSKFKAVG
81	5G2	GSTFGNKPMG
82	9H2	GSTSSINTMY
83	5D4	GRTDRITTMG
84	2A4	GRTIGINDMA
85	7F1	AIGSINSMS
86	5C2	GSTSSINTMY
87	2F4	TTFSINSMS
88	2A2	GSTFSIRAMR
89	11F3	GRTSTIDTMY
90	10B3	GSTSSINTMY
91	MH1	GGDWSANFMY
92	MH2	GGDWSANFMY
93	MH3	GSTSSINTMY
94	MH4	GSTSSINTMY
95	MH5	GSTSSINTMY
96	MH6	GSTFSIRAMR
97	MH7	GSTFSIRAMR
98	MH8	GSTFSIRAMR
99	MH9	GRTSTIDTMY
100	MH10	GRTSTIDTMY
101	MH11	GRTSTIDTMY

Последовательности CDR2 для различных иллюстративных связывающих MSLN доменов по настоящему изобретению.

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN домен	Последовательность CDR2
102	9B1	TMNPDGFPNYADAVKGRFT
103	9F3	ALTSGGRANYADSVKGRFT
104	7H2	SISSDGRTSYADSVRGRFT
105	3B4	VITRGGYAIYLDVAVKGRFT
106	4A2	VISRGGSTNYADSVKGRFT
107	12D1	TIDQLGRNTYADSVKGRFA
108	3G1	SISSSGDFTYTDVSVKGRFT
109	2A1	FVSKDGKRILYLDVSVRGRFT
110	6F3	FVSKDGKRILYLDVSVRGRFT
111	1H2	SISGSGSDTLYADSVKGRFT
112	3F2	DISPVGNTNYADSVKGRFT
113	12C2	SHTSTGYVYYRDSVKGRFT
114	2D1	VITDRGSTSYADSVKGRFT
115	6H2	AISRSSGGTTRYSDSVKGRFT
116	5D2	SINSSGSTNYGDSVKGRFT
117	7C4	RISVREDKEDYEDSVKGRFT
118	5F2	VISGSSTYYADSVKGRFT
119	2C2	WINNSGVGNTAESVKGRFT
120	5G2	VISSDGGSTRYAALVKGRFT
121	9H2	FISSGGSTNVRDSVKGRFS
122	5D4	TISNRGTSNYANSVKGRFT
123	2A4	TITKGGTTDYADSVKGRFT
124	7F1	VITDRGSTSYADSVKGRFT
125	5C2	TINRGGSTNVRDSVKGRFS
126	2F4	VITNRGTTSYADSVKGRFT
127	2A2	VIYGSSTYYADAVKGRFT
128	11F3	YVTSRGTSNVADSVKGRFT
129	10B3	FISSGGSTNVRDSVKGRFS
130	MH1	RISGRGVVDYVESVKGRFT
131	MH2	RISGRGVVDYVESVKGRFT
132	MH3	FISSGGSTNVRDSVKGRFT
133	MH4	FISSGGSTNVRDSVKGRFT
134	MH5	FISSGGSTNVRDSVKGRFT
135	MH6	VIYGSSTYYADAVKGRFT
136	MH7	VIYGSSTYYADAVKGRFT
137	MH8	VIYGSSTYYADAVKGRFT
138	MH9	YVTSRGTSNVADSVKGRFT
139	MH10	YVTSRGTSNVADSVKGRFT
140	MH11	YVTSRGTSNVADSVKGRFT

Последовательности CDR3 для различных иллюстративных связывающих MSLN доменов по настоящему изобретению.

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN домен	Последовательность CDR3
141	9B1	GPY
142	9F3	GRFKGDYAQRSGMDY
143	7H2	QRSGVRAF
144	3B4	DRVEGTSGGPQLRDY
145	4A2	RTYTRHDY
146	12D1	GGGPLGSRWLRGRH
147	3G1	RRTYLPRRFGS
148	2A1	APGAARNY
149	6F3	APGAARNV
150	1H2	GGSLSRSS
151	3F2	VRGWLDERP GPPIVY
152	12C2	NRGSY EY
153	2D1	IADWRGY
154	6H2	RRRGWGRTLEY
155	5D2	SDFRRGTY
156	7C4	QRWGRGP GTT
157	5F2	DDSGIARDY
158	2C2	YRRFGINKNY
159	5G2	LRTYYLNDPVVFS
160	9H2	YIPLRGT LH DY
161	5D4	RKWGRNY
162	2A4	KREWAKDFEY
163	7F1	IADWRGY
164	5C2	YIPYGGTLHDF
165	2F4	IADWRGY
166	2A2	DTIGTARDY
167	11F3	RTTSYPVDF
168	10B3	YIPYGGTLHDF
169	MH1	ASY
170	MH2	ASY
171	MH3	YIPYGGTLHDF
172	MH4	YIPYGGTLHDF
173	MH5	YIPYGGTLHDF
174	MH6	DTIGTARDY
175	MH7	DTIGTARDY
176	MH8	DTIGTARDY
177	MH9	RTTSYPVDF
178	MH10	RTTSYPVDF
179	MH11	RTTSYPVDF

Последовательности каркасной области 1 (f1) для различных иллюстративных связывающих MSLN доменов.

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN домен	Каркас 1
180	9B1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
181	9F3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
182	7H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAFS
183	3B4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
184	4A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
185	12D1	QVRLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
186	3G1	QVRLVESGGGLVQAGESLRLSCAAS
187	2A1	QVQPVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS
188	6F3	QVQPVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS
189	1H2	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
190	3F2	QVQIVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
191	12C2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAAS
192	2D1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
193	6H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
194	5D2	QVQLGESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
195	7C4	QVQLVESGGGLVPSGGSLRLSCAAS
196	5F2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
197	2C2	QVQLVESGGGLVQAGESRRLSCAVS
198	5G2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
199	9H2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
200	5D4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
201	2A4	QVQLVESGGGLVQARGSLRLSCTAS
202	7F1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
203	5C2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
204	2F4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTTS
205	2A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAAS
206	11F3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
207	10B3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
208	MH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
209	MH2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
210	MH3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
211	MH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
212	MH5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
213	MH6	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAAS
214	MH7	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS
215	MH8	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS
216	MH9	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
217	MH10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
218	MH11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

Последовательности каркасной области 2 (f2) для различных иллюстративных связывающих MSLN доменов.

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN домен	Каркас 2
219	9B1	WYRQAGNNRALVA
220	9F3	WYRQAPGKQRELVA
221	7H2	WYRQAPGKQRTVVA
222	3B4	WYRQAPGKERELVA
223	4A2	WYRQAPGKQRELVA
224	12D1	WYRQDPSKQREWVA
225	3G1	WYRQAPGKQRELVA
226	2A1	WYRQASGKERESVA
227	6F3	WYRQASGKERESVA
228	1H2	WVRQAPGKGLEWVS
229	3F2	WYRQAPGKEREMVA
230	12C2	WFRQAPGKQREWVA
231	2D1	WYRQAQGKQREPVA
232	6H2	WFRQAPGKERQFVA
233	5D2	WHRQAPGKQREPVA
234	7C4	WYRRAPGQVREMVA
235	5F2	WYRQAPGTERDLVA
236	2C2	WYRQAPGAQRELLA
237	5G2	WYRQAPGKQRELVA
238	9H2	WYRQAPGKERELVA
239	5D4	WYRQAPGKQRELVA
240	2A4	WYRQAPGNQRELVA
241	7F1	WYRQAPGKQREPVA
242	5C2	WFRQAPGEERELVA
243	2F4	WYRQAPGNQREPVA
244	2A2	WYRQAPGTERDLVA
245	11F3	WHRQAPGNERELVA
246	10B3	WYRQAPGKERELVA
247	MH1	WYRQAPGKQRELVA
248	MH2	WVRQAPGKGLEWVS
249	MH3	WYRQAPGKERELVA
250	MH4	WYRQAPGKERELVA
251	MH5	WVRQAPGKGLEWVS
252	MH6	WYRQAPGTERDLVA
253	MH7	WYRQAPGKERELVA
254	MH8	WVRQAPGKGLEWVS
255	MH9	WHRQAPGNERELVA
256	MH10	WHRQAPGKERELVA
257	MH11	WVRQAPGKGLEWVS

Последовательности каркасной области 3 (f3) для различных иллюстративных связывающих MSLN доменов.

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN домен	Каркас 3
258	9B1	ISWDIAENTVYVYLMNSLNSEDITVYYCNS
259	9F3	ISGDNVRNMVYVYLMNSLKPEDTAIYYCSA
260	7H2	ISGENGKNTVYVYLMNSLKLIEDTAVYYCLG
261	3B4	ISRDNANNAIYLEMNSLKPEDTAVYYCNA
262	4A2	ISRDNAENTVSLQMNTLKPEDTAVYFCNA
263	12D1	ISKDSTRNTVYVYLMNMLRPEDTAVYYCNA
264	3G1	ISRDNAKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCNA
265	2A1	ISRDIDKKTVYVYLMNDLKPEDTGVYYCNS
266	6F3	ISRDYKKTVYVYLMNDLKPEDTGVYYCNS
267	1H2	ISRDNAKTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
268	3F2	ISKENAKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCHI
269	12C2	ISRDNAKSTVYVYLMNSLKPEDTAIYYCKA
270	2D1	ISRDNAKNTVYVYLMNSLKPEDTAIYTCHV
271	6H2	ISRDNAANTFYVYLMNNLRPDDTAVYYCNV
272	5D2	VSRDIVKNTMYVYLMNSLKPEDTAVYYCSY
273	7C4	ISRDNTQNLVYVYLMNNLQPHDTAIYYCGA
274	5F2	ISRDNAKNTLYLQMNMLKPEDTAVYYCNA
275	2C2	ISRDNAKNTVYVYLMNRLTPEDTDVYYCRF
276	5G2	ISRDNAKNTVYVYLMESLVAEDTAVYYCNA
277	9H2	VSRDSAKNIVYVYLMNSLTPEDTAVYYCNT
278	5D4	ISRDNAKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCNA
279	2A4	ISRDNAKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCNT
280	7F1	ISRDNAKNTVYVYLMNSLKPEDTAIYTCHV
281	5C2	VSRDSAKNIVYVYLMNRLKPEDTAVYYCNT
282	2F4	ISRDNARNTVYVYLMDSLKPEDTAIYTCHV
283	2A2	ISRDNAKNTLYLQMNMLKPEDTAVYYCNA
284	11F3	ISRDNAKNTAYLQMNNSLKPEDTAVYYCSV
285	10B3	VSRDSAKNIVYVYLMNSLKPEDTAVYYCNT
286	MH1	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAV
287	MH2	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAV
288	MH3	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNT
289	MH4	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNT
290	MH5	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNT
291	MH6	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA
292	MH7	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA
293	MH8	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA
294	MH9	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSV
295	MH10	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSV
296	MH11	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSV

Последовательности каркасной области 4 (f4) для различных иллюстративных связывающих MSLN доменов.

ID No. последовательности	Иллюстративный связывающий MSLN домен	Каркас 4
297	9B1	WGQGTQVTVSS
298	9F3	WGKGLVTVSS
299	7H2	WGQGTQVTVSS
300	3B4	FGQGTQVTVSS
301	4A2	WGQGTQVTVSS
302	12D1	WGQGTQVTVSS
303	3G1	WGQGTQVTVSS
304	2A1	WGQGTQVTVSS
305	6F3	WGQGTQVTVSS
306	1H2	QGTLLVTVSS
307	3F2	WGQGTQVTVSS
308	12C2	WGQGTQVTVSS
309	2D1	WGQGTQVTVSS
310	6H2	WGQGTQVTVSS
311	5D2	WGQGTQVTVSS
312	7C4	WGQGTQVTVSS
313	5F2	WGQGTQVTVSS
314	2C2	WGQGTQVTVSS
315	5G2	WGQGTQVTVSS
316	9H2	WGQGTQVTVSS
317	5D4	WGQGTQVTVSS
318	2A4	WGQGTQVTVSS
319	7F1	WGQGTQVTVSS
320	5C2	WGQGTQVTVSS
321	2F4	WGQGTQVTVSS
322	2A2	WGQGTQVTVSS
323	11F3	WGQGTQVTVSS
324	10B3	WGQGTQVTVSS
325	MH1	WGQGLVTVSS
326	MH2	WGQGLVTVSS
327	MH3	WGQGLVTVSS
328	MH4	WGQGLVTVSS
329	MH5	WGQGLVTVSS
330	MH6	WGQGLVTVSSGG
331	MH7	WGQGLVTVSSGG
332	MH8	WGQGLVTVSSGG
333	MH9	WGQGLVTVS
334	MH10	WGQGLVTVSS
335	MH11	WGQGLVTVSS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Однодоменный связывающий мезотелин белок, причем указанный белок включает следующую формулу: f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4, причем r1 представляет собой CDR1; r2 представляет собой CDR2 и r3 представляет собой CDR3; причем f1, f2, f3 и f4 представляют собой каркасные остатки, и причем CDR1 содержит последовательность GSTFSIRAMR (SEQ ID NO: 88 и 96-98), CDR2 содержит последовательность VIYGSSTYYADAVKGRFT (SEQ ID NO: 127, 135-137) и CDR3 содержит последовательность DTIGTARDY (SEQ ID NO: 166, 174-176).

2. Однодоменный связывающий мезотелин белок по п.1, причем указанный белок связывается с эпитопом мезотелина, причем указанный эпитоп расположен в области I, содержащей аминокислотные остатки 296-390 из SEQ ID NO: 57, области II, содержащей аминокислотные остатки 391-486 из SEQ ID NO: 57, или области III, содержащей аминокислотные остатки 487-598 из SEQ ID NO: 57.

3. Однодоменный связывающий мезотелин белок по п.1, причем указанный белок содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 26, 35-37, 58 и 60-62.

4. Однодоменный связывающий мезотелин белок по п.1, причем f1 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 205 и 208-218.

5. Однодоменный связывающий мезотелин белок по п.1, причем f2 содержит последовательность,

представленную в любой из SEQ ID NO: 235, 244 и 247-257.

6. Однодоменный связывающий мезотелин белок по п.1, причем f3 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 274, 283 и 286-296.

7. Однодоменный связывающий мезотелин белок по п.1, причем f4 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 313, 322 и 325-335.

8. Применение однодоменного связывающего мезотелин белка по любому из пп.1-7 в качестве лекарственного средства для лечения или ослабления пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, которое экспрессирует мезотелин, у нуждающегося в этом субъекта.

9. Применение по п.8, причем лекарственное средство предназначено для введения субъекту в дозировке вплоть до 10 мг/кг.

10. Применение по п.8, причем лекарственное средство предназначено для введения субъекту один раз в неделю, два раза в неделю, через день или один раз в три недели.

11. Применение по п.8, причем субъект представляет собой человека.

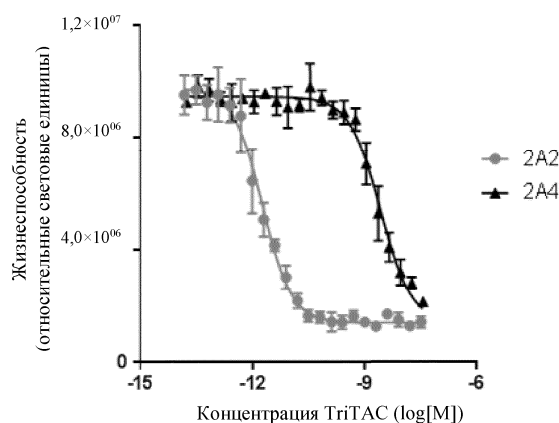
12. Применение по п.8, причем лекарственное средство предназначено для введения субъекту в комбинации с антителом, химиотерапевтическим средством, гормоном, радиотерапией, генной терапией, иммунотерапией, противодиарейным средством, противорвотным средством, анальгетиком, опиоидом или нестероидным противовоспалительным средством.

13. Применение по п.8, причем однодоменный связывающий мезотелин белок избирательно связывается с экспрессирующими мезотелин опухолевыми клетками.

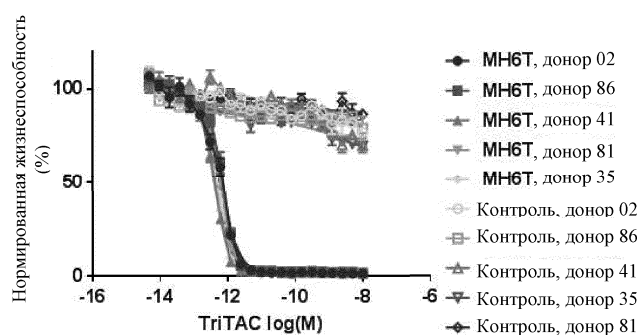
14. Применение по п.8, причем опухолевое заболевание включает в себя заболевание с солидной опухолью.

15. Применение по п.14, причем заболевание с солидной опухолью включает в себя мезотелиому, рак легкого, рак желудка, рак яичника или тройной негативный рак молочной железы.

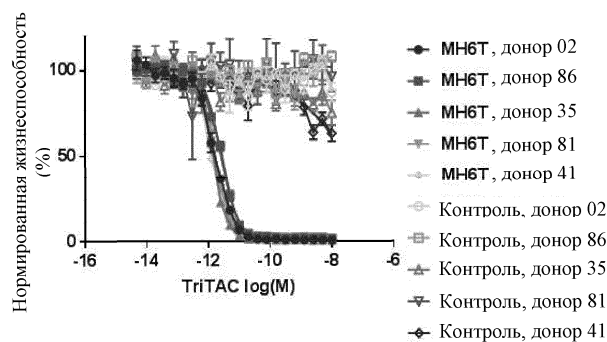
16. Применение по п.15, причем заболевание с солидной опухолью является метастатическим.



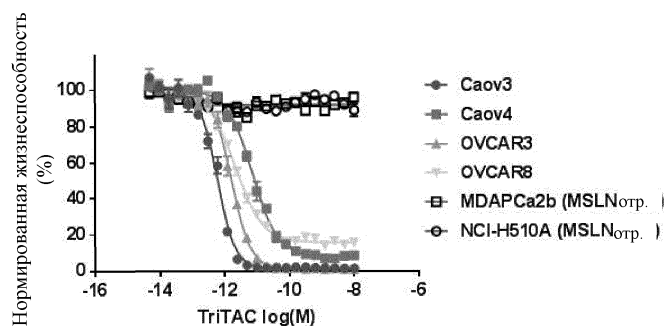
Фиг. 1



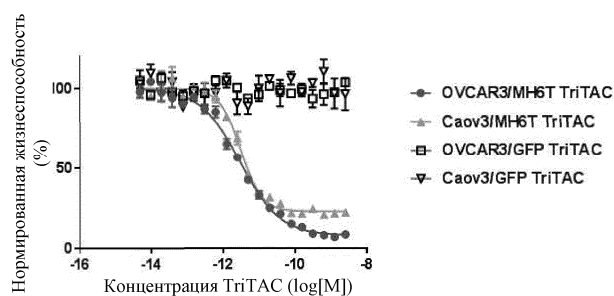
Фиг. 2



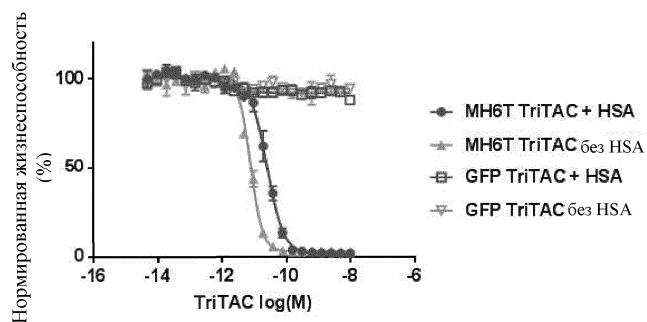
Фиг. 3



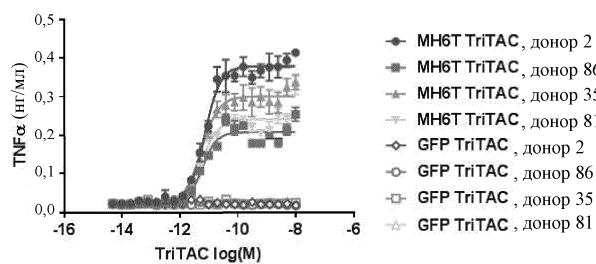
Фиг. 4



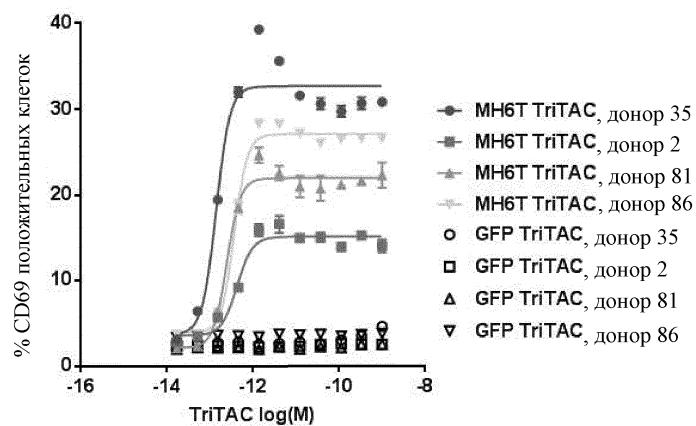
Фиг. 5



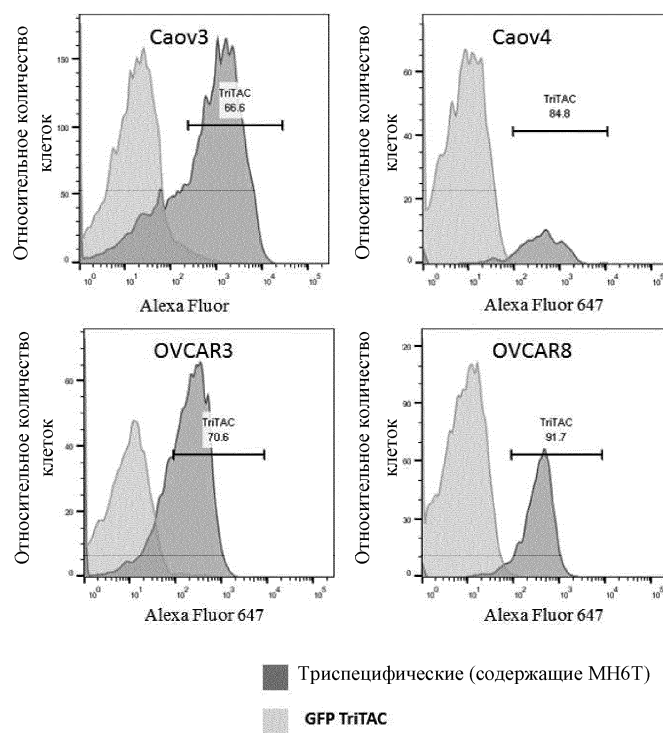
Фиг. 6



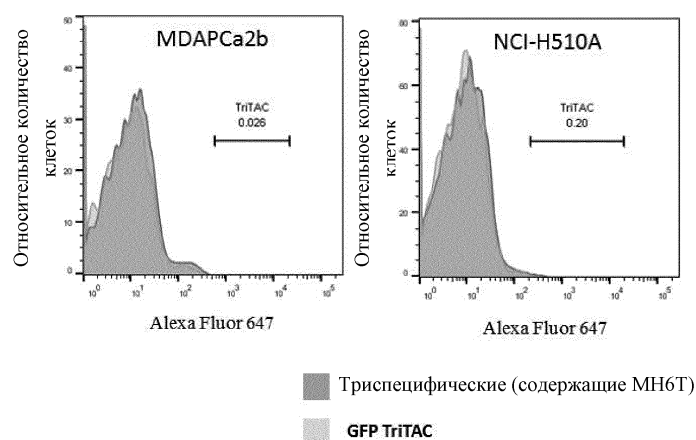
Фиг. 7



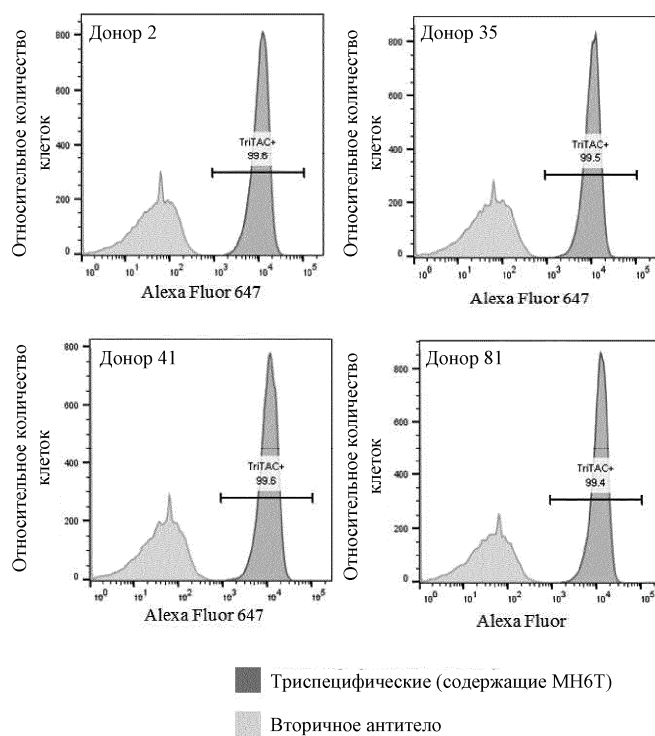
Фиг. 8



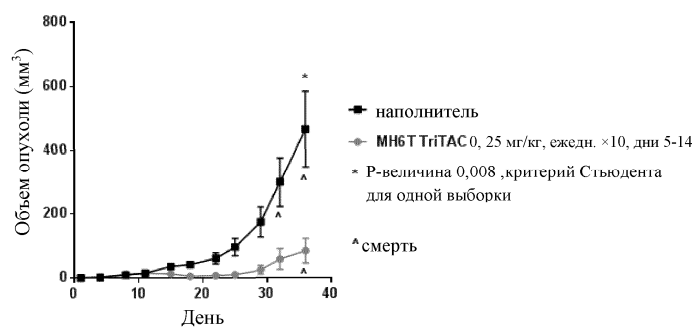
Фиг. 9А



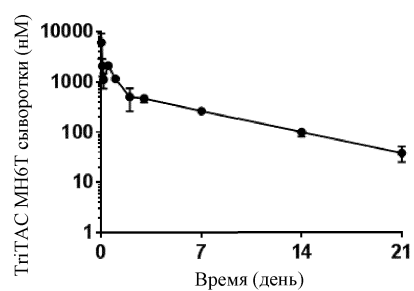
Фиг. 9В



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

