



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.07.05

(21) Номер заявки
201400709

(22) Дата подачи заявки
2012.11.12

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) МОЛЕКУЛА БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА

(31) 61/577,327

(32) 2011.12.19

(33) US

(43) 2016.08.31

(86) PCT/EP2012/072364

(87) WO 2013/092001 2013.06.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИНИММУН ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Янг Гундрам, Дурбен Михаэл, Гросс-Ховест Лудгер (DE)

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Путинцев
А.И., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

(56) WO-A1-2011047180
WO-A1-2009018386
WO-A2-2007109254
WO-A2-2011025964
WO-A2-2006031994

LU D. ET AL.: "Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 267, № 2, 15 September 2002 (2002-09-15), p. 213-226,

XP004375842, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00148-5, abstract, fig. 1, p. 224, left-hand column, last paragraph

SEIFERT O. ET AL.: "The IgM CH2 domain as covalently linked homodimerization module for the generation of fusion proteins with dual specificity", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB, vol. 25, № 10, 17 September 2012 (2012-09-17), p. 603-612, XP002689666, ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/PROTEIN/GZS059 [retrieved on 2012-09-17], abstract, p. 612, left-hand column, last paragraph, fig. 2, 3, p. 606, left-hand column, last paragraph - p. 608, left-hand column, paragraph 1, p. 611, left-hand column

WO-A2-2006116260

BAUDINO LUCIE ET AL.: "Impact of a three amino acid deletion in the CH2 domain of murine IgG1 on Fc-associated effector functions", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 181, № 6, 15 September 2008 (2008-09-15), p. 4107-4112, XP002590015, ISSN: 0022-1767, abstract

BAUDINO LUCIE ET AL.: "Crucial role of aspartic acid at position 265 in the CH2 domain for murine IgG2a and IgG2b Fc-associated effector functions", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 181, № 9, 1 November 2008 (2008-11-01), p. 6664-6669, XP002590016, ISSN: 0022-1767, abstract

(57) Изобретение относится к области биотехнологии и предусматривает получение молекулы антитела, способной к ограничиваемой клеткой-мишенью активации иммунных клеток. Молекула антитела включает Fab-фрагмент, содержащий первый сайт связывания для первого антигена, одноцепочечный Fv-фрагмент, содержащий второй сайт связывания для второго антигена, и C_{H2}-домен иммуноглобулина IgG1. Fab-фрагмент и одноцепочечный Fv-фрагмент связаны через домен C_{H2}. Как минимум три аминокислотных остатка C_{H2}-домена удалены или мутированы путем замены на другую аминокислоту. Три аминокислотных остатка домена C_{H2} состоят из положения последовательности 233 и по меньшей мере двух аминокислот, выбранных из группы, состоящей из положения последовательности 228, 230, 231, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 297, 327 и 330. Кроме того, аминокислотные остатки в положениях 226 и 229 удалены или мутированы посредством замены на другую аминокислоту. Первый сайт связывания или второй сайт связывания связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью, и связывается с молекулой специфического рецептора Т-клетки или NK-клетки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к молекуле биспецифического антитела, а также к способу ее продуцирования, применения и молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу биспецифического антитела. В частности, изобретение предусматривает получение молекулы антитела, способной к опосредованию ограниченной клеткой-мишенью активации иммунных клеток.

Уровень техники

Моноклональные антитела к комплексу антиген-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) и CD3 способны эффективно активировать Т-клетки. Однако данная активация требует мультимеризации антитела через его Fc-фрагмент на поверхности клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы, что часто также обеспечивает дополнительные сигналы активации Т-клеток (Davis, L., Vida, R. and Lipsky, P.E., Regulation of human T lymphocyte mitogenesis by antibodies to CD3, *J. Immunol.* (1986), 137:3758-3767).

Биспецифические антитела, которые распознают как антиген на клетках-мишенях (например, FLT3 или CD19 на лейкозных клетках, CSPG4-антиген на клетках меланомы или EGFR на клетках глиобластомы), так и комплекс антиген-специфического Т-клеточного рецептора и CD3 (TCR/CD3-комплекс), подобным образом способны активировать Т-клетки (Jung, G., Ledbetter, J.A., Muller-Eberhard, H.J., Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* (1987), 84:4611-4615; Jung, G., Eberhard, H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, *Immunol. Today* (1988), 9:257-260; Jung, G., Brandl, M., Eisner, W., Fraunberger, P., Reifemberger, G., Schlegel, U., Wiestler, O.D., Reulen, H.J., Wilmanns, W. Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ T-cell activation and therapeutic efficacy, *Int. J. Cancer.* (2001), 91:225-30) и в дополнение к этому фокусировать активированные клетки на клетке-мишени (Staerz, U.D., Kanagawa, O., and Bevan, M.J., Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells, *Nature* (1985), 314:628-631; Perez, P., Hoffman, R.W., Shaw, S., Bluestone, J.A., and Segal, D.M. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody, *Nature* (1985), 316:354-356; Jung, G., Honsik, C.J., Reisfeld, R.A. and Muller-Eberhard, H.J. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83:4479-4483, 1986). В результате происходит опосредованный Т-клеткой лизис опухолевых клеток. Антитела, агонистические к костимулирующей Т-клетку молекуле, такой как CD28, усиливают активацию Т-клетки, опосредованную анти-CD3. Такие костимулирующие антитела особенно эффективны, если они также сформированы в биспецифическом формате (Grosse-Hovest, L., Hartlapp, I., Marwan, W., Brem, G., Rammensee, H.G., and Jung, G., A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing, *Eur. J. Immunol.* (2003), 33:1334-1340). В любом случае мы считаем безусловным требованием для терапевтического применения биспецифических антител, характеризующихся специфичностью в отношении CD3, чтобы связывание с Fc-рецепторами было исключено (Jung, G., Eberhard, H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, *Immunol. Today* (1988), 9:257-260; Jung, G., Freimann, U., Von Marshall, Z., Reisfeld, R.A., Wilmanns, W., Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments, *Eur. J. Immunol.* (1991), 21:2431-2435). Такое связывание с Fc-рецепторами привело бы к активации Т-клеток in vivo, что случается независимо от связывания с антигеном-мишенью в любом месте, где могут находиться экспрессирующие Fc-рецептор клетки, например, внутри всей гематопоетической, лимфатической и ретикулоэндотелиальной системы. Исходя из опыта подобная активация Т-клеток ведет к системной активации Т-клеток, сопровождаемой синдромом выброса цитокинов - весьма неблагоприятной побочной реакции при терапевтическом применении цитокинов или антител, активирующих Т-клетки (Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Yang, J.C., Aebersold, P.M., Linehan, W.M., Seipp, C.A., and White, D.E., Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients, *Ann. Surg.* (1989), 210:474-484; Tibben, J.G., Boerman, O.C., Massuger, L.F., Schijf, C.P., Claessens, R.A., and Corstens, F.H., Pharmacokinetics, biodistribution and biological effects of intravenously administered bispecific monoclonal antibody OC/TR F(ab')₂ in ovarian carcinoma patients, *Int. J. Cancer* (1996), 66:477-483; Kroesen, B.J., Buter, J., Sleijfer, D.T., Janssen, R.A., van der Graaf, W.T., The, T.H., de, L.L., Mulder, N.H., Phase I study of intravenously applied bispecific antibody in renal cell cancer patients receiving subcutaneous interleukin 2, *Br. J. Cancer* (1994), 70:652-661). Таким образом, целью при форматировании биспецифических антител CD3 должно быть предотвращение Fc-опосредованной системной активации Т-клеток и обеспечение за счет этого возможности ограниченной активации клеток-мишеней, которая зависит исключительно от связывания части-мишени биспецифического антитела с соответствующим антигеном-мишенью (Jung, G., Eberhard, H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, *Immunol. Today* (1988), 9:257-260; Jung, G., Freimann, U., Von Marshall, Z., Reisfeld, R.A., Wilmanns, W., Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments, *Eur. J. Immunol.* (1991), 21:2431-2435). Из сказанного выше следует, что при выборе антигена-мишени необходимо максимально возможно следить за экспрессией, ограниченной патогенными клетками. За счет этого активация непатогенными клетками с сопутствующим выбросом цитокинов удерживается на максимально возможном низком уровне.

Подобные соображения распространяются на случаи конструирования биспецифических антител,

содержащих агонистические эффекторные антитела, связывающиеся с триггерными рецепторами на иммунных клетках, отличных от Т-клеток, такими как CD16, экспрессирующимися на NK-клетках. Так или иначе Fc-опосредованное связывание антител с Fc-рецепторами следует избегать, следуя доводам, приведенным выше относительно Т-клеток.

Биспецифическое антитело, клиническая разработка которого наиболее продвинулась сегодня, представляет собой Blinatumomab (Micromet, Inc., Роквил, Мэриленд, США) - биспецифическое одноцепочечное антитело с CD19×CD3-специфичностью, обладающее замечательной терапевтической активностью против клеток лимфомы и лейкемии (Bargou, R. et al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, *Science* (2008), 321:974-977; Topp, M.S. et al., Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, *J. Clin. Oncol.* (2011), 29:2493-2498).

Поскольку одноцепочечный формат не содержит какой-либо участок Fc-части, это антитело представляет собой клетку-мишень, ограниченную в истолкованном выше смысле, т.е. оно активирует Т-клетки лишь в присутствии клеток-мишеней, экспрессирующих CD19 (Brischwein, K. et al., Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class, *J. Immunother.* (2007), 30:798-807).

Однако CD19 также экспрессируется на нормальных В-клетках таким образом, что несмотря на ограниченность клетки-мишени после терапевтического применения происходит системный выброс цитокинов, вызывающий значительную цитотоксичность уже при суточных дозах около 100 мкг (Bargou, R., et al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, *Science* (2008), 321:974-977; Topp, M.S. et al., Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, *J. Clin. Oncol.* (2011), 29:2493-2498).

Более того, одноцепочечный формат имеет такие недостатки, как

(i) молекулярная масса около 50 кДа относительно низка и связана с коротким периодом полураспада сыворотки;

(ii) антитела этого формата легко агрегируют; и

(iii) их трудно получать обычной ферментацией (Grosse-Hovest, L., Hartlapp, I., Marwan, W., Brem, G., Rammensee, H.G., Jung, G., A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing, *Eur. J. Immunol.* (2003), 33:1334-1340; Grosse-Hovest, L. et al., Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* (2004), 101:6858-6863).

Таким образом, целью настоящего изобретения является получение молекулы биспецифического антитела, которая преодолевала бы по меньшей мере некоторые из вышеуказанных недостатков и которую можно было бы широко применять в терапии, помимо прочих, для строго ограничиваемой клеткой-мишенью активации иммунных клеток, как было описано выше.

Краткое описание изобретения

Первым аспектом настоящего изобретения является рекомбинантная молекула биспецифического антитела. Рекомбинантная молекула биспецифического антитела состоит из Fab-фрагмента, одноцепочечного Fv-фрагмента и C_{H2}-домена иммуноглобулина. Fab-фрагмент включает первый сайт связывания первого антигена. Одноцепочечный Fv-фрагмент включает второй сайт связывания второго антигена. Fab-фрагмент и одноцепочечный Fv-фрагмент сопряжены друг с другом через C_{H2}-домен. В типовых вариантах реализации происходит замена остатков цистеина, образующих дисульфидные связи между тяжелыми цепями (C226 и C229 в иммуноглобулинах (IgG) человека).

Вторым аспектом настоящего изобретения является тетрамерная молекула антитела. Тетрамерная молекула антитела содержит димер молекулы антитела по первому аспекту. Димер в целом определяется связью между остатками цистеина двух молекул антитела по первому аспекту, а именно между цистеинами в шарнирной области. Такими остатками цистеина обычно являются сохранившиеся аминокислоты (C226 и C229 в иммуноглобулинах IgG человека).

Третьим аспектом настоящего изобретения является рекомбинантная молекула биспецифического антитела. Рекомбинантная молекула биспецифического антитела включает Fab-фрагмент, содержащий первый сайт связывания первого антигена, одноцепочечный Fv-фрагмент, содержащий второй сайт связывания второго антигена, C_{H2}-домен иммуноглобулина и C_{H3}-домен иммуноглобулина. Fab-фрагмент и одноцепочечный Fv-фрагмент связаны через C_{H2}-домен/C_{H3}-домен. По меньшей мере один аминокислотный остаток C_{H2}-домена, способный опосредствовать связывание с Fc-рецепторами, отсутствует или мутирован. В типовых вариантах осуществления этого аспекта происходит замена по меньшей мере одного из остатков цистеина, формирующих межцепочечные дисульфидные связи (C226 и C229 в IgG-антителах человека). В некоторых вариантах реализации такие молекулы могут содержать дополнительные модификации в области C_{H3}, которые предотвращают димеризацию с гомотипическими C_{H3}-доменами.

Четвертым аспектом настоящего изобретения является тетрамерная молекула антитела. Тетрамер-

ная молекула антитела состоит из димера рекомбинантной молекулы биспецифического антитела по третьему аспекту. Димер, как правило, определяется связью между сохранившимися цистеинами в шарнирной области (C226 и C229 в IgG-антителах человека).

Пятым аспектом настоящего изобретения является еще одна рекомбинантная молекула биспецифического антитела. Эта молекула антитела включает Fab-фрагмент, содержащий первый сайт связывания первого антигена, одноцепочечный Fv-фрагмент, содержащий второй сайт связывания второго антигена, C_{H2} -домен иммуноглобулина и C_{H3} -домен иммуноглобулина. Fab-фрагмент и одноцепочечный Fv-фрагмент сопряжены друг с другом через C_{H2} -домен и C_{H3} -домен. По меньшей мере один остаток цистеина этой молекулы антитела, способный формировать дисульфидный мостик димеризации, отсутствует или мутирован.

Шестым аспектом настоящего изобретения является молекула нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты кодирует молекулу антитела по одному из первого, второго, третьего, четвертого или пятого аспектов.

Седьмым аспектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция. Фармацевтическая композиция включает молекулу антитела по одному из первого, второго, третьего, четвертого и пятого аспектов.

Восьмым аспектом настоящего изобретения является способ лечения болезни. Способ включает применение молекулы антитела по одному из первого, второго, третьего, четвертого и пятого аспектов. В целом молекулу антитела вводят пациенту, нуждающемуся в этом.

Девятым аспектом настоящего изобретения является клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по шестому аспекту.

Десятым аспектом настоящего изобретения является способ продуцирования молекулы антитела по одному из первого, второго, третьего, четвертого или пятого аспектов. Способ включает экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу антитела, в условиях, допускающих экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты.

Эти аспекты изобретения будут более полно раскрыты с учетом представленного ниже описания, чертежей и неограничивающих примеров.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 схематично изображены варианты реализации молекул биспецифического антитела согласно изобретению.

На фиг. 1A изображена бивалентная молекула, включающая Fab-фрагмент, C_{H2} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент. Молекула антитела имеет главную цепь, в которой C_{H2} -домен своим N-концом сопряжен с C_{H1} - и V_H -доменами тяжелой цепи Fab-фрагмента, а C-концом - с одноцепочечным Fv-фрагментом (формат bsFc-1/2).

На фиг. 1B изображена двухвалентная молекула антитела с главной цепью, в которой C_{H2} -домен сопряжен с легкой цепью Fab-фрагмента, т.е. главная цепь которой содержит V_L - и C_L -домен, шарнирную область, C_{H2} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент.

На фиг. 1C показана бивалентная молекула антитела, в которой главная цепь включает V_L - и C_{H1} -домен, шарнирную область, C_{H2} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент. Вторая цепь с более низкой массой включает V_H - и C_L -домен. Таким образом, Fab-фрагмент молекулы антитела на фиг. 1C не является "классическим (имеющим естественное происхождение)", в котором переменная область легкой и тяжелой цепей сцеплена с соответствующей константной областью (соответственно C_L и C_{H1}), а представляет собой "гибридный" Fab-фрагмент, в котором переменная область сцеплена с константной областью "противоположной" цепи, т.е. V_H -домен сцеплен с C_L -доменом, а V_L -домен сцеплен с C_{H1} -доменом.

На фиг. 1D изображена бивалентная молекула антитела, в главной цепи которой C_{H2} -домен связан с C_L - и V_H -доменом. Вторая цепь более низкой массы включает V_L - и C_{H1} -домен. Таким образом, молекула антитела на фиг. 1D содержит "гибридный Fab-фрагмент" (включающий первый сайт связывания), который также содержится в молекуле на фиг. 1C.

На фиг. 1E изображена бивалентная молекула антитела с конфигурацией как на фиг. 1A, в которой аминокислоты в C_{H2} -домене и/или шарнирная область модифицированы (обозначено "X", как показано на фиг. 1O, формат bsFc^{ko}-1/2). Подобным образом, такие модификации могут быть включены в молекулы, изображенные на фиг. 1B-1D. В молекулах, изображенных на фиг. 1A-1E, происходит замена остатков цистеина, формирующих межцепочечные дисульфидные связи (C226 и C229 в антителах IgG человека), для предотвращения образования димеров (●).

На фиг. 1F в качестве иллюстрации изображен вариант реализации с тетравалентной молекулой, которая является димером конфигурации, изображенной на фиг. 1A. Подобная молекула может быть также продуцирована в конфигурациях Fab, изображенных на фиг. 1B-1D с модификациями и без модификаций Fc, изображенных на фиг. 1E. Перечень этих модификаций приведен на фиг. 1P.

На фиг. 1G в качестве иллюстрации изображен вариант реализации с тетравалентной молекулой, которая является димером конфигурации, включающей Fab-фрагмент, C_{H2} -домен, C_{H3} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент. Аминокислоты в C_{H2} -домене и в шарнирной области модифицированы (X), как резюмировано в таблице на фиг. 1P. Две главные цепи антитела включают V_H - и C_{H1} -домен, шарнирную

область, C_{H2} -домен, C_{H3} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент (формат bsFc^{ko}-1). Подобные молекулы также могут быть построены в конфигурациях Fab, изображенных на фиг. 1A-1E. Во всех этих молекулах димеры определяются остатками цистеина в шарнирной области (C226 и C229 в антителах IgG человека).

На фиг. 1H изображена тетравалентная молекула, являющаяся димером конфигурации, включающей Fab-фрагмент, C_{H2} -домен, C_{H3} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент. В пределах Fab-фрагмента две главные цепи антитела включают V_H - и C_L -домен.

На фиг. 1I показано тетравалентное антитело с общей структурой, как на фиг. 1G. В отличие от варианта реализации по фиг. 1G, у этого антитела только одна из двух основных цепей содержит аминокислоты в C_{H2} -домене и шарнирной области, которые были модифицированы (обозначено "X").

На фиг. 1J изображена тетравалентная молекула, две основные цепи которой включают V_L - и C_L -домен, шарнирную область, C_{H2} -домен, C_{H3} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент.

На фиг. 1K изображена тетравалентная молекула с двумя структурно отличающимися Fab-фрагментами. Первая главная цепь антитела включает V_L - и C_L -домен, шарнирную область, C_{H2} -домен, C_{H3} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент. Вторая главная цепь антитела включает V_H - и C_{H1} -домен, шарнирную область, C_{H2} -домен, C_{H3} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент.

На фиг. 1L изображена тетравалентная молекула, являющаяся димером конфигурации, включающей Fab-фрагмент, C_{H2} -домен, C_{H3} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент. В структуре Fab-фрагмента две главные цепи антитела включают V_L - и C_{H1} -домен.

На фиг. 1M изображена еще одна тетравалентная молекула с двумя структурно отличающимися Fab-фрагментами. Первая главная цепь антитела включает V_L - и C_{H1} -домен, шарнирную область, C_{H2} -домен, C_{H3} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент. Вторая главная цепь антитела включает V_H - и C_L -домен, шарнирную область, C_{H2} -домен, C_{H3} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент.

На фиг. 1N в качестве иллюстрации изображен вариант реализации бивалентной молекулы, включающей Fab-фрагмент, C_{H2} - и C_{H3} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент. Молекула антитела имеет главную цепь, в которой C_{H2} -домен своим N-концом сопряжен с C_{H1} - и V_H -доменами тяжелой цепи Fab-фрагмента, а своим C-концом - с C_{H3} -доменом, который своим C-концом сопряжен с одноцепочечным Fv-фрагментом. Такая молекула также может быть построена в Fab-конфигурациях, изображенных на фиг. 1A-1D, и может содержать модификации Fc в шарнирной области и C_{H2} -области ("X"), как изображено на фиг. 1E и 1O. Дополнительно они могут содержать модификации в C_{H3} -домене, которые предотвращают димеризацию этого домена и могут влиять на связывание с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Примеры остатков, которые участвуют в димеризации и, следовательно, могут быть модифицированы делецией или мутацией, включают T366, L368, F405, Y407 и K409 (см. Dall'Aqua et al., "Contribution of domain interface residues to the stability of antibody CH3 domain homodimers", *Biochemistry* (1998), vol. 37, issue 26, p. 9266-9273). Другие контактирующие остатки поверхности сопряжения C_{H3} -домена, которые могут быть подвергнуты модификации, включают Q347, Y349, T350, L351, L368, K370, K392, T394, P395, V397, L398, D399, F405, Y407 и K409 (см. S. Miller, *Protein-Protein Recognition and the Association of Immunoglobulin Constant Domains*, *J. Mol. Biol.* (1990), vol. 216, p. 965-973; и J. Deisenhofer *Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-A resolution*, *Biochemistry* (1981), vol. 20, p. 2361-2370); а также, поскольку речь идет о связывании неонатального Fc-рецептора, например, следующие остатки аминокислот C_{H2} -домена: T250, M252, S254, T256, T307 H310; и C_{H3} -домена: E380 M428, H433, N434, H435 (см. обзор Roopenian & Akilesh; FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age, *Nature Reviews Immunology* (2007), vol. 7, p. 715-725). Во всех этих молекулах, относящихся к изобретению, происходит замена остатков цистеина, образующих межцепочечные дисульфидные связи (C226 и C229 в антителах IgG человека), для предотвращения формирования димеров (●).

Дополнительные иллюстративные варианты реализации, не изображенные на фиг. 1A-1N, включают молекулы, в которых, по сравнению с изображенными вариантами реализации, одноцепочечный Fv-фрагмент на C-конце, скорее, может иметь V_L - V_H -, нежели V_H - V_L -ориентацию, означая, что V_L -домен сцеплен с соответствующей константной областью.

На фиг. 1O дан перечень иллюстративных модификаций, которые могут быть внесены в варианты бивалентного антитела, изображенные на фиг. 1A-1D и 1N, с получением Fc-дефицитных производных, как представлено в качестве примера на фиг. 1E. Модификации идентичны показанным на фиг. 1P, за исключением сохранившихся цистеинов (C226 и C229 в антителах IgG человека). Нумерация аминокислот соответствует нумерации Кабата (индекс EC), wt=последовательность дикого типа IgG1 человека; $\Delta 1$ =нокаут; Glycan= $\Delta 1$ -нокаут с делецией сахаридных фрагментов $\cong 297$; $\Delta 2$ -5 последующие варианты нокаута после $\Delta 1$; - = аминокислота была подвергнута делеции.

На фиг. 1P дан перечень возможных модификаций, используемых для продуцирования тетравалентной молекулы, изображенной на фиг. 1F-1M. Нумерация аминокислот соответствует нумерации Кабата (индекс EC), wt=последовательность дикого типа IgG1 человека; $\Delta 1$ =нокаут; Glycan= $\Delta 1$ -нокаут с делецией сахаридных фрагментов $\cong 297$; $\Delta 2$ -5 последующие варианты нокаута после $\Delta 1$; - = аминокислота

была подвергнута делеции.

На фиг. 2А-2С схематически изображена процедура клонирования при генерации оптимизированной тяжелой (главной) цепи для антител, изображенных на фиг. 1, в виде бивалентных или тетравалентных биспецифических антител с модифицированными Fc-частями с ослабленной ADCC.

i) Изображен первоначальный вектор на каркасе плазмиды pcDNA3 (Invitrogen; промотор CMV и сигнал терминации бычьего гормона роста удалены). Эта плаزمида содержит тяжелую цепь D1-изотипа Ig человека с регуляторными элементами локуса тяжелой цепи иммуноглобулина.

ii) Показана замена элемента VDJ (вариабельной области тяжелой цепи) или VJ (вариабельной области легкой цепи) через сайт рестрикции эндонуклеазы AatII и ClaI.

iii) Показана простая замена (через сайты рестрикции MluI и SpeI) полной тяжелой цепи D1-изотипа Ig человека на кодирующую последовательность для scFv-фрагмента и на элемент ДНК с подвергнутым делеции C_{H3}-доменом и модифицированными шарнирной областью и C_{H2}-доменом с получением в результате тяжелой цепи бивалентного специфического антитела. Для некоторых вариантов антител, в частности, изображенных на фиг. 1D, C_{H1}-домен может быть заменен C_L-доменом.

iv) Замена модифицированного фрагмента CH1-H-CH2 (через сайты рестрикции MluI и BspEI) на элемент CH1-H-CH2-CH3 с модифицированными шарнирной областью и C_{H2}-доменом формирует в результате тяжелую цепь тетравалентного биспецифического антитела, как показано в секции v). В случае дополнительной или как таковой замены цистеинов в позиции C226 и C229 результатом станет образование молекул бивалентных специфических антител, как показано на фиг. 1N.

v) Замена фрагмента scFv (через сайты рестрикции BspEI и SpeI) на фрагмент scFv со специфичностью любого другого антигена или другой V_H- и V_L-ориентацией.

Замены iv) и v) могут быть объединены.

На фиг. 2B и 2C подробно показаны области, смежные со вставленными VDJ-CH1 и scFv-элементами соответственно.

На фиг. 2D и 2F изображено схематическое представление процедуры клонирования для генерации легкой цепи моноспецифических антител человека.

i) Родительский вектор на каркасе плазмиды pCR-Script (Stratagene; промотор lacZ и сигнал терминации удалены) содержит VJ-область и C-область k-гена человека совместно с регуляторными элементами локуса легкой цепи иммуноглобулина.

ii) Замена элемента VJ (вариабельной области легкой цепи) или элемента VDJ (вариабельной области тяжелой цепи) через рестрикционные эндонуклеазы XhoI и SpeI.

iii) Замена элемента CL (константной легкой цепи) через рестрикционные эндонуклеазы PmlI и BsmBI.

На фиг. 2E и 2F подробно показаны области, смежные со вставленными элементами VJ и CL.

На схемах прямоугольниками обозначены экзоны, кружками - энхансерные элементы, тонкими линиями - UT-области и последовательности интронов;

L₁ и L₂ - лидерные последовательности, кодируемые двумя различными экзонами (также показаны на фиг. 2B и 2E);

V - вариабельные области;

D - область диверсификации;

J - области сопряжения;

C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_L - экзоны константных тяжелых и легких цепей;

H - шарнирный участок;

scFv - одноцепочечный Fv-фрагмент;

X=модификации аминокислот.

NotI, AatII, ClaI, MluI, BspEI, SpeI, XhoI, KpnI, XhoI, SpeI, PmlI, BsmBI, SalI - рестрикционные эндонуклеазы, используемые для клонирования;

Amp^R и Neo^R обозначают области кодирования устойчивости к ампициллину и неомицину соответственно.

Сайты расщепления для секреторных сигнальных пептидов обозначены как "[]"; границы между экзонами и нитронами обозначены как "[,]".

На фиг. 3А изображена ограниченная клеткой-мишенью активация Т-клетки (включение ³H-тимидина) двумя биспецифическими антителами разного формата, имеющими специфичность FLT3×CD3, в соответствии с настоящим изобретением. На клетках используются антитела, которые не включают (не закрашенные символы) и которые включают (закрашенные символы) ELT3/CD19-положительные R_H-клетки.

○, ●: бивалентная молекула антитела, как изображено на фиг. 1А, включающая последовательность "Glycan", как изображено на фиг. 1Е и 1О (формат bsFc^{ko}-I/2), Fab-фрагмент с сайтом связывания FLT3, фрагмент scFv с сайтом связывания CD3.

□, ■: тетравалентная молекула антитела, как изображено на фиг. 1G, с последовательностью D1, как изображено на фиг. 1P (формат bsFc^{ko}-1).

Fab₂-фрагмент с сайтом связывания FLT3, scFv-фрагмент с сайтом связывания CD3.

*: интактное моноспецифическое анти-CD3 антитело без клеток-мишеней.

В отсутствие клетки-мишени интактные моноспецифические CD3-антитела эффективно активируют Т-клетки в зависимости от Fc/FcR, тогда как биспецифические антитела неэффективны. Это показывает, что в биспецифическом формате изобретения связывание Fc/FcR фактически полностью отсутствует.

На фиг. 3В изображена ограниченная клеткой-мишенью активация Т-клетки (выброс TNF) различными бивалентными специфическими антителами согласно изобретению, используемыми на клетках, не включающих (не закрашенные символы) и включающих (закрашенные символы) FLT3/CD19-положительные RHE-клетки.

○, ●: бивалентная молекула антитела, как изображено на фиг. 1А, включающая последовательность "Glycan", как изображено на фиг. 1Е и фиг. 1О, Fab-фрагмент с сайтом связывания FLT3, scFv-фрагмент с сайтом связывания CD3;

◇, ◆: бивалентная молекула антитела, как изображено на фиг. 1Е, включающая последовательность "Glycan", как изображено на фиг. 1О, Fab-фрагмент с сайтом связывания CD 19, scFv-фрагмент с сайтом связывания TCR;

▽, ▼: бивалентная молекула антитела, как изображено на фиг. 1Е, включающая последовательность "Glycan", как изображено на фиг. 1О, Fab-фрагмент с сайтом связывания CSPG4, scFv-фрагмент с сайтом связывания CD3.

Хондроитинсульфата протеогликан CSPG4 является антигеном-мишенью клеток меланомы и не экспрессируется на RHE-клетках.

На фиг. 4А, 4В изображен специфический лизис RHE-клеток, экспрессирующих FLT3/CD19 (А), и SKMel63-клеток, экспрессирующих CSPG (В), соответственно посредством биспецифических антител согласно изобретению и активированных CD8-положительных Т-клеток-киллеров в 4-часовом тестировании на выделение ⁵¹хрома.

- : FLT3×CD3, формат bsFc^{ko}-1/2, как изображено на фиг. 1Е;
- : FLT3×CD3, формат bsFc^{ko}-1, как изображено на фиг. 1Г;
- ▼: CSPG4×CD3, формат bsFc^{ko}-1/2, как изображено на фиг. 1Е;
- ◆: CD19×TCR, формат bsFc^{ko}-1/2, как изображено на фиг. 1Е.

На фиг. 5А, 5В показано сравнение антител FLT3×CD3 одинаковой специфичности в трех разных форматах: биспецифическом одноцепочечном формате (bs-scFv), формате bsFc^{ko}-1/2, как изображено на фиг. 1Е, и формате bsFc^{ko}-1, как изображено на фиг. 1Г.

А: определение агрегации (в процентах) фильтрацией в геле. Агрегаты мигрируют близко к объему пустот и составляют 43, 0 и 2% соответственно для bs-scFv, bsFc^{ko}-1/2 и bsFc^{ko}-1. Сделано заключение, что образование агрегатов значительно более выражено, если антитело экспрессируется как bs-scFv, а не как bsFc^{ko}-1/2 или bsFc^{ko}-1.

В: скорость продуцирования после трансфекции генов антитела в продуцируемые клетки и очистки аффинной хроматографией. Как можно видеть, образование агрегатов значительно снижено для двух форматов Fc^{ko} согласно изобретению, а скорости продуцирования существенно выше, чем при биспецифическом одноцепочечном формате (bs-scFv).

На фиг. 6А изображены последовательности иллюстративных легких цепей, которые могут быть включены в антитело согласно изобретению. Соответствующие пептидные цепи соответствуют зрелому белку без соответствующей лидерной пептидной последовательности. Последовательности имеют N-концевую вариабельную область, обозначенную жирным шрифтом, и C-концевую константную область, обозначенную курсивом. Определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области выделены подчеркиванием.

На фиг. 6В изображены последовательности иллюстративных главных цепей, которые в данном случае также могут быть названы тяжелыми цепями, которые могут быть включены в антитело согласно изобретению. Данная главная цепь для формата bsFc-1/2 (фиг. 1Е) включает V_H-домен, C_{H1}-домен, шарнирную область, модифицированный C_{H2}-домен, V_L-домен и V_H-домен фрагмента scFv. В примере последовательности 21) (SEQ ID NO: 26) главная цепь содержит C_{H3}-домен, как изображено в примере на фиг. 1Г-1М (формат bsFc^{ko}-1).

V_H-домены обозначены жирным шрифтом, C_{H1}-домены - обычным, а шарнирная область, C_{H2}- и C_{H3}-домены - обычным шрифтом с подчеркиванием. Главная цепь также включает V_L-домен, который обозначен жирным курсивом, и V_H-домен (жирным шрифтом) scFv-фрагмента. V_H- и V_L-домены сопряжены друг с другом посредством линкера, который обозначен подчеркнутым курсивом. Определяющие комплементарность области (CDR) соответствующих V_L- и V_H-доменов подчеркнуты. C_{H2}-домен и фрагмент scFv сопряжены друг с другом через малый линкер (GQPSG), обозначенный курсивом.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к рекомбинантной молекуле биспецифического антитела. Эта молекула антитела сформирована из элементов, входящих в нативные, т.е. имеющие естественное происхождение, иммуноглобулины, а именно из доменов тяжелых и легких цепей иммуноглобулина.

Термин "антитело" в целом относится к белковой молекуле связывания, выполняющей функции на-

подобие иммуноглобулинов. Типичными примерами антитела являются иммуноглобулины, а также их производные или функциональные фрагменты, сохраняющие специфичность связывания. Способы продуцирования антител известны на существующем уровне техники. Термин "антитело" включает также иммуноглобулины (Ig) различных классов (т.е. IgA, IgG, IgM, IgD и IgE) и подклассов (таких как IgG1, IgG2 и т.д.). Иллюстративными примерами антител являются Fab-фрагменты, F(ab')₂, Fv-фрагменты, одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), димерные антитела или доменные антитела (Holt L.J. et al., Trends Biotechnol., 21(11), 2003, 484-490). Доменные антитела могут представлять собой однодоменные антитела, антитела с одиночным варибельным доменом или одиночный варибельный домен иммуноглобулина, имеющий только один варибельный домен, который может быть V_H или V_L, специфически связывающий антиген или эпитоп независимо от других V-областей или доменов. Такой одиночный варибельный домен иммуноглобулина может включать не только выделенный полипептид одиночного варибельного домена антитела, но и полипептид больших размеров, содержащий или состоящий из одного или более мономеров полипептидной последовательности одиночного варибельного домена антитела. Таким образом, под определение термина "антитело" попадают такие формы, как химерные, одноцепочечные и гуманизированные антитела.

Молекула антитела согласно изобретению может нести один или более доменов, содержащих последовательность, которая по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 75%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98% или по меньшей мере примерно на 99% идентична последовательности с соответствующим имеющим естественное происхождение доменом иммуноглобулина M, иммуноглобулина G, иммуноглобулина A, иммуноглобулина D или иммуноглобулина E. В этом отношении следует отметить, что термин "примерно" или "приблизительно", используемые в данном тексте, обозначают отклонение от названных величин или диапазонов значений в пределах 20%, например в пределах 10% или в пределах 5%.

Следовательно, главная цепь (более длинная полипептидная цепь) молекулы антитела по изобретению может включать или состоять из доменов с указанной выше идентичностью последовательности с соответствующим доменом мю-тяжелой цепи иммуноглобулина, гамма-тяжелой цепи иммуноглобулина, альфа-тяжелой цепи иммуноглобулина, дельта-тяжелой цепи иммуноглобулина или эпсилон-тяжелой цепи иммуноглобулина. Кроме того, молекула антитела по изобретению может включать или состоять из доменов с вышеуказанной идентичностью последовательностей с соответствующим доменом лямбда-легкой цепи иммуноглобулина или каппа-легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации полные домены тяжелой цепи молекулы антитела по изобретению по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 75%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98% или по меньшей мере примерно на 99% идентичны последовательностям соответствующих областей мю-тяжелой цепи иммуноглобулина, гамма-тяжелой цепи иммуноглобулина (таких, как тяжелые цепи гамма-1, гамма-2, гамма-3 или гамма-4), альфа-тяжелой цепи иммуноглобулина (таких, как тяжелые цепи альфа-1 или альфа-2), дельта-тяжелой цепи иммуноглобулина или эпсилон-тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации все домены легкой цепи, присутствующие в молекуле антитела по изобретению, по меньшей мере примерно на 60 %, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 75%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98% или по меньшей мере примерно на 99% идентичны последовательностям соответствующих областей лямбда-легкой цепи иммуноглобулина (таких, как легкие цепи лямбда-1, лямбда-2, лямбда-3 или лямбда-4) или каппа-легкой цепи иммуноглобулина.

"Процент (%) идентичности последовательности" в отношении аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, определяется как процентное содержание аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, попарно идентичных аминокислотным остаткам в эталонной последовательности, т.е. молекулы антитела по настоящему изобретению, после выравнивания последовательностей и внесения при необходимости гэпов для достижения максимального процента идентичности последовательностей без учета каких-либо консервативных замен в качестве части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть выполнено различными известными из уровня техники способами, например, с использованием коммерчески доступного программного обеспечения, такого как BLAST, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут задавать необходимые параметры для измерительного выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания сравниваемых последовательностей по всей длине сравниваемых последовательностей. Это же справедливо в отношении раскрытых в настоящем документе последовательностям нуклеотидов.

Термин "вариабельный" относится к доменам иммуноглобулина, проявляющим вариабельность в своей структуре и участвующим в определении специфичности и аффинности конкретного антитела (т.е. к "вариабельному(ым) домену(ам)"). Вариабельность имеет неравномерное распределение в пределах вариабельных доменов антител; она концентрируется в субдоменах каждой вариабельной области тяжелых и легких цепей. Такие субдомены называют "гипервариабельными участками", "HVR" или "HV", или "определяющими комплементарность областями (CDR)". Более консервативные (т.е. негипервариабельные) части вариабельных доменов называют "каркасными" участками (FR). Каждый из вариабельных доменов тяжелых и легких цепей естественного происхождения включает четыре каркасных участка FR, как правило, β -образной слоистой конфигурации, которые присоединены тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие часть β -слоистой структуры. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от участка FR и, вместе с гипервариабельными участками другой цепи вносят свой вклад в формирование сайта связывания антигена (см. Kabat и др. ниже). В основном иммуноглобулины естественного происхождения включают шесть CDR (см. ниже): три в V_H (H1, H2, H3) и три в V_L (L1, L2, L3). В иммуноглобулинах естественного происхождения H3 и L3 проявляют наибольшую диверсификацию из шести CDR, а H3, в частности, как полагают, играет уникальную роль в придании иммуноглобулинам узконаправленной специфичности. Константные домены не вовлечены непосредственно в связывание антигена, но проявляют разнообразные эффекторные функции, такие как, например, антителозависимая, клеточно-опосредованная цитотоксичность и активация комплемента.

Соответствующие иммуноглобулиновые μ -тяжелая цепь, гамма-тяжелая цепь, альфа-тяжелая цепь, дельта-тяжелая цепь, эпислон-тяжелая цепь, лямбда-легкая цепь или каппа-легкая цепь могут быть любого биологического вида, например, от млекопитающих, включая грызунов, до земноводных, например, подкласса Lissamphibia, куда входят лягушки, жабы, саламандры и тритоны, или беспозвоночных. Неограничительными примерами млекопитающих служат крыса, мышь, кролик, морская свинка, белка, хомяк, еж, утконос, американская пищуха, броненосец, собака, лемур, козел, свинья, корова, опоссум, лошадь, летучая мышь, сурок, орангутан, макак-резус, шерстистая обезьяна, макака, шимпанзе, тамарин (*saguinus oedipus*), мартышка или человек.

Термин "иммуноглобулин" относится к гликопротеину, который включает по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, или к его антигенсвязывающей части. Каждая тяжелая цепь имеет вариабельную область тяжелой цепи (аббревиатура V_H) и константную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации константная область тяжелой цепи включает три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь имеет вариабельную область легкой цепи (аббревиатура V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи включает один домен C_L . Области V_H и V_L могут быть также разделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными участками, называемыми каркасными областями (FR). CDR содержат большинство остатков, ответственных за специфическое взаимодействие антитела с антигеном. Каждая V_H и V_L имеет три CDR и четыре FR, расположенные от amino-конца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с эпитопом антигена.

Каждая легкая цепь иммуноглобулина включает N-концевой вариабельный (V) домен (V_L) и константный (C) домен. Каждая тяжелая цепь включает N-концевой V-домен (V_H), три или четыре C-домена (C_H) и шарнирную область. Подобным образом, молекула антитела согласно настоящему изобретению содержит эти домены и области (даже при том, что один сайт связывания молекулы биспецифического антитела образован только одноцепочечным Fv-фрагментом).

Используемый здесь иммуноглобулин обычно представляет собой тетрамерный гликозилированный белок, образованный из двух легких (L) цепей приблизительно по 25 кДа каждая и двух тяжелых (H) цепей приблизительно по 50 кДа каждая. Иммуноглобулины могут содержать две разновидности легкой цепи, называемые лямбда и каппа. В зависимости от аминокислотной последовательности в константном домене тяжелых цепей иммуноглобулины могут быть отнесены к пяти основным классам: A, D, E, G и M, некоторые из которых могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Иммуноглобулин IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных единиц в сочетании с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и содержит 10 сайтов связывания антигенов, в то время как иммуноглобулины IgA содержат от 2 до 5 из базовых 4-цепочечных элементов, способных полимеризоваться с образованием мультвалентных структур в сочетании с J-цепью. В случае IgG молекулярная масса 4-цепочечного элемента в целом составляет приблизительно 150000 дальтон.

Термин "аминокислота" или "аминокислотный остаток" относится к α - или β -аминокарбоновой кислоте.

Термины "аминокислота" или "аминокислотный остаток", применяемые в отношении белка или пептида, обычно относятся к α -аминокарбоновой кислоте, известной в области техники как аминокислота, выбранная из группы, состоящей из следующего: L-аланин (Ala или A); L-аргинин (Arg или R); L-аспарагин (Asn или N); L-аспарагиновая-кислота (Asp или D); L-цистеин (Cys или C); L-глутамин (Gln

или Q); L-глутаминовая кислота (Glu или E); L-глицин (Gly или G); L-гистидин (His или H); L-изолейцин (Ile или I); L-лейцин (Leu или L); L-лизин (Lys или K); L-метионин (Met или M); L-фенилаланин (Phe или F); L-пролин (Pro или P); L-серин (Ser или S); L-треонин (Thr или T); L-триптофан (Trp или W); L-тирозин (Tyr или Y) и L-валин (Val или V), хотя при необходимости могут быть использованы модифицированные, синтетические или редкие аминокислоты, такие как, например, таурин, орнитин, селеноцистеин, гомоцистин, гидроксипролин, тиопролин, йодотирозин, 3-нитротирозин, цитруллин, канаванин, 5-гидрокситриптофан, карнозин, циклолейцин, 3,4-дигидроксифенилаланин, N-ацетилцистеин, пролинол, аллилглицин или ацетидин-2-карбоновая кислота. В целом аминокислоты могут быть сгруппированы по наличию неполярной боковой цепи (например, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); отрицательно заряженной боковой цепи (например, Asp, Glu); положительно заряженной боковой цепи (например, Arg, His, Lys); или незаряженной полярной боковой цепи (например, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp и Tyr).

Термин "эпитоп", также известный как "антигенная детерминанта", относится к части антигена, с которой специфично связывается антитело или Т-клеточный рецептор, образуя комплекс. Из этого следует, что термин "эпитоп" включает в себя любую молекулу или белковую детерминанту, способную к специфическому связыванию с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Сайт(ы) связывания (паратоп) описываемой здесь молекулы антитела может(могут) специфично связаться/взаимодействовать с конформационными или непрерывными эпитопами с уникальной мишенной структурой. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или сахаридные боковые цепи, и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. В некоторых вариантах реализации детерминанты эпитопов содержат химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, сахаридные боковые цепи, фосфорил или сульфонил, а в определенных вариантах реализации они могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Что касается полипептидных антигенов, конформационный или прерывистый эпитоп характеризуется наличием двух или больше дискретных аминокислотных остатков, выделенных из первичной последовательности, которые, однако, собираются в последовательную структуру на поверхности молекулы, когда полипептид складывается в нативный белок/антиген (Sela, M., Science (1969), 166, 1365-1374; Laver, W.G. et al., Cell (1990), 61, 553-556). Два или более дискретных аминокислотных остатков, входящих в эпитоп, могут располагаться на отдельных участках одной или более полипептидных цепей. Эти остатки объединяются на поверхности молекулы, когда полипептидная(ые) цепь(и) складывает(ют)ся в трехмерную структуру со сборкой эпитопа. Напротив, непрерывный или линейный эпитоп состоит из двух или более дискретных аминокислотных остатков, которые присутствуют на одиночном линейном сегменте полипептидной цепи. В качестве иллюстративного примера "контекстно-зависимый" CD3-эпитоп является примером конформации указанного эпитопа. Такой контекстно-зависимый эпитоп, локализованный на эписилон-цепи CD3, может правильно развить свою конформацию, только если он встроен в остальную часть эписилон-цепи и удерживается в правильном положении путем гетеродимеризации эписилон-цепи с гамма- или дельта-цепью CD3. В противоположность этому контекстно-независимый CD3-эпитоп может быть N-концевым полипептидом из 1-27 аминокислотных остатков или его функциональным фрагментом в эписилон-цепи CD3.

В целом по своей природе эпитопы могут быть линейными или прерывистыми. Таким образом, используемый здесь термин "конформационный эпитоп" относится к прерывистому эпитопу, образовавшемуся за счет пространственной взаимосвязи аминокислот в антигене, отличному от неразрывного ряда аминокислот. Кроме того, термин "эпитоп" включает в себя антигенную детерминанту гаптена, которая известна как небольшая молекула, способная выступать в роли антигена, проявляя один или более иммунологически распознаваемых эпитопов после связывания с веществом большего размера, таким как молекула большего размера, например белком.

Считается, что антитело или молекула/фрагмент антитела специфично связывается с антигеном при распознавании своего антигена-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул. Считается, что антитела "связываются с одним и тем же эпитопом", если антитела взаимно конкурируют за то, чтобы только одно антитело могло связаться с эпитопом в данный момент времени, т.е. одно антитело предотвращает связывание или модулирующее воздействие другого.

В данном контексте термин "специфический" или "специфически распознающий", также используемый как "направленный на", в соответствии с настоящим изобретением означает, что молекула антитела способна специфично взаимодействовать и/или связываться по меньшей мере с двумя, например по меньшей мере с тремя или по меньшей мере с четырьмя, аминокислотами эпитопа, но по существу не связывается с другим эпитопом или антигеном. Пример такого связывания может быть приведен в качестве специфичности согласно "принципу замок-ключ". Считается, что специфичность связывания реализуется специфическими мотивами в аминокислотной последовательности области связывания антитела и эпитопа или эпитоп или антиген связываются друг с другом в результате их первичной, вторичной или третичной структуры, а также в результате вторичных модификаций указанной структуры. Специфическое взаимодействие специфического эпитопа/сайта взаимодействия антигена со своим специфическим

эпитопом/антигеном может также дать в результате простое связывание указанного сайта с антигеном. Более того, в качестве альтернативы специфическое взаимодействие сайта взаимодействия антигена со своим специфическим эпитопом/антигеном может привести к инициированию сигнала, например, вследствие индуцирования изменения конформации антигена или олигомеризации антигена.

Как правило, связывание считают специфичным, когда аффинность связывания превышает 10^{-6} М. В частности, связывание считают специфическим при аффинности связывания приблизительно от 10^{-8} до 10^{-11} М (K_D), или приблизительно от 10^{-9} до 10^{-11} М, или еще выше. Таким образом, молекулы антитела с аффинностью первого сайта связывания и/или второго сайта связывания в пиколярном диапазоне (при K_D 10^{-12} М) также включены в настоящее изобретение. В случае необходимости неспецифическое связывание сайта связывания может быть ослаблено без оказания существенного воздействия на специфическое связывание изменением условий связывания.

В некоторых вариантах реализации антиген, с которым связывается антитело, согласно изобретению является антигеном, входящим в состав внеклеточного матрикса, или поверхностно-клеточным антигеном. В некоторых вариантах реализации антиген, с которым связывается антитело, согласно изобретению представляет собой опухоль-ассоциированный антиген. Следует понимать, что такой опухоль-ассоциированный антиген может быть включен во внеклеточный матрикс или представлять собой поверхностно-клеточный антиген.

Термин "внеклеточный матрикс" относится к тканевой области многоклеточного животного, включая человека, которая находится в межклеточном пространстве, т.е. между клетками соответствующей ткани. Внеклеточный матрикс представляет собой большей частью сеть белков, таких как фибриллярные и нефибриллярные коллагены или эластин, гликопротеинов, таких как ламинин или фибронектин, протеогликанов, таких как хондроитин сульфат или кератан сульфат, и полисахаридов, таких как гиалуроновая кислота. Среди прочего, внеклеточный матрикс служит для разделения между собой различных тканей или для регулирования межклеточной связи. В некоторых вариантах реализации опухоль-ассоциированный антиген может экспрессироваться частично или исключительно во внеклеточном матриксе опухоли.

Используемый здесь термин "поверхностно-клеточный антиген" относится к молекуле, которая проявляется на поверхности клетки. Обычно такая молекула расположена в или на плазматической мембране клетки таким образом, что по меньшей мере часть этой молекулы остается доступной из окружающей среды, т.е. снаружи клетки. Соответствующая молекула состоит из или включает в себя аминокислотные и/или сахаридные фрагменты. Примером, иллюстрирующим поверхностно-клеточную молекулу, расположенную в плазматической мембране, является трансмембранный белок, который в своей трехмерной конформации имеет области гидрофильности и гидрофобности. Одна или более гидрофобных областей обеспечивают поверхностно-клеточной молекуле возможность встраивания или инсерции в гидрофобную плазматическую мембрану клетки, в то время как гидрофильные области белка проходят по каждой стороне плазматической мембраны в цитоплазму и внеклеточное пространство соответственно. Примеры поверхностно-клеточной молекулы, расположенной на плазматической мембране, включают, но без ограничения, белок с посттрансляционно модифицированным остатком цистеина, несущим пальмитоильную группу, белок, модифицированный на С-концевом остатке цистеина, несущем фарнезильную группу, или белок, модифицированный на С-конце, несущем гликозилфосфатидилинозитоловый ("GPI") якорь. Эти группы способствуют ковалентному присоединению белков к наружной поверхности плазматической мембраны, где они остаются доступными для распознавания внеклеточными молекулами, такими как антитела. Примеры поверхностно-клеточных антигенов включают в себя молекулу рецептора клеточной поверхности, такого как сопряженный с G-белком рецептор (например, адренергический рецептор β), рецептор тирозинкиназы (такой как EGFR, EGFRvIII, Her2/neu, Her2/c-neu, PDGFR α , ILR-1, TNFR, CD30, CD33 или GMCSFR), мембранный рецептор с соответствующей активностью тирозинкиназы (такой, как IL6R или LEFR) или мембранный рецептор с активностью Ser/Thr-киназы (такой, как TGFbR), которые приведены лишь в качестве нескольких примеров.

Примеры опухоль-ассоциированного антигена, входящего в состав внеклеточного матрикса, включают, но без ограничения, протеогликан, такой как ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (CSPG4) или CD44v6, включая муцин, такой как Muc-1, или мембраносвязанный фермент, такой как карбоангидраза IX (CAIX). Примерами таких антигенов являются тенасцин и фибробласт-активирующий протеин (FAP).

Используемый здесь термин "выделенная молекула антитела" относится к молекуле антитела, которая была идентифицирована и выделена и/или восстановлена из компонента своей природной среды. Примесями ее естественной среды являются вещества, которые могут препятствовать применению антитела в диагностике или терапии и которые могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах реализации молекулу антитела очищают более чем до 95% по массе антитела, например более чем до 99%, что определяется методом Лоури. В некоторых вариантах реализации молекулу антитела очищают до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использо-

ванием секвенатора с вращающимся стаканом. В некоторых вариантах реализации антитело очищают до уровня гомогенности методом SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением окрашивания Кумасси синим или предпочтительно серебром. В некоторых вариантах реализации выделенная молекула антитела может находиться внутри рекомбинантных клеток при отсутствии одного или более компонентов естественной среды антитела. Обычно выделенное антитело получают по меньшей мере одной стадией очистки.

Используемые здесь термины " V_H " и " V_L " относятся соответственно к вариабельному домену тяжелой цепи и вариабельному домену легкой цепи иммуноглобулина. Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из "каркасной" области, прерываемой тремя гипервариабельными участками. Таким образом, термин "гипервариабельный участок" относится к аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена. Гипервариабельный участок включает аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR". В вариабельную часть иммуноглобулина входят по три CDR (или CDR-области) тяжелой и легкой цепей. Таким образом, используемый здесь термин "CDR" относится ко всем трем CDR тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3), или всем трем CDR легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3), или же при необходимости ко всем CDR как тяжелой, так и легкой цепей. Три CDR составляют характер связывания вариабельной области легкой цепи, а другие три составляют характер связывания вариабельной области тяжелой цепи. CDR определяют специфичность молекулы иммуноглобулина в отношении антигена и разделены аминокислотными последовательностями, которые включают несущие или каркасные области. Четкие границы и протяженность CDR определяются различными классификационными и номенклатурными системами. Структура и укладка белка антитела могут означать, что другие остатки рассматриваются как часть антиген-связывающей области, что будет ясно специалисту в данной области техники. CDR формируют большинство контактных остатков для связывания иммуноглобулина с антигеном или эпитопом.

CDR3, как правило, представляет собой самый большой источник молекулярного разнообразия в пределах сайта связывания антитела. H3, например, может быть коротким, как два аминокислотных остатка, или длиннее, чем 26 аминокислот. Структура субъединиц и трехмерные конфигурации иммуноглобулинов разных классов хорошо известны из уровня техники. Обзор структуры антитела см. в *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988. Специалисту в данной области техники будет ясно, что каждая структура субъединицы, например структура C_H , V_H , C_L , V_L , CDR, FR, содержит активные фрагменты, например, часть субъединицы V_H , V_L или CDR связывается с антигеном, т.е. антигенсвязывающим фрагментом, или, например, часть субъединицы C_H , которая связывается и/или активирует, например, Fc-рецептор и/или комплемент. Как правило, CDR относятся к нумерации CDR по Кабату, как представлено в *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al. Другим стандартом характеристики сайта связывания антигена является характеристика через гипервариабельные петли, как описано Чотиа. См., например, Chothia et al. (1992, *J. Mol. Biol.*, 227:799-817); и Tomlinson et al. (1995), *EMBO, J.* 14:4628-4638. Еще одним стандартом является определение по AbM, используемое в программном обеспечении по моделированию антител AbM Oxford Molecular. В целом см., например, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*, Antibody Engineering Lab Manual (ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Варианты реализации, описанные с использованием классификации CDR Кабата, альтернативно могут быть осуществлены с использованием подобных взаимоотношений касательно гипервариабельных петель по Чотиа или определенных по AbM петель.

Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой остатки вариабельного домена, отличного от гипервариабельного домена. Последовательности каркасных областей разных легких или тяжелых цепей являются относительно постоянными в пределах одного вида. Таким образом, "каркасная область человека" представляет собой каркасную область, которая по существу идентична (около 85% или более, как правило 90-95% или более) каркасной области иммуноглобулина человека естественного происхождения. Каркасная область антитела, т.е. комбинированные каркасные области составляющих легкой и тяжелой цепей, служит для позиционирования и выравнивания CDR. CDR изначально ответственны за связывание с эпитопом антигена.

Термины "Fab" и "Fab-область", "Fab-часть" или "Fab-фрагмент" следует понимать, как определяющие полипептид, который включает домены V_H , C_{H1} , V_L и C_L иммуноглобулина. Fab может относиться к этой области отдельно или этой области в контексте молекулы антитела согласно изобретению, а также всей длине иммуноглобулина или фрагменту иммуноглобулина. Как правило, Fab-область содержит всю легкую цепь антитела. Fab-область может быть определена как "плечо" молекулы иммуноглобулина. Она содержит эпитопсвязывающую часть этого Ig. Fab-область иммуноглобулина естественного происхождения может быть получена в виде протеолитического фрагмента путем расщепления папаином. " $F(ab')_2$ -часть" представляет собой протеолитический фрагмент расщепленного пепсином иммуноглобулина. "Fab'-часть" является продуктом восстановления дисульфидных связей $F(ab')_2$ -части. Используемые здесь термины "Fab", "Fab-область", "Fab-часть" и "Fab-фрагмент" также могут включать шарнирную область, определяющую C-концевое плечо антитела (см. выше). Эта шарнирная область соответствует шарнирной области, находящейся на C-конце C_{H1} -домена по всей длине иммуноглобулина, в которой

плечи молекулы антитела могут быть взяты для образования Y. Термин "шарнирная область" используется в данной области техники, поскольку иммуноглобулин в этой области имеет некоторую гибкость.

"Fv" или "Fv-фрагмент" состоит только из V_L и V_H доменов "одиночного плеча" иммуноглобулина. Таким образом, "Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полный сайт распознавания и связывания антигена. "Двухцепочечный" Fv-фрагмент состоит из димера из одного переменного домена тяжелой и одного переменного домена легкой цепей, находящихся в прочной нековалентной связи. Разновидность одноцепочечного Fv (scFv) включает V_H - и V_L -домен иммуноглобулина, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи, в которой они ковалентно связаны друг с другом с помощью гибкого пептидного линкера. Как правило, в scFv-фрагменте переменные домены легкой и тяжелой цепей связаны в димерную структуру, аналогичную таковой в разновидности двухцепочечного Fv-. В одноцепочечных scFv-фрагментах возможно, чтобы переменный домен легкой цепи находился на N-конце одиночной полипептидной цепи, после которого следует линкер и переменный домен тяжелой цепи, находящийся на C-конце полипептидной цепи, или наоборот, чтобы переменный домен тяжелой цепи находился на N-конце, а переменный домен легкой цепи - на C-конце, между которыми находился бы пептидный линкер. Пептидный линкер может представлять собой любой известный из области техники гибкий линкер, например, составленный из остатков глицина и серина. Кроме того, возможно дополнительно стабилизировать ассоциацию между доменами V_H и V_L путем введения дисульфидных связей в консервативные каркасные области (см. Reiter et al., Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions, Biochemistry, 1994, 33, 6551-5459). Такие scFv-фрагменты также известны как стабилизированные дисульфидными связями scFv-фрагменты (ds-scFv).

Используемый здесь термин "Fc-область" или "Fc-фрагмент" обозначает C-концевую область тяжелой цепи иммуноглобулина, включающую Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области. Fc-часть опосредует эффекторную функцию антител, например активацию системы комплемента и несущих Fc-рецептор иммунных эффекторных клеток, таких как NK-клетки. В молекулах IgG человека Fc-область генерируется расщеплением папаином на N-конце у Cys226. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно имеет протяжение от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230, до ее карбоксильного конца. C-концевой лизин (остаток 447 по номенклатуре EC) Fc-области может быть удален, например, при продуцировании или очистке молекулы антитела или посредством рекомбинантной инженерии нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь молекулы антитела. Следовательно, композиция интактных антител может включать популяции антител со всеми удаленными остатками K447, популяции антител без удаленных остатков K447 и популяции со смесью антител с и без остатков K447. Fc-области с нативной последовательностью, пригодные для антител в соответствии с изобретением, включают иммуноглобулины млекопитающих, например, человека или мыши, IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4. Fc-область содержит два или три константных домена в зависимости от класса антитела. В вариантах реализации, где иммуноглобулином является IgG, Fc-область включает домены C_{H2} и C_{H3} .

Молекула антитела по настоящему изобретению имеет две цепи: более короткую цепь, которая в некоторых вариантах реализации может быть легкой цепью, и главную цепь, которая в некоторых вариантах реализации также может быть названа тяжелой цепью. Молекула антитела обычно представляет собой димер из этих двух цепей. Основываясь на доменах, включенных в молекулу антитела, согласно изобретению может быть взята молекула антитела, которая имеет Fab-фрагмент, в целом включающий шарнирную область, C_{H2} -домен и одноцепочечный Fv-фрагмент. В некоторых вариантах реализации молекула антитела также включает C_{H3} -домен, в целом расположенный на C-конце C_{H2} -домена. В некоторых вариантах реализации расположение доменов антитела согласно изобретению соответствует расположению доменов в иммуноглобулине. В качестве двух примеров более короткая цепь молекулы антитела по изобретению может иметь V_L -домен на N-конце и C_L -домен на C-конце более короткой цепи, а главная цепь может иметь V_H -домен на N-конце и C_{H1} -домен на C-конце. В некоторых вариантах реализации более короткая цепь может иметь V_L -домен на N-конце и C_{H1} -домен на C-конце. В некоторых вариантах реализации более короткая цепь может иметь V_H -домен на N-конце и C_{H1} -домен на C-конце более короткой цепи. В некоторых вариантах реализации более короткая цепь может иметь V_H -домен на N-конце и C_L -домен на C-конце более короткой цепи. В некоторых вариантах реализации главная цепь может иметь V_L -домен на N-конце и C_{H1} -домен на C-конце. В некоторых вариантах реализации главная цепь может иметь V_H -домен на N-конце и C_L -домен на C-конце. В некоторых вариантах реализации главная цепь может иметь V_L -домен на N-конце и C_L -домен на C-конце.

Более короткая цепь антитела может быть связана с главной цепью антитела посредством одной, двух или трех дисульфидных связей. Соответствующая дисульфидная связь может образовывать мостик между C-концевым остатком цистеина меньшей цепи и остатком цистеина в пределах шарнирной области главной цепи антитела.

В молекуле антитела по изобретению C-концевая область главной цепи может быть определена одноцепочечным Fv-фрагментом. В некоторых вариантах реализации C-конец главной цепи может быть

определен V_H -доменом scFv-фрагмента. В некоторых вариантах реализации С-конец главной цепи может быть определен V_L -доменом scFv-фрагмента. Соответственно в некоторых вариантах реализации scFv-фрагмент может быть сопряжен с C_{H2} -доменом или с C_{H3} -доменом, если он присутствует, главной цепи через V_H -домен, например N-конец V_H -домена. В некоторых вариантах реализации scFv-фрагмент может быть сопряжен с C_{H2} -доменом или с C_{H3} -доменом, если он присутствует, главной цепи через V_L -домен, например через N-конец V_L -домена. В некоторых вариантах реализации C_{H2} -домен молекулы антитела или C_{H3} -домен, если он присутствует, связан с scFv-фрагментом через вариабельный домен легкой цепи (V_L -домен) scFv-фрагмента. В некоторых вариантах реализации C_{H2} -домен связан с scFv-фрагментом через вариабельный домен тяжелой цепи (V_H -домен) scFv-фрагмента.

Fab-фрагмент молекулы антитела по изобретению в некоторых вариантах реализации связан с C_{H2} -доменом через домен тяжелой цепи Fab-фрагмента. Соответственно главная цепь антитела может иметь домен тяжелой цепи, такой как C_{H1} -домен (см. выше), сопряженный с C_{H2} -доменом. Как сказано выше, соответствующий C_{H1} -домен может быть сопряжен с C_{H2} -доменом через шарнирную область. Соответственно домен тяжелой цепи Fab-фрагмента в некоторых вариантах реализации может находиться на N-конце полипептидной цепи главной цепи антитела. В некоторых вариантах реализации Fab-фрагмент молекулы антитела по изобретению связан с C_{H2} -доменом через домен легкой цепи Fab-фрагмента. Соответственно главная цепь молекулы антитела может иметь домен легкой цепи, такой как C_L -домен, сопряженный с C_{H2} -доменом. И вновь соответствующий C_L -домен может быть сопряжен с C_{H2} -доменом через шарнирную область. В некоторых вариантах реализации соответствующий домен легкой цепи Fab-фрагмента может находиться на N-конце полипептидной цепи главной цепи молекулы антитела. Для предотвращения димеризации молекул в бивалентных вариантах реализации (фиг. 1A-1E и 1N) остатки цистеина в шарнирной области, обеспечивающие межцепочечные дисульфидные связи, могут быть заменены. В тетравалентных вариантах реализации (фиг. 1F-1M) эти остатки цистеина сохранены. В этих вариантах реализации молекула антитела, соответственно, может быть взята для определения димера бивалентной димерной молекулы антитела, как описано выше, и каждая главная цепь и каждая более короткая цепь могут быть выбраны индивидуально. Например, первая из более коротких цепей может иметь V_H -домен на N-конце и C_L -домен на С-конце. Первая главная цепь может иметь V_L -домен на N-конце и C_{H1} -домен на С-конце. Далее первая главная цепь может иметь C_{H2} - и C_{H3} -домен, а также С-концевой scFv-фрагмент. scFv-фрагмент может быть сопряжен с C_{H3} -доменом через V_L -домен. Вторая из более коротких цепей может иметь V_H -домен на N-конце и C_{H1} -домен на С-конце. Вторая главная цепь может иметь V_L -домен на N-конце и C_L -домен на С-конце. Вторая главная цепь может также иметь C_{H2} - и C_{H3} -домен, а также С-концевой scFv-фрагмент. scFv-фрагмент может быть сопряжен с C_{H3} -доменом через V_L -домен.

Соответствующая тетрамерная молекула антитела может быть образована из двух димерных молекул антитела, связанных между собой одной или более, например двумя, дисульфидными связями. Такая дисульфидная связь может сформировать мостик между остатком цистеина главной цепи первой димерной молекулы антитела и остатком цистеина главной цепи второй димерной молекулы антитела. Как правило, соответствующие остатки цистеина расположены в пределах шарнирной области соответствующей главной цепи каждой димерной молекулы антитела. В некоторых вариантах реализации одна или обе из двух главных цепей, т.е. главная цепь первой димерной молекулы и главная цепь второй димерной молекулы тетрамерной молекулы антитела, имеют остаток цистеина в позиции 226 последовательности и/или в позиции 229 последовательности одной из соответствующих шарнирных областей в соответствии с нумерацией Кабата (индекс ЕС). В одном варианте реализации дисульфидная связь между шарнирной областью первой главной цепи и шарнирной областью второй главной цепи определяется по меньшей мере одним остатком цистеина в позиции 226 последовательности и остатком цистеина в позиции 229 последовательности одной из шарнирных областей в соответствии с нумерацией Кабата (индекс ЕС). В некоторых вариантах реализации тетрамерная молекула антитела может иметь одну или более дисульфидных связей между шарнирными областями двух главных цепей димерных молекул антитела и одну дисульфидную связь между шарнирными областями двух главных цепей димерных молекул антитела. В некоторых вариантах реализации две димерные молекулы антитела тетрамерной молекулы антитела по изобретению могут быть связаны дисульфидной связью, определяемой остатком цистеина, входящим в C_{H2} -домен главной цепи первой димерной молекулы антитела, и остатком цистеина, входящим в C_{H2} -домен главной цепи второй димерной молекулы антитела.

В качестве еще одного примера первая из более коротких цепей может иметь V_L -домен на N-конце и C_{H1} -домен на С-конце. Первая главная цепь может иметь V_H -домен на N-конце и C_L -домен, связанный с ней на С-конце. Кроме того, первая главная цепь может иметь C_{H2} - и C_{H3} -домен, а также С-концевой scFv-фрагмент. scFv-фрагмент может быть сопряжен с C_{H3} -доменом через V_H -домен. Вторая из более коротких цепей может иметь V_L -домен на N-конце и C_L -домен на С-конце. Вторая главная цепь может иметь V_H -домен на N-конце и C_{H1} -домен на С-конце. Вторая главная цепь может иметь также C_{H2} - и C_{H3} -домены, а также С-терминальный scFv-фрагмент. scFv-фрагмент может быть сопряжен с C_{H3} -доменом через V_H -домен.

"Биспецифическая" или "бифункциональная" молекула антитела представляет собой молекулу ан-

титела, которая имеет два разных эпитоп/антигенсвязывающих сайта и, соответственно, обладает специфичностью связывания с двумя разными эпитопами-мишенями. Эти два эпитопа могут быть эпитопами одного и того же антигена или разных антигенов. В отличие от этого "бивалентное антитело" может иметь сайты связывания идентичной антигенной специфичности.

"Биспецифическое антитело" может представлять собой молекулу антитела, которая связывается с одним антигеном или эпитопом на одном из двух или более плеч связывания, определяемых первой парой тяжелой и легкой цепей или главной и более короткой/меньшей цепей (см. выше), и связывается с другим антигеном или эпитопом на втором плече, определяемом второй парой тяжелой и легкой или главной и меньшей цепей. Такой вариант реализации биспецифического антитела имеет два антигенсвязывающих плеча, отличающихся как специфичностью, так и последовательностями CDR. Как правило, биспецифическое антитело является моновалентным для каждого антигена, с которым оно связывается. Биспецифическое антитело представляет собой гибридную молекулу антитела, которая может иметь первую область связывания, определяемую первой вариабельной областью легкой цепи и первой вариабельной областью тяжелой цепи, и вторую область связывания, определяемую второй вариабельной областью легкой цепи и второй вариабельной областью тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации одна из этих областей связывания может быть определена парой тяжелой/легкой цепей. Как разъяснено выше, в контексте настоящего изобретения молекула биспецифического антитела имеет первый сайт связывания, определяемый вариабельными областями главной цепи и меньшей цепи, и второй (другой) сайт связывания, определяемый вариабельной областью scFv-фрагмента, включенного в главную цепь молекулы антитела.

Способы получения молекулы биспецифического антитела известны из уровня техники; ими являются, например, химическая конъюгация двух различных моноклональных антител или также, например, химическая конъюгация двух фрагментов антитела, например двух Fab-фрагментов. В качестве альтернативы молекулы биспецифического антитела получают рекомбинантным способом. Традиционно рекомбинантное получение биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар Н-цепь-Л-цепь иммуноглобулина, где две Н-цепи обладают различной специфичностью связывания. Вследствие случайного подбора Н- и Л-цепей получают потенциальную смесь из десяти различных структур антитела, из которых только одно имеет желаемую специфичность связывания. Альтернативный подход включает слияние вариабельных доменов, характеризующихся желаемой специфичностью связывания, с константной областью тяжелой цепи, включающей по меньшей мере часть шарнирной области, C_{H2} - и C_{H3} -области. В одном варианте реализации C_{H1} -область, содержащая сайт, требуемый для связывания легкой цепи, присутствует по меньшей мере в одном из слияний. ДНК, кодирующую эти слияния, и при необходимости Л-цепь подвергают инсерции в отдельные векторы экспрессии и затем котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. При этом существует возможность инсерции кодирующих последовательностей для двух или всех трех цепей в один вектор экспрессии.

Молекула биспецифического антитела согласно изобретению может действовать в отношении каждой мишени как моноклональное антитело (MAb). В некоторых вариантах реализации антитело может быть химерным, гуманизированным или полностью человеческим.

В целом "антитело с двойной специфичностью", которое может быть, например, иммуноглобулином полной длины или конструктором со свойствами связывания наподобие иммуноглобулина, следует понимать, как такое, которое имеет два плеча связывания, в частности плечи, характеризуемые парой HC/LC, каждая из которых может связывать два разных антигена или эпитопа (см. публикацию PCT WO 02/02773). Соответственно связывающий белок с двойной специфичностью имеет два идентичных антигенсвязывающих плеча с идентичной специфичностью и идентичными CDR-последовательностями, и является бивалентным для каждого антигена, с которым он связывается.

Т-клеточный рецептор (TCR) представляет собой конкретный рецептор на клеточной поверхности Т-клеток, т.е. Т-лимфоцитов. In vivo Т-клеточный рецептор существует в виде комплекса из нескольких белков. В целом Т-клеточный рецептор имеет две отдельные пептидные цепи, как правило альфа- и бета-цепи Т-клеточного рецептора (цепи $TCR\alpha$ и $TCR\beta$), у некоторых Т-клеток имеется Т-клеточный рецептор с гамма- и дельта-цепями ($TCR\gamma$ и $TCR\delta$). Другими белками в комплексе являются белки CD3: гетеродимеры $CD3\epsilon\gamma$ и $CD3\epsilon\delta$ и, самое главное, гомодимер $CD3\zeta$, который имеет в общей сложности шесть ITAM-мотивов. ITAM-мотивы на $CD3\zeta$ могут быть фосфорилированы посредством Lck и, в свою очередь, привлечь ZAP-70. Lck и/или ZAP-70 также может фосфорилировать тирозины на многих других молекулах, особенно CD28, LAT и SLP-76, что обеспечивает агрегацию сигнальных комплексов вокруг этих белков.

Молекула антитела согласно изобретению включает легкую цепь с V_L -доменом и C_L -доменом. Кроме того, молекула антитела включает главную цепь, которая включает V_H -домен, C_{H1} -домен и шарнирную область. V_H -домен расположен на N-конце главной цепи, при этом V_H -домен связан с C_{H1} -доменом напрямую или через связывающий пептид, обычно состоящий из 20 или менее, в том числе 10 или менее, аминокислотных остатков. Шарнирная область связана с С-концом C_{H1} -домена. Таким образом, часть молекулы антитела, которая определена смежным расположением V_L -, C_L -, V_H - и C_{H1} -домена, а

также шарнирной области, может быть взята для определения Fab-фрагмента и, следовательно, называется именно так. Как и в иммуноглобулине естественного происхождения, конъюгация V_H - и V_L -домена друг с другом определяет один антигенсвязывающий сайт. Следовательно, Fab-фрагмент антитела по изобретению содержит сайт связывания с первым антигеном. В соответствующей молекуле антитела легкая цепь связана с главной цепью дисульфидной связью. В некоторых вариантах реализации молекула антитела согласно изобретению представляет собой димер, который включает две главные цепи и две легкие цепи, как описано выше (также см. ниже).

В некоторых вариантах реализации последовательность рекомбинантной молекулы биспецифического антитела, согласно изобретению, можно сопоставить с последовательностью IgG1, поскольку последовательность молекулы антитела по изобретению имеет определенную степень сходства с последовательностью IgG1, как дополнительно показано ниже. По сравнению с аминокислотной последовательностью IgG1 по Кабату и др. (1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda) главная цепь молекулы антитела по изобретению в некоторых вариантах реализации включает V_H -домен в позициях аминокислоты 1-117, C_{H1} -домен в позициях 118-215, шарнирную область в позициях 216-230 и C_{H2} -домен в позициях 231-340.

В этих вариантах реализации в соответствии с аминокислотной последовательностью главной цепи антитела согласно изобретению Fab-фрагмент, состоящий из V_H -домена, C_{H1} -домена и шарнирной области, обычно охватывает аминокислоты 1-230. В составе этого Fab-фрагмента V_H -домен обычно определен аминокислотами 1-118, C_{H1} -домен определен аминокислотами 119-216, а шарнирная область определена аминокислотами 217-231 согласно нумерации Кабата. Цепь антитела с последовательностью SEQ ID NO: 6 может служить примером соответствующего варианта реализации. В некоторых вариантах реализации молекула антитела согласно изобретению в позициях 342 и далее главной цепи имеет химерную последовательность, составленную из V_H -домена и V_L -домена. В некоторых вариантах реализации V_H -домен расположен так, что он определяет С-концевой домен этой химерной последовательности. В некоторых вариантах реализации антитело по изобретению, в отличие от аминокислотной последовательности IgG1 по Кабату и др., имеет C_{H3} -домен в позициях 342-447, после которого следует химерная последовательность, составленная из V_H -домена и С-концевого V_H -домена. В таких вариантах реализации, где C_{H3} -домен включен в состав антитела, согласно изобретению этот C_{H3} -домен определен аминокислотами 342-448 в соответствии с аминокислотной последовательностью главной цепи молекулы антитела. Химерная последовательность, составленная из V_H -домена и V_L -домена, которые в этих вариантах реализации могут быть С-концевыми (см. выше), в этих реализациях находится в позициях 449 и далее аминокислотной последовательности главной цепи молекулы антитела.

Молекула биспецифического антитела по изобретению может иметь два сайта связывания любой желаемой специфичности. В некоторых вариантах реализации один из сайтов связывания способен к связыванию опухоль-ассоциированного антигена. В некоторых вариантах реализации сайт связывания, включенный в состав Fab-фрагмента, представляет собой сайт связывания, который специфичен в отношении поверхностного опухоль-ассоциированного антигена. В некоторых вариантах реализации сайт связывания, включенный в состав одноцепочечного Fv-фрагмента, представляет собой сайт связывания, который специфичен в отношении опухоль-ассоциированного антигена, такого как поверхностный опухоль-ассоциированный антиген.

Используемый здесь термин "поверхностный опухоль-ассоциированный антиген" относится к антигену, который присутствует или может присутствовать на поверхности, расположенной на или внутри опухолевых клеток. Эти антигены могут присутствовать на поверхности клетки с внеклеточной частью, которая зачастую скомбинирована с трансмембранной и цитоплазматической частью молекулы. Эти антигены в некоторых вариантах реализации могут быть презентированы только опухолевыми клетками, а не нормальными, т.е. неопухолевыми клетками. Опухолевые антигены могут экспрессироваться исключительно на опухолевых клетках или могут выражать опухоль-специфическую мутацию по сравнению с неопухолевыми клетками. В таком варианте реализации соответствующий антиген может называться опухоль-специфическим антигеном. Некоторые антигены презентируются как опухолевыми, так и неопухолевыми клетками, которые могут называться опухоль-ассоциированными антигенами. Эти опухоль-ассоциированные антигены могут сверхэкспрессироваться на опухолевых клетках по сравнению с неопухолевыми клетками или быть доступными для связывания антителом в опухолевых клетках в силу менее компактной структуры опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой тканью. В некоторых вариантах реализации поверхностный опухоль-ассоциированный антиген расположен на сосудистой сети опухоли.

Примерами, иллюстрирующими поверхностный опухоль-ассоциированный антиген, являются CD10, CD19, CD20, CD22, CD33, Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT-3, CD135), хондроитинсульфат-протеогликан 4 (CSPG4, ассоциированный с меланомой хондроитинсульфатпротеогликан), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), Her2/neu, Her3, IGFR, CD133, IL3R, фибробласт-активирующий белок (FAP), CDCP1, Derlin1, тенасцин, "frizzled 1-10", сосудистые антигены VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), PDGFR- α (CD140a), PDGFR- β (CD140b) эндоглин, CLEC14, Tem1-8 и Tie2. Еще одни примеры могут включать в себя A33, CAMPATH-1 (CDw52), карциноэмбриональный антиген

(CEA), карбоангидраза IX (MN/CA IX), CD21, CD25, CD30, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD133, de2-7 EGFR, EGFRvIII, EpCAM, Ep-CAM, фолатсвязывающий протеин, G250, Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT-3, CD135), c-Kit (CD117), CSF1R (CD115), HLA-DR, IGFR, IL-2-рецептор, IL3R, MCSP (ассоциированный с меланомой поверхностно-клеточный хондроитинсульфатпротеогликан), Muc-1, простата-специфический мембранный антиген (PSMA), антиген стволовой клетки простаты (PSCA), простата-специфический антиген (PSA) и TAG-72. Примерами антигенов, экспрессирующихся на внеклеточном матриксе опухолей, являются тенасцин и фибробласт-активирующий белок (FAP).

В некоторых вариантах реализации один из сайтов связывания молекулы антитела по изобретению способен к связыванию молекулы специфического Т-клеточного рецептора и/или молекулы специфического рецептора естественной клетки-киллера (NK-клетки). Специфический Т-клеточный рецептор представляет собой так называемый "Т-клеточный рецептор" (TCR), который обеспечивает Т-клетке возможность связывания с эпитопом/антигеном и, при наличии дополнительных сигналов, активации эпитопом/антигеном и отклика на эпитоп/антиген, при этом указанный эпитоп/антиген презентуется другой клеткой, называемой антиген-презентирующей клеткой или APC. Известно, что Т-клеточный рецептор имеет сходство с Fab-фрагментом иммуноглобулина естественного происхождения. В целом он является моновалентным, охватывает α - и β -цепи, а в некоторых вариантах реализации он охватывает γ - и δ -цепи (см. выше). Соответственно в некоторых вариантах реализации TCR представляет собой TCR (альфа/бета), а в некоторых вариантах реализации он представляет собой TCR (гамма/дельта). Т-клеточный рецептор образует комплекс с Т-клеточным корецептором CD3. CD3 представляет собой комплекс белка, и он составлен из четырех различных цепей. У млекопитающих этот комплекс состоит из CD3 γ -цепи, CD3 δ -цепи и двух CD3 ϵ -цепей. Эти цепи ассоциируются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR) и ζ -цепью для генерирования сигнала активации в Т-лимфоцитах. Таким образом, в некоторых вариантах реализации специфический Т-клеточный рецептор представляет собой Т-клеточный корецептор CD3. В некоторых вариантах реализации специфическим Т-клеточным рецептором является CD28, белок, также экспрессирующийся на Т-клетках. CD28 может обеспечить костимулирующие сигналы, необходимые для активации Т-клеток. CD28 выполняет важные функции в пролиферации и выживании Т-клеток, выработке цитокинов и развитии Т-хелпера типа 2. Еще одним примером специфического Т-клеточного рецептора является CD134, называемый также Oх40. CD134/OX40 экспрессируется через 24-72 ч после активации и может быть взят для определения вторичной костимулирующей молекулы. Другим примером Т-клеточного рецептора является 4-1BB, способный связываться с 4-1BB-лигандом на антиген-презентирующих клетках (APC), посредством чего генерируется костимулирующий сигнал для Т-клетки. Другим примером рецептора, присутствующего преимущественно на Т-клетках, является CD5, который также находится на В-клетках на низких уровнях. Еще одним примером рецептора, модифицирующего функции Т-клеток, является CD95, известный также как Fas-рецептор, который опосредует апоптотический сигналинг Fas-лигандом, экспрессирующимся на поверхности других клеток. Было сообщено, что CD95 модулирует TCR/CD3-активируемые пути сигналинга в покоящихся Т-лимфоцитах.

Примером молекулы специфического NK-клеточного рецептора является CD16, низкоаффинный Fc-рецептор и NKG2D. Примером молекулы рецептора, которая презентуется на поверхности как Т-клеток, так и естественных клеток-киллеров (NK-клеток), является CD2 и другие члены CD2-суперсемейства. CD2 может действовать как костимулирующая молекула на Т- и NK-клетках.

В некоторых вариантах реализации первый сайт связывания молекулы антитела связывает поверхностный опухоль-ассоциированный антиген, а второй сайт связывания связывает молекулу специфического Т-клеточного рецептора и/или молекулу специфического рецептора естественной клетки-киллера (NK). В некоторых вариантах реализации первый сайт связывания молекулы антитела связывает один из следующих: A33, CAMPATH-1 (CDw52), карциноэмбриональный антиген (CEA), карбоангидраза IX (MN/CA IX), CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD133, CDCP1, Her3, хондроитинсульфатпротеогликан 4 (CSPG4, ассоциированный с меланомой хондроитинсульфатпротеогликан), CLEC14, Derlin1, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), de2-7 EGFR, EGFRvIII, EpCAM, эндоглин, EP-CAM, фибробласт-активирующий белок (FAP), фолатсвязывающий белок, G250, Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT-3, CD135), c-Kit (CD117), CSF1R (CD115), "frizzled 1-10", Her2/neu, HLA-DR, IGFR, рецептор IL-2, IL3R, MCSP (ассоциированный с меланомой поверхностно-клеточный хондроитинсульфатпротеогликан), Muc-1, простата-специфический мембранный антиген (PSMA), антиген стволовой клетки простаты (PSCA), простата-специфический антиген (PSA), TAG-72, тенасцин, Tem1-8, Tie2 и VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), PDGFR- α (CD140a), PDGFR- β (CD140b), а второй сайт связывания связывает молекулу специфического Т-клеточного рецептора и/или молекулу специфического рецептора естественной клетки-киллера (NK). В некоторых вариантах реализации первый сайт связывания молекулы антитела связывает поверхностный опухоль-ассоциированный антиген, а второй сайт связывания связывает один из CD3, Т-клеточный рецептор (TCR), CD28, CD16, NKG2D, Oх40, 4-1BB, CD2, CD5 и CD95.

В некоторых вариантах реализации первый сайт связывания молекулы антитела связывает молекулу специфического Т-клеточного рецептора и/или молекулу специфического рецептора естественной

клетки-киллера (NK), а второй сайт связывания связывает поверхностный опухоль-ассоциированный антиген. В некоторых вариантах реализации первый сайт связывания антитела связывает молекулу специфического Т-клеточного рецептора и/или молекулу специфического рецептора естественной клетки-киллера (NK), а второй сайт связывания связывает один из следующих: A33, CAMPATH-1 (CDw52), карциноэмбриональный антиген (CEA), карбоангидраза IX (MN/CA IX), CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD133, CDCP1, Her3, хондроитинсульфатпротеогликан 4 (CSPG4, ассоциированный с меланомой хондроитинсульфатпротеогликан), CLEC14, Derlin1, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), de2-7 EGFR, EGFRvIII, EpCAM, эндоглин, EP-CAM, фибробласт-активирующий белок (FAP), фолатсвязывающий белок, G250, Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT-3, CD135), "frizzled 1-10", Her2/neu, HLA-DR, IGFR, рецептор IL-2, IL3R, MCSP (ассоциированный с меланомой поверхностно-клеточный хондроитинсульфатпротеогликан), Muc-1, простата-специфический мембранный антиген (PSMA), простата-специфический антиген (PSA), TAG-72, тенасцин, Tem1-8, Tie2 и VEGFR. В некоторых вариантах реализации первый сайт связывания антитела связывает один из следующих: CD3, Т-клеточный рецептор (TCR), CD28, CD16, NKG2D, Oх40, 4-1BB, CD2, CD5 и CD95, а второй сайт связывания связывает поверхностный опухоль-ассоциированный антиген.

Термин "гликозилирование" означает присоединение олигосахаридов (углеводов, содержащих два или больше простых сахаров, связанных вместе, например от двух до двенадцати простых сахаров, связанных вместе) к гликопротеину. Боковые цепи олигосахаридов обычно связаны с каркасом гликопротеина посредством N- или O-связей. Олигосахариды антител, раскрытых здесь, в целом присоединены к C_{H2}-домену Fc-области в виде N-сцепленные олигосахаридов. "N-сцепленное гликозилирование" относится к присоединению углеводного фрагмента к аспарагиновому остатку в гликопротеиновой цепи. Специалисту в данной области техники будет ясно, что, например, C_{H2}-домены каждого из мышиных IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 и человеческих IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgD имеют один сайт для N-сцепленного гликозилирования в остатке 297.

Последовательности доменов или областей, включенных в молекулу антитела, согласно изобретению могут представлять собой последовательности любых разновидностей. Тем не менее в зависимости от последующего применения молекулы антитела, в некоторых вариантах реализации может быть желательно внесение изменений, предотвращающих нежелательные побочные эффекты, вызываемые антителом. Применение интактных нечеловеческих антител в лечении болезней или расстройств у человека несет с собой потенциальную иммуногенность со всеми хорошо известными последствиями, что означает, что иммунная система пациента может распознать нечеловеческое интактное антитело как чужеродное и выработать нейтрализующую реакцию. Это особенно очевидно при многократном введении нечеловеческого антитела пациенту-человеку. В течение многих лет для решения этих задач были разработаны различные методики, которые в целом включают снижение содержания нечеловеческих аминокислотных последовательностей в интактном антителе, сохраняя при этом относительную простоту получения нечеловеческих антител от иммунизированных животных, например мыши, крысы или кролика. Для достижения этих целей было выработано два общих подхода. Первый - это химерные антитела, которые в целом имеют нечеловеческий (а, например, относящийся к грызуну, такому как мышь) переменный домен, сцепленный с константной областью человека. В силу того что антигенсвязывающий сайт антитела определяется остатками внутри переменных доменов, химерное антитело сохраняет свою аффинность к антигену, но приобретает эффекторные функции константной области человека и, следовательно, способно выполнять эффекторные функции, как описано выше. Химерные антитела обычно получают, используя методы рекомбинантных ДНК. ДНК, кодирующую антитела (например, кДНК), выделяют и секвенируют с использованием стандартных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфично связываться с генами, кодирующими H- и L-цепи антитела по изобретению). Гибридомные клетки служат типичным источником такой ДНК. После выделения ДНК помещают в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как *E.coli*, COS-клетки, CHO-клетки или клетки миеломы, которые без этого не продуцируют белок иммуноглобулина для синтеза антитела. ДНК может быть модифицирована путем замены кодирующей последовательности для L- и H-цепей человека соответствующими нечеловеческими H- и L-константными областями, например мышиными (см., например, Morrison, PNAS (1984), 81, 6851).

Второй подход включает генерирование гуманизированных антител, при которой не принадлежащее человеку содержимое антитела уменьшают за счет гуманизации переменных доменов. Распространение получили две методики гуманизации. Первая заключается в гуманизации путем трансплантации CDR. CDR определяют петли (см. выше), при этом антигенсвязывающая специфичность антитела главным образом определяется топографией и химическими характеристиками поверхности его CDR. Эти особенности, в свою очередь, определяются конформацией индивидуальных CDR, относительным расположением CDR, а также природой и расположением боковых цепей остатков, содержащих CDR. Значительное снижение иммуногенности может быть достигнуто за счет трансплантации CDR только нечеловеческих, например мышиных ("донорских") антител на человеческий каркас ("акцепторный каркас") и константные области (см. Jones et al. (1986), Nature, 321, 522-525; Verhoeyen M. et al. (1988), Science, 239, 1534-1536). Однако сама по себе трансплантация CDR может не обеспечить полное сохранение антиген-

связывающих свойств и часто оказывается, что некоторые каркасные остатки (иногда называемые "обратными мутациями") донорского антитела должны быть сохранены в гуманизированной молекуле, если необходимо восстановить значительный уровень антиген-связывающей аффинности (см. Queen C. et al. (1989), PNAS, 86, 10,029-10,033; Co, M. et al. (1991), Nature, 351, 501-502). В этом случае из базы данных выбирают человеческие вариабельные домены, демонстрирующие наибольшую гомологию последовательностей относительно нечеловеческого донорского антитела, для формирования человеческого каркаса (FR). FR человека выбирают как из общетипичных, так и из индивидуальных человеческих антител. Где это необходимо, ключевые остатки из донорского антитела заменяют в человеческом акцепторном каркасе, чтобы сохранить CDR-конформации, при этом для помощи при идентификации таких структурно важных остатков может быть применено компьютерное моделирование антитела. См., например, WO 99/48523.

В качестве альтернативы гуманизация может быть достигнута способом "маскировки". Статистический анализ уникальных человеческих и мышиных вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина показал, что точные шаблоны подвергнутых воздействию остатков отличаются у человеческих и мышиных антител и наиболее индивидуальные позиции на поверхности являются более предпочтительными по сравнению с малым числом разных остатков (см. Padlan E.A. et al. (1991), Mol. Immunol., 28, 489-498; и Pedersen J.T. et al. (1994), J. Mol. Biol., 235, 959-973). Следовательно, можно снизить иммуногенность нечеловеческого Fv путем замены подвергнутых воздействию остатков в его каркасных областях, отличающиеся от тех, которые обычно находятся в антителах человека. Поскольку антигенность белка может быть связана с поверхностной доступностью, замены поверхностных остатков может быть достаточно, чтобы сделать вариабельный домен грызуна "невидимым" для иммунной системы человека (см. также Mark G.E. et al. (1994) в Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, p. 105-134). Эту процедуру гуманизации называют "маскировкой", поскольку при ней изменяют только поверхность антитела, а опорные остатки остаются нетронутыми.

Молекула антитела по изобретению может быть получена с использованием любой известной и широко применяемой системы экспрессии и рекомбинантной технологии культивирования клеток, например экспрессии в бактериях-хозяевах (прокариотических системах) или эукариотических системах, таких как дрожжи, грибы, клетки насекомых или клетки млекопитающих. Молекула антитела по настоящему изобретению может быть получена в трансгенных организмах, таких как коза, растение или трансгенная мышь "XENOMOUSE", сконструированных путем инжиниринга породы мыши, которая имеет крупные фрагменты локусов иммуноглобулина человека и является дефицитной в отношении продуцирования антитела мыши. Антитело также может быть получено путем химического синтеза.

Как правило, для рекомбинантного получения молекулы антитела по изобретению полинуклеотид, кодирующий антитело, выделяют и подвергают inserции в реплицирующийся вектор, такой как плазмида, для последующего клонирования (амплификации) или экспрессии. Примером, иллюстрирующим подходящую систему экспрессии, является система глутаматсинтетазы (например, продаваемая Lonza Biologies), при этом клетка-хозяин представляет собой, например, CHO или NS0. Полинуклеотид, кодирующий антитело, легко выделяют и секвенируют с использованием традиционных процедур. Векторы, которые могут быть использованы, включают в себя плазмиду, вирус, фаг, транспозоны, минихромосомы, среди которых типичным вариантом реализации являются плазмиды. В целом такие векторы дополнительно включают сигнальную последовательность, ориджин репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательности терминирования транскрипции, функционально сцепленные с полинуклеотидом легкой и/или тяжелой цепей, способствуя экспрессии. Полинуклеотиды, кодирующие легкую и тяжелую цепи, могут быть подвергнуты inserции в отдельные векторы и трансфицированы в одну и ту же клетку-хозяина, или при необходимости тяжелая цепь и легкая цепь могут быть подвергнуты inserции в один и тот же вектор для трансфекции в клетку-хозяина. Обе цепи, например, могут быть скомпонованы под контролем бицистронного оперона и экспрессироваться, чтобы дать в результате функциональную и корректно сложенную молекулу антитела, как описано в Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia coli, Gene, 151, 131-135; или Skerra, A. (1994), A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments, Gene, 141, 79-8. Таким образом, в соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения представлен способ конструирования вектора, кодирующего легкую и/или тяжелую цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, причем способ включает inserцию в вектор полинуклеотида, кодирующего легкую цепь и/или тяжелую цепь молекулы антитела по изобретению.

При использовании рекомбинантных методик молекула антитела может быть получена внутриклеточно в периплазматическом пространстве или секретирована непосредственно в среду (см. также Skerra, 1994, выше). Если антитело получено внутриклеточно, на первом этапе дебрис в виде частиц, или клетки-хозяева, или лизированные фрагменты удаляют, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. В публикации Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992) описана процедура выделения антител, секретированных в периплазматическое пространство E.coli. Антитело также может быть получено в

любой окислительной среде. Такая окислительная среда может быть получена периплазмой грамотрицательных бактерий, таких как *E.coli*, во внеклеточной среде грамположительных бактерий, или в полости эндоплазматического ретикулума эукариотических клеток (включая клетки животных, такие как клетки насекомых или млекопитающих), и обычно способствует образованию структурных дисульфидных связей. Однако также возможно получение молекулы антитела по изобретению в цитозоли клетки-хозяина, такой как *E.coli*. В таком случае полипептид может быть получен или напрямую в растворимом и сложенном состоянии или восстановлен в форме телец включения с последующей ренатурацией *in vitro*. Еще одним вариантом является использование специфических штаммов-хозяев, имеющих окислительную внутриклеточную среду, которая, таким образом, может способствовать формированию дисульфидных связей в цитозоли (Venturi M., Seifert C., Hunte C. (2002), High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm, *J. Mol. Biol.*, 315, 1-8).

Молекула антитела, продуцированная клетками, может быть очищена любым традиционным способом очистки, например гидроксилапатитовой хроматографией, гель-электрофорезом, диализом и аффинной хроматографией, которая является одной предпочтительной методикой очистки. Молекулы антител могут быть очищены аффинной очисткой белками/лигандами, специфично и обратимо связывающими константные домены, такие как C_{H1} или C_L . Примерами таких белков являются иммуноглобулин-связывающие бактериальные белки, такие как белок A, белок G, Белок A/G или белок L, причем связывание белка L ограничено молекулами антител, которые содержат легкие каппа-цепи. Альтернативным способом очистки антител с легкими k-цепями является использование нагруженных гранулами антител к каппа (KappaSelect). Пригодность белка A в качестве аффинного лиганда зависит от разновидности и изотипа любого Fc-домена иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок A может использоваться для очистки антител (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех мышинных изотипов и для $\gamma 3$ человека (Guss et al., *EMBO J.*, 5:15671575 (1986)). Выбор способа очистки, используемого для конкретной молекулы антитела согласно изобретению, находится в компетенции специалиста в данной области техники.

Также можно снабдить одну из цепей молекулы антитела по изобретению аффинным маркером. Такие аффинные маркеры, как Strep-tag® или Strep-tag® II (Schmidt, T.G.M. et al. (1996), *J. Mol. Biol.*, 255, 753-766), myc-tag, FLAG™-tag, His6-tag или HA-tag, обеспечивают легкое распознавание, а также простую очистку рекомбинантной молекулы антитела.

Термины "мутировавший/мутированный", "мутант/мутантный" и "мутация/мутирование", используемые в отношении нуклеиновой кислоты или полипептида, обозначают замену, делецию или инсерцию одного или более нуклеотидов или аминокислот соответственно по сравнению с нуклеиновой кислотой или полипептидом естественного происхождения, т.е. эталонной последовательностью, которая может быть взята для определения дикого типа.

В этом отношении следует понимать, что термин "позиция", используемый в контексте данного изобретения, подразумевает позицию аминокислоты в представленной здесь аминокислотной последовательности. Такая позиция может быть обозначена относительно сходной нативной последовательности, например последовательности домена или цепи IgG естественного происхождения. Используемый здесь термин "соответствующий" также включает то, что такая позиция не обязательна или определяется не только количеством предшествующих нуклеотидов/аминокислот. Таким образом, позиция заданной аминокислоты согласно настоящему изобретению, которая может быть заменена, может меняться вследствие делеции или добавления аминокислот в любом месте в цепи антитела.

Следовательно, в контексте изобретения под "соответствующей позицией" следует понимать то, что аминокислоты могут отличаться по обозначенному номеру, однако, все еще имея подобные соседние аминокислоты. Указанные аминокислоты, которые могут быть заменены, удалены или добавлены, также охвачены термином "соответствующая позиция". Чтобы определить, соответствует ли аминокислотный остаток в заданной аминокислотной последовательности определенной позиции в аминокислотной последовательности домена или цепи иммуноглобулина естественного происхождения, специалист может использовать средства и способы, которые широко известны в данной области техники, например выравнивание вручную или с использованием таких компьютерных программ, как BLAST2.0, что расшифровывается, как "средство поиска основного локального выравнивания", или ClustalW, или любой другой программы, которая пригодна для генерирования выравниваний последовательностей.

В некоторых вариантах реализации под заменой (или замещением) подразумевается консервативная замена. В целом консервативными заменами являются следующие замены, перечисленные в соответствии с аминокислотами, подлежащими мутации, за каждым из которых следует одна или более замен, которые можно принять за консервативные: Ala→Gly, Ser, Val; Arg→Lys; Asn→Gln, His; Asp→Glu; Cys→Ser; Gln→Asn; Glu→Asp; Gly→Ala; His→Arg, Asn, Gln; Ile→Leu, Val; Leu→Ile, Val; Lys→Arg, Gln, Glu; Met→Leu, Tyr, Ile; Phe→Met, Leu, Tyr; Ser→Thr; Thr→Ser; Trp→Tyr; Tyr→Trp, Phe; Val→Ile, Leu. Другие замены также допустимы и могут быть определены эмпирически или по известным консервативным или неконсервативным заменам. В качестве еще одной ориентировки приведены следующие восемь групп, каждая из которых содержит аминокислоты, которые, как правило, могут быть взяты для опреде-

ления консервативных замен между собой:

- 1) аланин (Ala), глицин (Gly);
- 2) аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu);
- 3) аспарагин (Asn), глутамин (Gln);
- 4) аргинин (Arg), лизин (Lys);
- 5) изолейцин (Ile), лейцин (Leu), метионин (Met), валин (Val);
- 6) фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr), триптофан (Trp);
- 7) серин (Ser), треонин (Thr); и
- 8) цистеин (Cys), метионин (Met).

Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то могут быть внесены более существенные изменения, такие как перечисленные ниже или дополнительно описанные ниже в отношении классов аминокислот, после чего продукты скринируют на желаемую характеристику. Примерами таких более существенных изменений являются Ala→Leu, Ile; Arg→Gln; Asn→Asp, Lys, Arg, His; Asp→Asn; Cys→Ala; Gln→Glu; Glu→Gln; His→Lys; Ile→Met, Ala, Phe; Leu→Ala, Met, норлейцин; Lys→Asn; Met→Phe; Phe→Val, Ile, Ala; Trp→Phe; Tyr→Thr, Ser; Val→Met, Phe, Ala.

В некоторых вариантах реализации молекула антитела согласно изобретению включает один или более аминокислотных остатков, в том числе два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать аминокислотных остатков, которые мутированы для предотвращения димеризации через остатки цистеина или для модуляции Fc-функции. В некоторых из этих вариантов реализации мутированными являются один или более аминокислотных остатков C_{H2}-домена и/или шарнирной области, способных опосредствовать связывание с Fc-рецепторами. При наличии один или более аминокислотных остатков, способных опосредствовать связывание с Fc-рецепторами, могут представлять собой аминокислотный остаток, способный активировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или комплемент-опосредованную цитотоксичность (CDC). В некоторых вариантах реализации соответствующий аминокислотный остаток, способный к опосредованию связывания с Fc-рецепторами, заменен другой аминокислотой в целом при сравнении данной последовательности с последовательностью соответствующего домена иммуноглобулина естественного происхождения, такого как IgG. В некоторых вариантах реализации такой аминокислотный остаток, способный опосредовать связывания с Fc-рецепторами, подвергают делеции в целом относительно последовательности соответствующего домена естественного происхождения в иммуноглобулине, таком как IgG. Однако в других вариантах реализации изобретения, когда молекула биспецифического антитела состоит из Fab-фрагмента, одноцепочечного Fv-фрагмента и C_{H2}-домена иммуноглобулина, в объем изобретения входит введение мутаций в C_{H2}-домен человеческого $\gamma 1$, что оптимизирует антителозависимую цитотоксичность (ADCC).

Такие мутации описаны, например, в международных патентных заявках WO 2011/076922 и WO 2011/089211.

В некоторых вариантах реализации один или более мутировавших, например замещенных или подвергнутых делеции, аминокислотных остатков представляют собой аминокислоту, расположенную в одной из позиций 226, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 297, 327 и 330. Здесь также нумерация используемых аминокислот соответствует позициям в последовательности согласно нумерации Кабата (индекс ЕС). Соответствующая делеция аминокислоты может представлять собой, например, делецию аминокислоты 228, в целом пролина в IgG, делецию аминокислоты 229, в целом цистеина в IgG, делецию аминокислоты 230, в целом пролина в IgG, делецию аминокислоты 231, в целом аланина в IgG, делецию аминокислоты 232, в целом пролина в IgG, делецию аминокислоты 233, в целом глутаминовой кислоты в IgG, делецию аминокислоты 234, в целом лейцина в IgG, делецию аминокислоты 235, в целом лейцина в IgG, делецию аминокислоты 236, в целом глицина в IgG, делецию аминокислоты 237, в целом глицина в IgG, делецию аминокислоты 238, в целом пролина в IgG, и делецию аминокислоты 265, в целом аспарагиновой кислоты в IgG. Соответствующая замена аминокислоты может представлять собой, например, замену аминокислоты 226, в целом цистенина в IgG, замену аминокислоты 228, в целом пролина в IgG, замену аминокислоты 229, в целом цистеина в IgG, замену аминокислоты 230, в целом пролина в IgG, замену аминокислоты 231, в целом аланина в IgG, замену аминокислоты 232, в целом пролина в IgG, замену аминокислоты 233, в целом глутаминовой кислоты в IgG, замену аминокислоты 234, в целом лейцина в IgG, замену аминокислоты 235, в целом лейцина в IgG, замену аминокислоты 265, в целом аспарагиновой кислоты в IgG, замену аминокислоты 297, в целом аспарагина в IgG, замену аминокислоты 327, в целом аланина в IgG, и замену аминокислоты 330, в целом аланина в IgG. Соответствующей заменой может быть одна из следующих замен: Cys226®Ser, Cys229®Ser, Glu233®Pro, Leu234®Val, Leu235®Ala, Asp265®Gly, Asn297®Gln, Ala327®Gln, Ala327®Gly и Ala330®Ser. Как можно понять из приведенного выше, в некоторых вариантах реализации один или два остатка цистеина в позициях 226 и 229 в шарнирной области заменяются на другую аминокислоту, например, остатком серина. Таким образом, может быть предотвращено образование дисульфидной связи с другой главной цепью. Кроме того, а также, как описано ниже, делеция и/или замена (мутация) выбранных аминокис-

лотных остатков в C_{H2} -домене, который способен опосредовать связывание с Fc-рецепторами, могут обусловить снижение или потерю молекулой антитела по изобретению активности в части антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности и фиксации комплемента.

Другой тип аминокислотного варианта антитела изменяет исходный профиль гликозилирования (при наличии такового) молекулы антитела. Под изменением понимается делеция из антитела одного или более присутствующих в нем углеводных фрагментов и/или добавление к нему одного или более сайтов гликозилирования, отсутствующих в антителе. Гликозилирование антител обычно осуществляется N- или O-сцеплением. N-сцепление относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X - любая аминокислота, кроме пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного прикрепления углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде формирует потенциальный сайт гликозилирования. O-сцепленное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилоты к гидроксиламинокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя также может быть использован 5-гидроксипролин или 5-гидроксизимин. Добавление сайтов гликозилирования к антителу легко осуществляется путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более из описанных выше трипептидных последовательностей (для N-сцепленных сайтов гликозилирования). Это изменение также может быть осуществлено путем добавления одного или более остатков серина или треонина к последовательности исходного антитела или путем замены ими (для O-сцепленных сайтов гликозилирования).

В контексте данного изобретения в некоторых вариантах реализации часть главной цепи молекулы антитела по изобретению, представляющая Fc-область иммуноглобулина, обычно инертна или оказывает по меньшей мере по существу низкое воздействие в отношении связывания с Fc-рецепторами. Как уже сказано, это достигается путем делеции и/или замены (мутации) по меньшей мере одного из выбранных аминокислотных остатков в C_{H2} -домене, способных опосредовать связывание с Fc-рецептором. Здесь такие молекулы антител также называются "Fc-аттенуированными" или "Fc^{kon}-молекулами антитела. Таким образом, часть цепи антитела по изобретению, которое может быть взято для представления части Fc-фрагмента, т.е. C_{H2} -домен и при наличии C_{H3} -домен, может составлять "каркас" без обеспечения конкретной биологической функции, например эффекторной функции. Однако в настоящем изобретении было выявлено, что этот каркас способен обеспечивать значительные преимущества в части очистки, эффективности продуцирования и/или стабильности молекул антитела по изобретению по сравнению с известными молекулами антител (см. примеры).

В некоторых вариантах реализации распознавание и, соответственно, связывание этой части, соответствующей Fc-фрагменту, с конкретным Fc-рецептором приблизительно в 2 раза, приблизительно в 5 раз, приблизительно в 8 раз, приблизительно в 10 раз, приблизительно в 12 раз, приблизительно в 15 раз, приблизительно в 20 раз или более ниже, чем у Fc-области иммуноглобулина естественного происхождения. В некоторых вариантах реализации эта часть, соответствующая Fc-фрагменту, полностью лишена способности связывания с Fc-рецепторами. Связывание антитела с Fc-рецепторами, включая определение константы диссоциации, может быть легко определено специалистом с применением стандартных методик, таких как поверхностный плазмонный резонанс, с использованием, например, измерений с помощью BiacoreTM. Подобным образом, может быть использован любой другой способ измерения биомолекулярного связывания, который может быть основан, например, на средствах спектроскопии, фотохимии, фотометрии или радиологии. Примерами соответствующих способов обнаружения являются флуоресцентная корреляционная спектроскопия, фотохимическое поперечное сшивание и применение, соответственно, фотоактивных или радиоактивных меток. Некоторые из этих способов могут включать методики дополнительного разделения, такие как электрофорез или ВЭЖХ.

При необходимости для этой цели может быть осуществлена замена или делеция аминокислотных остатков, как объяснено выше. Подходящие мутации могут быть взяты, например, из Armour et al. (Eur. J. Immunol. (1999), 29, 2613-2624). Другие подходящие позиции для мутаций до последовательности цепи антитела могут быть взяты из данных кристаллической структуры, опубликованных в отношении комплекса между FcγRIII и Fc-фрагментом IgG1 человека (Sondermann et al., Nature (2000), 406, 267-273). В дополнение к описанному выше измерению аффинности для оценки уровня "Fc-аттенуации" или потери аффинности также возможна функциональная оценка способности (ее отсутствия) опосредовать связывание с Fc-рецептором. В случае молекул антитела, которые связывают CD3 в качестве одной мишени, можно, например, оценить связывание через митогенность молекул таких CD3-связывающих антител на клетках. Митогенность опосредуется связыванием антител CD3 с Fc-рецепторами на А-клетках, таких как моноциты. Если молекула антитела по изобретению, которая имеет один сайт связывания для CD3, не проявляет никакого митогенного эффекта, в то время как родительское моноклональное анти-CD3 антитело, которое имеет функциональную Fc-часть, индуцирует интенсивный митоз в Т-клетках, становится ясно, что в силу отсутствия митоза молекула антитела по изобретению не обладает способностью к Fc-связыванию и, следовательно, может рассматриваться как молекула "Fc-нокаута". Примеры, иллюст-

рирующие способ оценки анти-CD3-опосредованной митогенности, описаны в Davis, Vida & Lipsky (J. Immunol. (1986), 137, 3758); и Ceuppens, J.L., van Vaecck, F. (см. J. Immunol. (1987), 139, 4067 или Cell. Immunol. (1989), 118, 136). Другие иллюстрирующие примеры оценки митогенности антитела были описаны в Rosenthal-Allieri et al. (Rosenthal-Allieri M.A., Ticcioni M., Deckert M., Breittmeyer J.P., Rochet N., Rouleaux M., Senik A., Bemerda A., Cell Immunol., 1995, 163(1):88-95); и Grosse-Hovest et al. (Grosse-Hovest L., Hartlapp I., Marwan W., Brem G., Rammensee H-G, and Jung G., Eur. J. Immunol. (2003), may, 33(5):1334-1340). В дополнение к этому отсутствие Fc-связывания может быть оценено по способности молекулы антитела согласно изобретению опосредовать одну или более известных эффекторных функций Fc-части.

Как отмечено выше, замены или делеции остатков цистеина могут быть выполнены для введения или удаления одной или более дисульфидных связей, в том числе для введения или удаления потенциальной или ранее существовавшей дисульфидной связи. За счет этого можно управлять связью между главной цепью и более легкой/более короткой цепью молекулы антитела по изобретению, в том числе устанавливать, усиливать или удалять эту связь. Путем введения или удаления одного или более остатков цистеина может быть введен или удален дисульфидный мостик. В качестве иллюстративного примера, тетрамерная молекула антитела по настоящему изобретению имеет одну или более дисульфидных связей, соединяющих две димерные молекулы антитела. Одна такая дисульфидная связь обычно образована цистеином в главной цепи первой димерной молекулы антитела и цистеином в шарнирной области второй димерной молекулы антитела. В этом отношении в некоторых вариантах реализации антитело по изобретению может включать аминокислотную замену нативного остатка цистеина в позициях 226 и/или 229 относительно последовательности IgG человека в соответствии с нумерацией Кабата (индекс E) другим аминокислотным остатком.

Замены или делеции таких аминокислотных остатков, как остатки аргинина, аспарагина, серина, треонина или тирозина, также могут выполняться для модификации профиля гликолизирования антитела. В качестве иллюстративного примера молекула IgG имеет одиночный N-сцепленный биантенарный углевод в Asn297 C_{H2}-домена. Для IgG как сывороточного, так и полученного ex vivo в гибридомах или сконструированных путем инжиниринга клетках, IgG являются гетерогенными относительно присоединенного к Asn-297 углевода. В случае с IgG человека, основной олигосахарид обычно состоит из GlcNAc₂Man₃GlcNAc при отличающихся номерах внешних остатков.

Известно, что, кроме связывания антигенов/эпитопов, иммуноглобулин имеет другие "эффекторные функции", биологические активности, связанные к Fc-областью (Fc-областью с нативной последовательностью или вариантной Fc-областью с аминокислотной последовательностью) иммуноглобулина, и изменяется в зависимости от изотипа иммуноглобулина. Примерами эффекторных функций антитела являются C1q-связывание и комплементзависимая цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; даун-регуляция поверхностно-клеточных рецепторов (например, В-клеточных рецепторов) и активация В-клеток. Осуществление антителом эффекторных функций в целом включает задействование эффекторных клеток. Некоторые эффекторные функции иммуноглобулина опосредуются Fc-рецепторами (FcR), которые связывают Fc-область антитела. FcR определяются их специфичностью к изотипам иммуноглобулина; Fc-рецепторы для антител IgG называются FcγR, для IgE - FcεR, для IgA - FcαR и т.д. Любая из этих эффекторных функций (или потеря этих эффекторных функций), таких как CDC или ADCC, может быть использована для оценки того, отсутствует ли у молекулы антитела по изобретению способность Fc-связывания.

В данном контексте следует отметить, что термин "Fc-рецептор" или "FcR" обозначает рецептор, в целом белок, способный связываться с Fc-областью антитела. Fc-рецепторы расположены на поверхности определенных клеток иммунной системы организма, например естественных клеток-киллеров, макрофагов, нейтрофилов и тучных клеток. In vivo Fc-рецепторы связываются с иммуноглобулинами, иммобилизованными на инфицированных клетках или присутствующими на инвазивных патогенах. Их активность стимулирует фагоцитарные или цитотоксические клетки для уничтожения микробов или инфицированных клеток за счет антитело-опосредованного фагоцитоза или антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности. Некоторые вирусы, такие как флавивirus, используют Fc-рецепторы при инфицировании клеток за счет механизма, известного как антителозависимое усиление инфекции. Обзор рецепторов FcR был сделан в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994); и de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995).

"Комплементзависимая цитотоксичность" или "CDC" относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация пути классического комплемента инициируется путем связывания первого компонента (C1q) системы комплемента с антителами (соответствующего подкласса), связанными со своим распознанным антигеном. Для оценки активации комплемента может быть выполнен CDC-анализ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1997).

Термин "система комплемента" используется в данной области техники для обозначения ряда мелких белков, называемых факторами комплемента, присутствующих в крови, которые в целом циркулируют в виде неактивных предшественников (пробелков). Термин относится к способности этой неизменной и неадаптивной системы "комплементировать" способность антител и фагоцитов для очистки орга-

низма от патогенов, таких как бактерии, а также от комплексов антиген-антитело. Примером факторов комплемента является комплекс C1, включающий C1q и две сериновые протеазы - C1r и C1s. Комплекс C1 представляет собой компонент пути CDC. C1q представляет собой шестивалентную молекулу с молекулярной массой примерно 460000 и структурой, похожей на букет тюльпанов, в котором шесть коллагеновых "стеблей" соединены с шестью сферическими областями, представляющими собой головку. Для активации каскада комплемента необходимо, чтобы C1q связывался по меньшей мере с двумя молекулами из IgG1, IgG2 или IgG3.

Термин "антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или ADCC относится к форме цитотоксичности, при которой секретированные Ig, связанные с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках, таких как естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги, обеспечивают специфическое связывание этих цитотоксических эффекторных клеток с антиген-несущей клеткой-мишенью для последующего киллинга этой клетки-мишени цитотоксинами. Антитела "заряжают" цитотоксические клетки и требуются для киллинга клетки-мишени посредством этого механизма. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематopoэтических клетках обобщена в табл. 3 на странице 464 в публикации Ravetch, Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). Для оценки активности ADCC интересующей молекулы может быть проведен анализ ADCC *in vitro*, как описано в патентах US 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для таких анализов, включают, но без ограничения, периферические мононуклеарные клетки крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). В некоторых вариантах реализации ADCC-активность интересующей молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на модели животного, как описано в Clynes et al., PNAS, USA, 95:652-656 (1998).

Некоторые эффекторные функции антитела опосредуются Fc-рецепторами (FcR), которые связывают Fc-область антитела. FcR определяются специфичностью к изотипам иммуноглобулина; Fc-рецепторы для антител IgG называются FcγR, для IgE - FcεR, для IgA - FcαR и т.д. Было выделено три подкласса FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16).

Переходя далее к нуклеиновым кислотам, согласно изобретению молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая одну или более цепей антитела, согласно изобретению может представлять собой любую нуклеиновую кислоту в любой возможной конфигурации, например одонитевой, двунитевой или их комбинацию. В нуклеиновые кислоты входят, например, молекулы ДНК, молекулы РНК, аналоги ДНК или РНК, генерируемые с использованием аналогов нуклеотидов или с использованием химии нуклеиновых кислот, молекулы закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК) и молекулы белковых нуклеиновых кислот (БНК). ДНК или РНК могут иметь геномное или синтетическое происхождение и могут быть одно- или двунитевыми. Такая нуклеиновая кислота может представлять собой, например, мРНК, кРНК, синтетическую РНК, геномную ДНК, кДНК, синтетическую ДНК, сополимер ДНК и РНК, олигонуклеотиды и т.д. Соответствующая нуклеиновая кислота, кроме того, может содержать ненатуральные аналоги нуклеотидов и/или быть связана с аффинным маркером или меткой.

В некоторых вариантах реализации последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую цепь, такую как главную цепь и/или меньшую цепь, антитела по изобретению, включают в вектор, например плазмиду. Когда необходима замена или делеция в цепи антитела, по сравнению с доменом или областью антитела естественного происхождения, в качестве исходной точки мутагенеза может быть использована кодирующая последовательность соответствующего нативного/ой домена/области, например, входящего/ей в последовательность иммуноглобулина. Для осуществления мутагенеза выбранных аминокислотных позиций в распоряжении специалиста имеются различные стандартные методики сайт-направленного мутагенеза. Общеупотребимой методикой является включение мутаций посредством ПЦР (полимеразной цепной реакции) с использованием смесей синтетических олигонуклеотидов, несущих дегенеративный состав оснований, в заданные позиции последовательности. Например, использование кодона NNK или NNS (где N=аденин, гуанин, цитозин или тимин; K=гуанин или тимин; S=аденин или цитозин) обеспечивает возможность включения всех 20 аминокислот плюс амбер стоп-кодон во время мутагенеза, тогда как кодон VVS ограничивает количество возможных включаемых аминокислот до 12, поскольку он предотвращает включение аминокислот Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val в выбранную позицию последовательности полипептида; использование кодона NMS (где M=аденин или цитозин), например, ограничивает количество возможных аминокислот до 11 в выбранной позиции в последовательности, поскольку он предотвращает включение аминокислот Arg, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Val в выбранную позицию последовательности. В этой связи следует отметить, что кодоны для других аминокислот, отличных от обычных 20 аминокислот естественного происхождения, такие как селеноцистеин или пирролизин, также могут быть включены в нуклеиновую кислоту молекулы антитела. Как описано в Wang, L. et al. (2001), Science, 292, 498-500; или Wang, L. and Schultz, P.G. (2002), Chem. Comm., 1, 1-11 также представляется возможным использование "искусственных" кодонов, таких как UAG, обычно распознаваемых в качестве стоп-кодонов, для инсерции других нестандартных аминокислот, например о-метил-L-тирозина или p-аминофенилаланина.

Другим вариантом включения мутаций в выбранный сегмент последовательности является применение нуклеотидных структурных блоков с пониженной специфичностью пар оснований, например инозина, 8-окса-2'-дезоксигуанозина или 6-(2-деокси-β-D-рибофуранозил)-3,4-дигидро-8Н-пиримин-до-1,2-оксазин-7-она (Zaccolo et al. (1996), *J. Mol. Biol.*, 255, 589-603). Еще одним возможным вариантом является так называемый триплет-мутагенез. В этом способе для включения в кодирующую последовательность используют смеси различных нуклеотидных триплетов, каждый из которых кодирует одну аминокислоту (Virnekas B., et al., 1994, *Nucleic. Acids. Res.*, 22, 5600-5607).

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая цепь, такую как главная цепь и/или меньшая цепь, антитела по изобретению, может экспрессироваться с использованием любой подходящей системы экспрессии, например, в соответствующей клетке-хозяине или в бесклеточной системе. Полученная молекула антитела обогащается за счет отбора и/или выделения.

Как было разъяснено выше, молекула антитела согласно изобретению может быть нацелена на любые необходимые эпитопы/антигены-мишени. В зависимости от выбранных эпитопов/антигенов антитело может быть пригодным в лечении или профилактике заболевания. Следовательно, в некоторых вариантах реализации антитело по изобретению может быть применено в способах лечения и/или профилактики медицинского состояния, такого как расстройство или заболевание. В вариантах реализации, в которых одно из антител, включенных в биспецифичную молекулу, способно активировать иммунные клетки FcR-зависимым образом, может быть особенно полезно выбрать молекулу антитела, имеющую Fc-соответствующую часть, демонстрирующую пониженное связывание с Fc-рецепторами. За счет этого может быть предупреждена нежелательная иммунная активация, опосредованная FcR-связыванием. В некоторых вариантах реализации заболевание, подлежащее лечению или профилактике, может представлять собой пролиферативное заболевание. Примеры пролиферативного заболевания включают, но без ограничения, злокачественные поражения гемопоэтической системы, такие как острый и хронический миеломный и лимфатический лейкозы, а также лимфомы или солидные опухоли. Примеры солидных опухолей включают, но без ограничения, опухоли желудочно-кишечного тракта, костей, легких, почек, простаты, молочной железы, головного мозга, яичника, матки, яичка, мезенхимальных тканей и кожи, например меланома.

В изобретении также представлена фармацевтическая композиция, включающая молекулу антитела согласно изобретению и необязательно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Молекула антитела согласно изобретению может быть введена любым парентеральным или непарентеральным (энтеральным) путем, который является терапевтически эффективным в отношении белковых лекарственных средств. Способы парентерального применения включают, например, внутрикожные, подкожные, внутримышечные, интратрахеальные, интраназальные, интравитреальные или внутривенные инъекции и инфузии, например, в форме растворов для инъекции, растворов для инфузии или тинктур, а также введение и ингаляции аэрозолей, например, в форме аэрозольных смесей, распыляемых растворов или порошков. Обзор способов доставки лекарственного средства в легкие, т.е. путем ингаляции аэрозоля (который также может быть применен при интраназальном введении) или интратрахеального введения, представлен, например, в J.S. Patton et al., *The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery*, *Proc. Amer. Thoracic Soc.*, 2004, vol. 1, p. 338-344. К непарентеральным способам доставки относятся, например, пероральное применение, например, в форме пилюль, таблеток, капсул, растворов или суспензий или ректальное применение, например, в форме суппозитория. Введение молекул антитела по изобретению может осуществляться системно или местно в составах, содержащих любые общепринятые нетоксичные фармакологически приемлемые вспомогательные вещества или носители, добавки и наполнители по мере необходимости.

В одном варианте реализации настоящего изобретения фармацевтическую композицию вводят парентерально млекопитающему и, в частности, человеку. Соответствующие способы введения включают, но без ограничения, например, внутрикожные, подкожные, внутримышечные, интратрахеальные или внутривенные инъекции и инфузии, например, в форме растворов для инъекции, растворов для инфузии или тинктур, а также введение и ингаляции аэрозолей, например, в форме аэрозольных смесей, распыляемых растворов или порошков. В случаях соединений с относительно коротким временем полужизни в сыворотке наиболее удобной может быть комбинация внутривенной и подкожной инфузии и/или инъекции. Фармацевтическая композиция может представлять собой водный раствор, эмульсию типа "масло в воде" или эмульсию типа "вода в масле".

В этом отношении следует отметить, что для трансдермальной доставки молекулы антитела, описанного здесь, также могут быть применены способы трансдермальной доставки, например ионтофорез, сонофорез или доставка с микроигольным усилением, как описано в Meidan V.M., Michniak B.B., 2004, *Am. J. Ther.*, 11(4):312-316. Непарентеральные способы доставки представляют собой, например, пероральное применение, например, в форме пилюль, таблеток, капсул, растворов или суспензий или ректальное применение, например, в форме суппозитория. Введение молекул антитела по изобретению может осуществляться системно или местно в составах, содержащих разнообразные традиционные нетоксичные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества или носители, добавки и наполнители по мере необходимости.

Дозировка применяемой молекулы антитела может варьироваться в широких пределах в зависимости для достижения желаемого профилактического или терапевтического ответа. Это будет зависеть, например, от аффинности молекулы антитела к выбранной мишени, а также от периода полужизни комплекса между молекулой антитела и лигандом *in vivo*. Кроме того, оптимальная дозировка будет зависеть от биораспределения молекулы антитела или ее конъюгата, способа введения, тяжести заболевания/расстройства, подвергаемого лечению, а также медицинского состояния пациента. Например, при местном нанесении в форме мази может быть использована высокая концентрация молекулы антитела. Однако при необходимости молекула антитела также может быть представлена в составе с замедленным высвобождением, например липосомных дисперсий или полимерных микросферах на основе гидрогеля, например PolyActive™ или OctoDEX™ (см. Bos et al., Business Briefing: Pharmatech, 2003, 1-6). Другими доступными составами с замедленным высвобождением являются, например, полимеры на основе PLGA (PR pharmaceuticals), гидрогели на основе PLA-PEG (MedinCell) и полимеры на основе PEA (Medivas).

Таким образом, молекулы антител по настоящему изобретению могут быть включены в композиции с использованием фармацевтически приемлемых ингредиентов и известных способов приготовления (Gennaro, A.L., Gennaro, A.R. (2000), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Для приготовления фармацевтических композиций могут быть применены фармацевтически инертные неорганические или органические вспомогательные вещества. Для приготовления, например, пилюль, порошков, желатиновых капсул или суппозитория может быть использована лактоза, тальк, стеариновая кислота и ее соли, жиры, воски, твердые или жидкие полиолы, натуральные и гидрогенизированные масла.

Подходящими вспомогательными веществами для получения растворов, суспензий, эмульсий, аэрозольных смесей или порошков для разведения в растворах или аэрозольных смесях перед применением являются вода, спирты, глицерин, полиолы и подходящие их смеси, а также растительные масла.

Фармацевтическая композиция может также включать такие добавки, как, например, наполнители, связующие, увлажнители, глйданты, стабилизаторы, консерванты, эмульгаторы и, кроме того, растворители, или солюбилизаторы, или агенты для достижения депонирующего эффекта. Последние предназначены для того, чтобы белки слияния могли быть включены в системы медленного или замедленного высвобождения или системы направленной доставки, такие как липосомы и микрокапсулы.

Составы могут быть подвергнуты стерилизации многочисленными способами, включая фильтрацию через удерживающий бактерии фильтр, или путем включения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены или диспергированы в стерилизованной воде или другой стерилизованной среде непосредственно перед применением.

В медицине существует множество возможных вариантов применения молекулы антитела в соответствии с настоящим изобретением. В дополнение к ее применению в диагностике *in vitro* или доставке лекарственного средства может быть получена молекула антитела по изобретению, которая связывает, например, ткань- или опухоль-специфические клеточно-поверхностные молекулы.

Далее приведены неограничительные примеры, иллюстрирующие изобретение.

Пример 1.

Генерировали биспецифичную бивалентную Fc-аттенуированную молекулу, также обозначаемую, как молекула формата bsFc^{ko}-1/2, с опухолевой X CD3 специфичностью, как схематично изображено на фиг. 1Е. Вносили модификации аминокислот шарнирной области и C_{H2}-домена, как показано на фиг. 1О. Генерировали биспецифические Fc-аттенуированные тетравалентные молекулы, также обозначаемые, как молекулы формата bsFc^{ko}-1, с опухолевой X CD3 специфичностью, как схематично изображено на фиг. 1G. Вносили модификации аминокислот шарнирной области и C_{H2}-домена, как показано на фиг. 1Р.

Клонирование и амплификацию плазмид осуществляли, используя *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen, Карлсруэ, Германия). Построение соответствующих векторов отображено на фиг. 2.

Котрансфекцию векторов экспрессии, кодирующих главную и меньшую цепи, которые также могут называться тяжелой и легкой цепями, с обозначенной специфичностью выполняли в клетках плазмоцитомы Sp2/0, полученных от "American Type Culture Collection" (ATCC, Манассас, штат Виргиния). Структура соответствующих векторов изображена на фиг. 2 (см. также пример 2 ниже). Клетки культивировали в средах EMDM с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (PAN-Biotech, Айденбах, Германия), 1% пенициллина и стрептомицина (Lonza, Базель, Швейцария). Стабильные трансфектанты отбирали путем добавления 1 мг/мл G418 (Invitrogen, Карлсруэ, Германия).

Биспецифические антитела очищали от супернатантов культур стабильно трансфицированных клеток путем аффинной хроматографии, используя белок А для формата Fc^{ko}-1 и KappaSelect для формата bsFc^{ko}-1/2 (обе среды для хроматографии были получены от GE Healthcare, Мюнхен, Германия).

Пример 2.

В векторе экспрессии V-области иммуноглобулина объединяли с желаемыми константными С-областями. Указанная здесь процедура клонирования обеспечивает возможность включения полных V-областей Ig и их экспрессии в лимфоидных клетках без каких-либо изменений их аминокислотной последовательности. С этой целью нуклеотидную последовательность VDJ- и VJ-фрагмента моноспеци-

фического антитела использовали для конструирования пар праймеров (C-C, D-D'; табл. 1). Реамплифицированные фрагменты ДНК V-сегментов расщепляли (VJ - напрямую, а VDJ - после реамплификации с парой праймеров E-E', табл. 1) с помощью соответствующих нуклеаз рестрикции (резюмировано в табл. 1), а затем лигировали в векторы экспрессии. В качестве альтернативы V-домены синтезировали как фрагменты ДНК в GeneArt, Регенсбург, Германия. Этот способ использовали для кодирования генов для V-областей антитела, направленного на EGFR (клон K225). Векторы (фиг. 2) содержат гены тяжелой и легкой константной области человека. Таким образом, инсерция амплифицированных и расщепленных V-сегментов восстанавливает исходную геномную организацию генов Ig в векторах без изменения какой-либо аминокислоты в V-областях.

Исходный вектор для тяжелой цепи содержит тяжелую цепь изотипа $\gamma 1$ человеческого Ig (фиг. 2A). Сайты рестрикции вводили в требуемых позициях в интронах для замещения AatII-ClaI-фрагмента на VDJ-фрагмент тяжелой цепи моноклональных антител 4G8 (анти-FLT3), BV10 (анти-FLT3), 4G7 (анти-CD19), C225 (анти-EGFR) и 9.2.27 (анти-CSPG4) или любого другого моноклонального антитела. Область, релевантная для клонирования VDJ-фрагмента, показана увеличенной на фиг. 2B. Фрагмент, подлежащий замещению, содержит части первого интрона с сайтом рестрикции AatII, второй экзон лидерной последовательности, VDJ-область и часть интрона тяжелой цепи с сайтом рестрикции ClaI. Для замены всех экзонов константной области тяжелой цепи человеческого $\gamma 1$ сайты рестрикции вводили в заданные позиции в интроне тяжелой цепи (MluI) и в поли A-области тяжелой цепи 5'-UTR (pA-область; SpeI), как показано на фиг. 2A и 2C.

Кроме того, после конструирования векторов экспрессии возможно замещение всей константной области изотипа $\gamma 1$ человеческого Ig (фрагмент MluI-SpeI; см фиг. 2A) или на константные области всех других изотипов антитела или на Fc-части с оптимизированной или пониженной эффекторной функцией. В случае антител, оптимизированных для запуска ADCC, аминокислотные замены вводили в C_{H2}-домен константной области человеческого $\gamma 1$, как показано в международных патентных заявках WO 2011/076922 и WO 2011/089211. Для получения биспецифических антител, показанных на фиг. 1A-1N, можно выполнить инсерцию MluI- и SpeI-фланкированных фрагментов ДНК, содержащих экзоны, кодирующие дикий тип, или модифицированные константные области тяжелой цепи Ig. Подлежащий замещению фрагмент MluI-SpeI показан увеличенным на фиг. 2C. Чтобы дополнить биспецифическое антитело специфичностью ко второму антигену, можно включить scFv-фрагменты с ориентацией V_H-V_L или V_L-V_H через сайты ферментов рестрикции BspEI и SpeI, что также показано на фиг. 2A. Область, релевантная для клонирования scFv-фрагмента в ориентации V_L-V_H, показана увеличенной на фиг. 2C. ScFv-фрагменты со специфичностью к CD3 (гуманизированный клон UCHT1; ориентация V_L-V_H), CD28 (клон 9.3; ориентация V_L-V_H), TCR α/β (клон BMA031; ориентация V_H-V_L) получали путем ПЦР с олигонуклеотидами F и F', перечисленными в табл. 2. В качестве альтернативы их синтезировали как фрагменты ДНК в Gene Art, Регенсбург, Германии. Этот способ применяли для генов, кодирующих антитела, направленные на CD16 (клон 3G8; ориентация V_L-V_H). Фрагмент ДНК scFv-фрагментов в ориентации V_H-V_L и V_L-V_H соответственно расщепляли подходящими рестрикционными нуклеазами (резюмированы в табл. 2) и затем лигировали в вектор экспрессии.

Исходный вектор для легкой цепи содержит VJ-область легкой цепи и C-область κ -гена человека (фиг. 2D). В требуемые места (XhoI и SpeI) вводили сайты рестрикции для замены фрагмента XhoI-SpeI легкой цепи на соответствующий VJ-фрагмент легкой цепи моноклональных антител 4G8 (анти-FLT3), BV10 (анти-FLT3), 4G7 (анти-CD19), K225 (анти-EGFR) или 9.2.27 (анти-CSPG4) или любого другого моноклонального антитела. Область, смежная с фрагментом, подлежащим замещению, показана на фиг. 2E. Эта область содержит части второго экзона лидерной последовательности, сайт рестрикции (XhoI), подходящий для слияния с сохранением рамки считывания, VJ-область и части интрона каппа-цепи с сайтом рестрикции SpeI. Для замены константной области легкой цепи (CL) сайты рестрикции вводили в требуемые места (PmlI и BsmBI). Область, смежная с фрагментом, подлежащим замещению, показана увеличенной на фиг. 2F. Эта область содержит части интрона каппа-цепи, подходящий сайт рестрикции (PmlI), CL-область и части полиА-области (пА-области) каппа-цепи области 3'-UTR с сайтом рестрикции (BsmBI).

Таблица 1

Олигонуклеотиды, используемые для амплификации VDJ- и VJ-сегментов для инсерции в векторы экспрессии

Олигонуклеотиды, используемые для VDJ-сегмента тяжёлой цепи		
C	4G7-H-for	5'-ctc ttc aca ggt gtc ctc tct gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct g-3' (SEQ ID NO: 27)
C'	4G7-H-rev	5'-ggg aga agg tag gac tca cct gag gag act gtg aga gtg gtg cct tgg ccc cag tag tc-3' (SEQ ID NO: 28)
C	9.2.27-H-for	5'-tct tca cag gtg tcc tct ccc agg tga agc tgc agc aat ctg gac ctg agc-3' (SEQ ID NO: 29)
C'	9.2.27-H-rev	5'-aat ggg aga agg tag gac tca cct gag gag acg gtg acc gtg gtc cct tgg-3' (SEQ ID NO: 30)
C	4G8-H-for	5'-tct ctt cac agg tgt cct ctc tca ggt cca act gca gca gcc tgg ggc tga gc-3' (SEQ ID NO: 31)
C'	4G8-H-rev	5'-gag aag gta gga ctc acc tga gga gac tgt gag agt ggt gcc ttg gcc cca g-3' (SEQ ID NO: 32)
C	BV10-H-for	5'-aga cgt cca ctc tgt ctt tct ctt cac agg tgt cct ctc cca ggt gca gct gaa gca gtc-3' (SEQ ID NO: 33)
C'	BV10-H-rev	5'-gag aag gta gga ctc acc tga gga gac ggt gac tga ggt tcc ttg acc c-3' (SEQ ID NO: 34)
E	universal for (AatII)	5'- aga cgt cca ctc tgt ctt tct ctt cac agg tgt cct ctc c-3' (SEQ ID NO: 35)
E'	universal rev (ClaI)	5'- tat cga ttt aga atg gga gaa ggt agg act cac-3' (SEQ ID NO: 36)
Олигонуклеотиды, используемые для VJ-сегмента лёгкой цепи		
D	4G7-L-for (XhoI)	5'- act cga gga gat att gtg atg act cag gct gca ccc tct ata c-3' (SEQ ID NO: 37)
D	4G7-L-rev (SpeI)	5'- aac tag tac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cca gca ccg aac gtg-3' (SEQ ID NO: 38)
D	9.2.27-L-for (XhoI)	5'- tct cga gga gac atc gag ctc act cag tct cca gct tct ttg-3' (SEQ ID NO: 39)
D	9.2.27-L-rev (SpeI)	5'- aac tag tac tta cgt ttg atc tcc agc ttg gtg ccc cct cca aag g-3' (SEQ ID NO: 40)
D	4G8-L-for (XhoI)	5'- act cga gga gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg-3' (SEQ ID NO: 41)
D	4G8-L-rev (SpeI)	5'- tac tag tac tta cgt ttt att tcc agc ttg gtc ccc cct cc-3' (SEQ ID NO: 42)
D	BV10-L-for (XhoI)	5'- act cga gga gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc c-3' (SEQ ID NO: 43)
D	BV10-L-rev (SpeI)	5'- act agt act tac gtt tca gct cca gct tgg tcc cag cac cga acg tg-3' (SEQ ID NO: 44)

Сайты рестрикции выделены жирным шрифтом и обозначены буквами в круглых скобках.

Таблица 2

Олигонуклеотиды, используемые для амплификации scFv-сегментов для инсерции в векторы экспрессии

Олигонуклеотиды, используемые для scFv-сегмента		
F	UCHT1-for (BspEI)	5'- atc cgg aga tat cca gat gac cca gtc ccc gag ctc cct g-3' (SEQ ID NO: 45)
F'	UCHT1-rev (SpeI)	5'- tac tag tta tca cga gga gac ggt gac cag ggt tcc ttg acc cca-3' (SEQ ID NO: 46)
F	BMA031-for (BspEI)	5'- atc cgg aga agt gca gct gca gca gtc cgg ccc tga gct-3' (SEQ ID NO: 47)
F'	BMA031-rev (SpeI)	5'- tac tag tta tca ctt cag ttc cag ctt ggt gcc agc gcc gaa ggt-3' (SEQ ID NO: 48)
F	9.3-for (BspEI)	5'- atc cgg aga cat tgt gct gac cca gtc ccc tgc ctc cct gg-3' (SEQ ID NO: 49)
F'	9.3-rev (SpeI)	5'- tac tag tta tca aga gct cac agt cac tgt ggt gcc ctg gcc cca -3' (SEQ ID NO: 50)

Сайты рестрикции выделены жирным шрифтом и обозначены буквами в круглых скобках.

Таким образом, были получены молекулы биспецифического антитела с FLT3×CD3 (4G8×UCHT1, BV10×UCHT1), FLT3×TCRα/β (4G8×BMA031, BV10×BMA031), FLT3×CD28 (4G8×9.3, BV10×9.3), FLT3×CD16 (4G8×3G8, BV10×3G8), CD19×CD3 (4G7×UCHT1), CD19×TCRα/β (4G7×BMA031), CD19×CD28 (4G7×9.3), CD19×CD16 (4G7×3G8), CSPG4×CD3 (9.2.27×UCHT1), CSPG4×TCRD/D (9.2.27×BMA031), CSPG4×CD28 (9.2.27×9.3), CSPG4×CD16 (9.2.27×3G8), EGFR×CD3 (C225×UCHT1), EGFR×TCRα/β (C225×BMA031), EGFR×CD28 (C225×9.3), EGFR×CD16 (C225×3G8) в качестве тетравалентного bsFc^{KO}-1 и бивалентного bsFc^{KO}-1/2. Последовательности соответствующих цепей изображены как SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 26 и представлены на фиг. 6.

Котрансфекция векторов экспрессии, кодирующих химерные тяжелую и легкую цепи (IgG1/k) или модифицированные тяжелые цепи в не-Ig-продуцирующую линию миеломной клетки Sp2/0 давала устойчивые трансфектомы, секретирующие биспецифические моноклональные антитела, способные специфично связываться с целевым антигеном. Функциональные характеристики этих молекул антител проиллюстрированы в следующих экспериментах с использованием молекул биспецифических антител FLT3×CD3, CD19×TCRα/β и CSPG×CD3.

Пример 3.

Определяли активацию Т-клеток двумя форматами антител из примера 1, форматом bsFc^{KO}-1/2 и bsFc^{KO}-1, с и без позитивных РЕН-клеток FLT3/CD19. Данные приведены на фиг. 3. Используемые молекулы биспецифического антитела имели сайт связывания FLT3 (первый сайт связывания) клона 4G8 и сайт связывания CD3 (второй сайт связывания) клона UCHT1. Молекула "bsFc^{KO}-1/2-формата" была составлена из цепей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6, а молекула "bsFc^{KO}-1-формата" состояла из цепей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 26. Молекула биспецифического антитела, связывающая CSPG4 и CD3, имела "bsFc^{KO}-1/2-формат" и состояла из цепей SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 18. Дополнительно использовали молекулу биспецифического антитела в формате "bsFc^{KO}-1/2", связывающую CD19 и TCRα/β, которая состояла из цепей SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 15.

А) Из периферической крови здоровых доноров получали мононуклеарные клетки человека (РВМС) и отделяли с использованием центрифугирования в градиенте плотности. РВМС переносили в 96-луночные планшеты (100000 на лунку). Далее добавляли облученные FLT3/CD19-позитивные РЕН-клетки (50000 на лунку) или среду, в завершение чего добавляли антитела в показанных концентрациях (фиг. 3А). Через 24 ч клетки инкубировали с использованием ³H тимидина (0,5 мCi/лунка). Еще через 24 ч клетки наносили на стекловолоконные фильтры, используя коллектор клеток. Далее с помощью сцинтилляционного счетчика определяли радиоактивность.

В) Гепаринизированную цельную кровь (50 мкл/лунка) инкубировали в 96-луночных планшетах с и без FLT3/CD19-позитивных РЕН-клеток (50000/лунку) и с антителами в концентрациях, указанных на фиг. 3В. Через 24 ч концентрацию TNF в супернатанте определяли посредством ELISA.

РЕН-клетки (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Брауншвейг, Германия) и РВМС-клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сыво-

ротки (PAN-Biotech, Аиденбах, Германия), 1% пенициллина и стрептомицина (Lonza, Базель, Швейцария).

Пример 4.

Определяли лизис RЕН-клеток, экспрессирующих FLT3/CD19 (фиг. 4A), и SKMe163-клеток, экспрессирующих CSPG (фиг. 4B), биспецифическими антителами и активированными клетками-киллерами CD8+T.

Мононуклеарные клетки человека (PBMC) в течение трех дней стимулировали посредством моноспецифического CD3-антитела UCNT1 (10 нг/мл). Затем активированные клетки CD8+T отделяли позитивной селекцией, используя магнитную сортировку клеток. Эти клетки добавляли к FLT3/CD19-позитивным RЕН-клеткам, маркированным ^{51}Cr (фиг. 4A), или к CSPG4-позитивным клеткам SKMe163 (фиг. 4B) и инкубировали с антителами в указанных концентрациях. Через 4 ч клеточные супернатанты собирали на планшетах сцинтилляции и определяли радиоактивность в сцинтилляционном счетчике.

Специфический лизис в процентах при заданных экспериментальных условиях оценивали следующим образом: $\text{cpm}(\text{exp}) - \text{cpm}(\text{bg}) / \text{cpm}(100) - \text{cpm}(\text{bg})$, где $\text{cpm}(\text{bg})$ соответствует выходу хрома без антитела и эффекторных клеток, а $\text{cpm}(100)$ соответствует выходу хрома после инкубации клеток-мишеней с донором.

Клетки SKMe163 были получены от Dr. B. Gückel, Klinik für Gynäkologie, University of Tübingen, Германия.

Пример 5.

Скорость агрегации и продуцирования антител FLT3×CD3 (сайт связывания FLT: клон 4G8, сайт связывания CD3: клон UCNT1) идентичной специфичности сравнивали между тремя разными форматами: биспецифического одноцепочечного формата (bs-scFv), bsFc^{ko}-1/2-формата и bsFc^{ko}-1-формата. Молекула антитела "bsFc^{ko}-1/2-формата" состояла из цепей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6, а молекула антитела "bsFc^{ko}-1-формата" состояла из цепей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 26.

Биспецифические одноцепочечные молекулы очищали афинной хроматографией, используя белок L.

Выполняли фильтрацию в геле, используя колонку Superdex 200 PC3.2/30 и SMARTSystem (GE-Healthcare, Мюнхен, Германия). Стандартными белками были каталаза (232 кДа, из бычьей печени), альдолаза (158 кДа, из мышц кролика), альбумин (67 кДа, из бычьей сыворотки) и рибонуклеаза А (13,7 кДа, из бычьей поджелудочной железы). Результаты представлены на фиг. 5A. Из данных на фиг. 5A следует, что образование агрегатов значительно более выражено, если антитело экспрессируется, как bs-scFv (скорость агрегации 43%), а не как bsFc^{ko}-1/2 (агрегация не обнаружена) или bsFc^{ko}-1 (скорость агрегации 2%), т.е. молекулы биспецифического антитела по настоящему изобретению остаются мономерными молекулами и по существу не стремятся к агрегации.

Для сравнения скоростей продуцирования в клетки Sp2/0 вводили гены, кодирующие биспецифические молекулы со специфичностью к 4G8 (анти-FLT3) и UCNT1 (анти-CD3) в указанных форматах, и антитела очищали, используя аффинную хроматографию. Количество антитела, очищенного от супернатантов клонов, выбранное для максимального продуцирования, изображено на фиг. 5B. Концентрации антител определяли оптической спектроскопией, принимая оптическую плотность в 1,4 при 280 нм за концентрацию антитела 1 мг/мл. Скорости продуцирования для молекул антитела bsFc^{ko}-1/2 и bsFc^{ko}-1 по изобретению были значительно выше соответствующих значений для соответствующей молекулы bs-scFv.

Специалист в данной области техники легко поймет, что настоящее изобретение хорошо адаптировано для решения задач и достижения указанных конечных целей и преимуществ, указанных в настоящем документе. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что в раскрытое здесь изобретение могут быть внесены различные замены и модификации без отступления от объема и сущности изобретения. Композиции, способы, процедуры, способы лечения, молекулы и специфические соединения, описанные здесь, представляют собой некоторые варианты реализации, приведены в качестве примера и не ограничивают объем правовой охраны изобретения. Изменения и другие варианты применения будут ясны специалисту в данной области техники, и они входят в рамки сущности изобретения и определены формулой изобретения. Перечень или ссылки на опубликованные ранее документы, сделанные в настоящем описании, не являются подтверждением того, что этот документ является частью уровня техники или обычными общеизвестными знаниями.

Изобретение, иллюстративно описанное здесь, подходящим образом может быть осуществлено на практике в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, не раскрытых здесь конкретно. Соответственно, например, термины "содержащий", "включающий", "содержащий в себе" и т.д. имеют расширительный и неограничительный смысл. Кроме того, использованные здесь термины и выражения применены как описательные, но не ограничительные, и не должны толковаться как исключающие возможность эквивалентов представленных и описанных признаков, при этом различные модификации допустимы в объеме формулы заявленного изобретения. Таким образом, следует понимать, что несмотря на то что настоящее изобретение информационно раскрыто на основе конкретных вариантов реализации и необязательных признаков, специалистам в данной области техники может быть понятна модификация и вариация реализованных в нем изобретений и такие модификации и вариации

входят в объем данного изобретения.

Здесь дано широкое и общее описание изобретения. Любая более узкая производная и соподчиненная составляющая общего раскрытия также является частью изобретения. Это относится и к общему описанию изобретения при некотором условии или отрицательном признаке, исключающем какой-либо объект изобретения из общего вне зависимости от присутствия такого исключения в описании.

Другие варианты реализации входят в рамки представленной ниже формулы изобретения. В дополнение к этому там, где описанные признаки или аспекты изобретения относятся к группе Маркуша, специалистам в данной области будет понятно, что данное изобретение также имеет отношение к какому-либо отдельному компоненту или подгруппе компонентов группы Маркуша.

Перечень последовательностей

<110> Synimmune GbmH

<120> МОЛЕКУЛА БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА

<130> SYN14309PCT

<150> US 61/577,327

<151> 2011-12-19

<160> 50

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность легкой цепи, анти-FLT3 химерная легкая цепь (клон 4G8)

<400> 1

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro
1			5						10					15
Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser
			20						25					30
Asn	Asn	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	His	Glu	Ser	Pro	Arg
			35						40					45
Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser
			50						55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile
			65						70					75
Asn	Ser	Val	Glu	Thr	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln
			80						85					90
Ser	Asn	Thr	Trp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
			95						100					105
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
			110						115					120
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
			125						130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
			140						145					150
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
			155						160					165
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
			170						175					180
Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
			185						190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
			200						205					210

Arg Gly Glu Cys

<210> 2

$\langle 211 \rangle$ 220

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

$\langle 220 \rangle$

<223> последовательность легкой цепи, анти-FLT3 химерная легкая цепь (клон BV10)

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala
1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg
50 55 60

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala
80 85 90

Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
95 100 105

Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
110 115 120

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
125 130 135

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
140 145 150

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
155 160 165

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
170 175 180

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
185 190 195

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

	200	205	210
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	215	220	

<210> 3

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность легкой цепи, анти-CSPG4 химерная легкая цепь (клон 9.2.27)

<400> 3

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu		
1	5	10
Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp		
	20	25
Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly		
	35	40
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser		
	50	55
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe		
	65	70
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr		
	80	85
Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly		
	95	100
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe		
	110	115
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser		
	125	130
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val		
	140	145
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
	155	160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
	185	190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	215	

<210> 4

<211> 219

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность легкой цепи, анти-CD19 химерная легкая цепь (клон

4G7)

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 5

<211> 214

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность легкой цепи, анти-EGFR химерная легкая цепь

(клон C225)

<400> 5

```

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro
1           5           10           15

Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
20           25           30

Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg
35           40           45

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
50           55           60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile
65           70           75

Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln
80           85           90

Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
95           100          105

Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110          115          120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125          130          135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140          145          150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155          160          165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170          175          180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185          190          195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200          205          210

Arg Gly Glu Cys

```

<210> 6

<211> 589

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность тяжелой цепи/главной цепи, FLT3 x CD3; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон 4G8) и C-концевая CD3 одноцепочечная (клон UCST1, VL-VH)] цепь
гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 6

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly		
1 5 10 15		
Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr		
20 25 30		
Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu		
35 40 45		
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr		
50 55 60		
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser		
65 70 75		
Ser Asn Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp		
80 85 90		
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe		
95 100 105		
Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser		
110 115 120		
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser		
125 130 135		
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
140 145 150		
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr		
155 160 165		
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu		
170 175 180		
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly		
185 190 195		
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
200 205 210		
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
215 220 225		
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val		
230 235 240		
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245 250 255		
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp		
260 265 270		
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275 280 285		
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr		
290 295 300		
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305 310 315		
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser		
320 325 330		
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly		
335 340 345		

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 350 355 360
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg
 365 370 375
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 380 385 390
 Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 395 400 405
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 410 415 420
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 425 430 435
 Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 440 445 450
 Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 455 460 465
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 470 475 480
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser
 485 490 495
 Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 500 505 510
 Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser
 515 520 525
 Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp
 530 535 540
 Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 545 550 555
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly
 560 565 570
 Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 575 580 585
 Thr Val Ser Ser

<210> 7

<211> 594

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FLT3 x CD3; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-FLT3 химерная тяжелая
 цепь (клон BV10) и C-концевая CD3 одноцепочечная (клон UCNT1,
 VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 7

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

040607

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Asn His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val
225 230 235 240

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

040607

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile
340 345 350

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
355 360 365

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
370 375 380

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr
385 390 395 400

Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
405 410 415

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
420 425 430

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe
435 440 445

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460

040607

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
465 470 475 480

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
485 490 495

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
500 505 510

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly
515 520 525

Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
530 535 540

Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
545 550 555 560

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
565 570 575

Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
580 585 590

Ser Ser

<210> 8

<211> 585

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FLT3 x TCR альфа/бета; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-FLT3
химерная тяжелая цепь (клон 4G8) и C-концевая TCR альфа/бета
одноцепочечная (клон ВМА031; VH-VL)], цепь гликан-ко-
вариант-полумолекулы

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

040607

Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40				45					
Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Thr	Thr	Pro	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
	115						120					125				
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	130					135					140					
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
			165						170					175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
		180						185					190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
	195						200					205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
	210					215					220					
His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	
225					230					235					240	

040607

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
355 360 365

Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln
370 375 380

Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn
385 390 395 400

Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
405 410 415

Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr
420 425 430

Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp
435 440 445

Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
450 455 460

040607

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
465 470 475 480

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
485 490 495

Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met His
500 505 510

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
515 520 525

Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
530 535 540

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
545 550 555 560

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
565 570 575

Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
580 585

<210> 9
<211> 590
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FLT3 x TCR альфа/бета; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-FLT3
химерная тяжелая цепь (клон BV10) и C-концевая TCR альфа/бета
одноцепочечная (клон BMA031; VH-VL)], цепь гликан-ко-
вариант-полумолекулы

<400> 9

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

040607

Gly	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu
3545															
Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile
5060															
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe
65707580															
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala
859095															
Arg	Lys	Gly	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asn	His	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
100105110															
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
115120125															
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
130135140															
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145150155160															
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
165170175															
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
180185190															
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
195200205															
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
210215220															
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val
225230235240															

040607

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Glu Val
340 345 350

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val
355 360 365

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met
370 375 380

His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
385 390 395 400

Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly
405 410 415

Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu
420 425 430

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys Ala Arg
435 440 445

Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Gly Gln Gly Thr Leu
450 455 460

040607

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
465 470 475 480

Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
485 490 495

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser
500 505 510

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
515 520 525

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
530 535 540

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
545 550 555 560

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
565 570 575

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
580 585 590

<210> 10

<211> 592

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FLT3 x CD28; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-FLT3 химерная тяжелая
цепь (клон 4G8) и C-концевая CD28 одноцепочечная (клон 9.3;
VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

040607

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
340 345 350

Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
355 360 365

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp
370 375 380

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala
385 390 395 400

Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
405 410 415

Gly Thr Asn Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Asp Glu Asp Asp Val
420 425 430

Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly
435 440 445

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly
465 470 475 480

Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val
485 490 495

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser
500 505 510

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly
515 520 525

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Lys Ser Ile Ser Lys Asp
530 535 540

Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp
545 550 555 560

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr
565 570 575

Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 11
<211> 597
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FLT3 x CD28; bsFско-1/2 [N-концевая анти-FLT3 химерная тяжелая
цепь (клон BV10) и C-концевая CD28 одноцепочечная (клон 9.3,
VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 11

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

040607

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Asn His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val
225 230 235 240

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser

260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr		
290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro		
325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile		
340	345	350
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg		
355	360	365
Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr		
370	375	380
Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu		
385	390	395
Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe		
405	410	415
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val		
420	425	430
Asp Glu Asp Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val		
435	440	445
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly		
450	455	460
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys		
465	470	475
		480

040607

Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln Ser Leu Ser
485 490 495

Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly Val His
500 505 510

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
515 520 525

Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Lys
530 535 540

Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
545 550 555 560

Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Lys
565 570 575

Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
580 585 590

Val Thr Val Ser Ser
595

<210> 12

<211> 589

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FLT3 x CD16; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-FLT3 химерная тяжелая
цепь (клон 4G8) и C-концевая CD16 одноцепочечная (клон 3G8;
VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 12

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

040607

	35		40		45														
Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe				
50						55					60								
Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr				
65					70					75					80				
Met	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90						95				
Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Thr	Thr	Pro	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr				
			100					105					110						
Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro				
			115				120					125							
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly				
	130					135					140								
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn				
145					150					155					160				
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln				
				165					170					175					
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser				
			180					185					190						
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser				
		195					200					205							
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr				
	210					215					220								
His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val				
225					230					235					240				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr				
				245					250					255					

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
 340 345 350

Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 355 360 365

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp
 370 375 380

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr
 385 390 395 400

Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser
 405 410 415

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr
 420 425 430

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly
 435 440 445

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro

040607

Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser

485 490 495

Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln
500 505 510

Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp
515 520 525

Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys
530 535 540

Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr
545 550 555 560

Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe
565 570 575

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585

<210> 13

<211> 594

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

$\langle 220 \rangle$

<223> FLT3 x CD16; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон BV10) и C-концевая CD16 одноцепочечная (клон 3G8; VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 13

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile

50	55	60													
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe
65					70					75				80	
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Lys	Gly	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asn	His	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		115					120						125		
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
	130					135						140			
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155					160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				165					170					175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			180					185					190		
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
		195					200						205		
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
	210					215						220			
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val
225					230					235					240
Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser
			260					265					270		

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile
 340 345 350
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg
 355 360 365
 Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp
 370 375 380
 Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 385 390 395 400
 Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe
 405 410 415
 Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val
 420 425 430
 Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp
 435 440 445
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
 450 455 460
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu
 465 470 475 480
 Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu

040607

485

490

495

Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val
500 505 510

Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His
515 520 525

Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg
530 535 540

Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile
545 550 555 560

Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile
565 570 575

Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
580 585 590

Ser Ser

<210> 14

<211> 592

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CD19 x CD3, bsFcko-1/2 [N-концевая анти-CD19 химерная тяжелая
цепь (клон 4G7) и C-концевая анти-CD3 одноцепочечная (клон
UCHT1; VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 14

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu
 260 265 270

040607

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Gln Met
340 345 350

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
355 360 365

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
370 375 380

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser
385 390 395 400

Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
405 410 415

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
420 425 430

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln
435 440 445

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
465 470 475 480

040607

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
485 490 495

Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
500 505 510

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser
515 520 525

Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys
530 535 540

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
545 550 555 560

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp
565 570 575

Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 15

<211> 588

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CD19 x TCR альфа/бета, bsFcko-1/2 [N-концевая анти-CD19 химерная тяжелая цепь (клон 4G7) и C-концевая анти-TCR альфа/бета одноцепочечная (клон BMA031; VH-VL)]: цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 15

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Glu Val Gln Leu
 340 345 350

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
 355 360 365

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp
 370 375 380

Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
 385 390 395 400

Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala
 405 410 415

Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
 420 425 430

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser
 435 440 445

Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 450 455 460

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 485 490 495

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser
 500 505 510

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
 515 520 525

Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 530 535 540

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 545 550 555 560

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
 565 570 575

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 580 585

<210> 16

<211> 595

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CD19 x CD28; bsFско-1/2 [N-концевая анти-CD19 химерная тяжелая
 цепь (клон 4G7) и C-концевая CD28 одноцепочечная (клон 9.3;
 VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 16

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

040607

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Glu Leu
 340 345 350

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
 355 360 365

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu
 370 375 380

Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 385 390 395 400

Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 405 410 415

Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Asp Glu
 420 425 430

Asp Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr
 435 440 445

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly
 450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys Leu Gln
 465 470 475 480

Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr
 485 490 495

Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly Val His Trp Val
500 505 510

Arg Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala
515 520 525

Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Lys Ser Ile
530 535 540

Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu
545 550 555 560

Gln Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Gly Tyr
565 570 575

Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
580 585 590

Val Ser Ser
595

<210> 17

<211> 592

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CD19 x CD16; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-CD19 химерная тяжелая цепь (клон 4G7) и C-концевая CD16 одноцепочечная (клон 3G8; VL-VH)], цепи гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 17

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

040607

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	100	105	110	
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	115	120	125	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	130	135	140	
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	145	150	155	160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	165	170	175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	180	185	190	
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	195	200	205	
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	210	215	220	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	225	230	235	240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	260	265	270	

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Val Leu
 340 345 350

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
 355 360 365

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Phe
 370 375 380

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 385 390 395 400

Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala
 405 410 415

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu
 420 425 430

Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr
 435 440 445

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu
 465 470 475 480

Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
 485 490 495

040607

Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
500 505 510

Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp
515 520 525

Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr
530 535 540

Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser
545 550 555 560

Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro
565 570 575

Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 18

<211> 592

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CSPG4 x CD3, bsFcko-1/2 [N-концевая анти-CSPG4 химерная
тяжелая цепь (клон 9.2.27) и C-концевая анти-CD3 одноцепочечная
(клон UCHT1; VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-
полумолекулы

<400> 18

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

040607

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Val Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Thr Val Val Val Pro Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

040607

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Gln Met
340 345 350

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
355 360 365

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
370 375 380

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser
385 390 395 400

Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
405 410 415

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
420 425 430

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln
435 440 445

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
465 470 475 480

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
485 490 495

Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
500 505 510

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser
515 520 525

Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys
530 535 540

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
545 550 555 560

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp
565 570 575

Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 19

<211> 588

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CSPG4 x TCR альфа/бета, bsFcko-1/2 [N-концевая анти-CSPG4
химерная тяжелая цепь (клон 9.2.27) и C-концевая анти-TCR
альфа/бета одноцепочечная (клон BMA031; VH-VL)], цепи
гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 19

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

040607

Met	Gln	Val	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Val	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	85	90	95
Ala	Arg	Gly	Asn	Thr	Val	Val	Val	Pro	Tyr	Thr	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	100	105	110
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	115	120	125
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	130	135	140
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	145	150	155
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	165	170	175
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	180	185	190
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	195	200	205
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	210	215	220
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	225	230	235
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	260	265	270
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Glu Val Gln Leu
 340 345 350

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
 355 360 365

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp
 370 375 380

Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
 385 390 395 400

Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala
 405 410 415

Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
 420 425 430

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser
 435 440 445

Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 450 455 460

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 485 490 495

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser
 500 505 510

040607

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
515 520 525

Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
530 535 540

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
545 550 555 560

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
565 570 575

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
580 585

<210> 20

<211> 595

<212> БЕЛЮК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CSPG4 х CD28; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-CSPG4 химерная
тяжелая цепь (клон 9.2.27) и С-концевая CD28 одноцепочечная
(клон 9.3; VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-
полумолекулы

<400> 20

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Val Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Asn Thr Val Val Val Pro Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg

290		295		300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys				
305		310		315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu				
		325		330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Glu Leu				
		340		345 350
Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr				
		355		360 365
Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu				
		370		375 380
Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile				
		385		390 395 400
Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly				
		405		410 415
Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Asp Glu				
		420		425 430
Asp Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr				
		435		440 445
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly				
		450		455 460
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys Leu Gln				
		465		470 475 480
Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr				
		485		490 495
Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly Val His Trp Val				
		500		505 510

Arg Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala
 515 520 525

Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Lys Ser Ile
 530 535 540

Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu
 545 550 555 560

Gln Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Gly Tyr
 565 570 575

Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 580 585 590

Val Ser Ser
 595

<210> 21
 <211> 592
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CSPG4 x CD16; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-CSPG4 химерная
 тяжелая цепь (клон 9.2.27) и C-концевая CD16 одноцепочечная
 (клон 3G8; VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 21

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

040607

65				70				75				80				
Met	Gln	Val	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Val	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gly	Asn	Thr	Val	Val	Val	Pro	Tyr	Thr	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	
				100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
				115					120					125		
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
				130					135					140		
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
				145					150					155		
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
				165					170					175		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
				180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
				195					200					205		
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
				210					215					220		
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	
				225					230					235		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245					250					255		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270		
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				275					280					285		

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Val Leu
 340 345 350
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
 355 360 365
 Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Phe
 370 375 380
 Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 385 390 395 400
 Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala
 405 410 415
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu
 420 425 430
 Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr
 435 440 445
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu
 465 470 475 480
 Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
 485 490 495
 Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp

040607

	500		505		510
Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp					
515		520		525	
Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr					
530		535		540	
Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser					
545		550		555	560
Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro					
	565		570		575
Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	580		585		590
<210> 22					
<211> 590					
<212> БЕЛОК					
<213> Искусственная последовательность					
<220>					
<223> EGFR x CD3; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-EGFR химерная тяжелая цепь (клон C225) и C-концевая CD3 одноцепочечная (клон UCHT1; VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы					
<400> 22					
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln					
1		5		10	15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr					
	20		25		30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu					
	35		40		45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr					
	50		55		60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe					
65		70		75	80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val

290		295		300
Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315		320
Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Gln Leu Pro	Ser Pro Ile Glu Lys Thr		
	325	330		335
Ile Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Ser Gly	Asp Ile Gln Met Thr Gln		
	340	345		350
Ser Pro Ser Ser Leu	Ser Ala Ser Val Gly	Asp Arg Val Thr Ile Thr		
	355	360		365
Cys Arg Ala Ser Gln	Asp Ile Arg Asn Tyr	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln		
	370	375		380
Lys Pro Gly Lys Ala	Pro Lys Leu Leu Ile	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu		
385	390	395		400
Glu Ser Gly Val Pro	Ser Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly Thr Asp		
	405	410		415
Tyr Thr Leu Thr Ile	Ser Ser Leu Gln Pro	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr		
	420	425		430
Tyr Cys Gln Gln Gly	Asn Thr Leu Pro Trp	Thr Phe Gly Gln Gly Thr		
	435	440		445
Lys Val Glu Ile Lys	Gly Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
	450	455		460
Gly Gly Gly Ser Glu	Val Gln Leu Val Glu	Ser Gly Gly Gly Leu Val		
465	470	475		480
Gln Pro Gly Gly Ser	Leu Arg Leu Ser Cys	Ala Ala Ser Gly Tyr Ser		
	485	490		495
Phe Thr Gly Tyr Thr	Met Asn Trp Val Arg	Gln Ala Pro Gly Lys Gly		
	500	505		510

040607

Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr
515 520 525

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys
530 535 540

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
545 550 555 560

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr
565 570 575

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 23
<211> 586
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> EGFR x TCR альфа/бета; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-EGFR
химерная тяжелая цепь (клон C225) и C-концевая TCR альфа/бета
одноцепочечная (клон BMA031; VH-VL)], цепь гликан-ко-
вариант-полумолекулы

<400> 23

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

040607

Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Asn	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95
Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220
Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	225	230	235
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	260	265	270
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	275	280	285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln
 340 345 350
 Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
 355 360 365
 Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys
 370 375 380
 Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr
 385 390 395 400
 Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
 405 410 415
 Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 420 425 430
 Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr
 435 440 445
 Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 450 455 460
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 465 470 475 480
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 485 490 495
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
 500 505 510

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 515 520 525

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 530 535 540

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 545 550 555 560

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 565 570 575

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 580 585

<210> 24

<211> 593

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EGFR x CD28; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-EGFR химерная тяжелая цепь (клон С225) и С-концевая CD28 одноцепочечная (клон 9.3; VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 24

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

040607

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Glu Leu Thr Gln
340 345 350

Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser
355 360 365

Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln
370 375 380

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala
385 390 395 400

Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
405 410 415

Ser Gly Thr Asn Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Asp Glu Asp Asp
420 425 430

Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr Phe
435 440 445

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser
465 470 475 480

Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr
485 490 495

Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln
500 505 510

Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly
515 520 525

Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Lys Ser Ile Ser Lys
530 535 540

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala
545 550 555 560

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr
565 570 575

Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
580 585 590

Ser

<210> 25

<211> 590

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EGFR x CD16; bsFcko-1/2 [N-концевая анти-EGFR химерная тяжелая
цепь (клон C225) и C-концевая CD16 одноцепочечная (клон 3G8;
VL-VH)], цепь гликан-ко-вариант-полумолекулы

<400> 25

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

040607

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln
 340 345 350

Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser
 355 360 365

Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 370 375 380

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr
 385 390 395 400

Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala Ser Gly
 405 410 415

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp
 420 425 430

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe
 435 440 445

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly
 465 470 475 480

Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe
 485 490 495

Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg
 500 505 510

Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp
 515 520 525

Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser
 530 535 540

Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp
 545 550 555 560

Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp
 565 570 575

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 580 585 590

<210> 26

<211> 693

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность тяжелой цепи/главной цепи, FLT3 x CD3; bsFcko-1 [N-концевая анти-FLT3 химерная тяжелая цепь и C-концевая CD3 одноцепочечная (клон UCST1; VL-VH)]: цепь ко-вариант-(полной) молекулы, которая включает CH3-домен, не гликомутант

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr
 50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser
 65 70 75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp
 80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe

95										100					105				
Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser					
			110						115					120					
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser					
			125						130					135					
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr					
			140						145					150					
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr					
			155						160					165					
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu					
			170						175					180					
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly					
			185						190					195					
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr					
			200						205					210					
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His					
			215						220					225					
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val					
			230						235					240					
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg					
			245						250					255					
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	Asp					
			260						265					270					
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His					
			275						280					285					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr					
			290						295					300					
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn					
			305						310					315					
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser					
			320						325					330					
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu					
			335						340					345					
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys					
			350						355					360					
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser					

	365		370		375
Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu Ser Asn	Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	380		385		390
Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	395		400		405
Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys	Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
	410		415		420
Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met His	Glu Ala Leu His Asn His			
	425		430		435
Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser Leu Ser	Pro Gly Lys Ser Gly Asp			
	440		445		450
Ile Gln Met Thr	Gln Ser Pro Ser Ser	Leu Ser Ala Ser Val Gly			
	455		460		465
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg Ala	Ser Gln Asp Ile Arg Asn			
	470		475		480
Tyr Leu Asn Trp	Tyr Gln Gln Lys Pro	Gly Lys Ala Pro Lys Leu			
	485		490		495
Leu Ile Tyr Tyr	Thr Ser Arg Leu Glu	Ser Gly Val Pro Ser Arg			
	500		505		510
Phe Ser Gly Ser	Gly Ser Gly Thr Asp	Tyr Thr Leu Thr Ile Ser			
	515		520		525
Ser Leu Gln Pro	Glu Asp Phe Ala Thr	Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly			
	530		535		540
Asn Thr Leu Pro	Trp Thr Phe Gly Gln	Gly Thr Lys Val Glu Ile			
	545		550		555
Lys Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	560		565		570
Ser Glu Val Gln	Leu Val Glu Ser Gly	Gly Gly Leu Val Gln Pro			
	575		580		585
Gly Gly Ser Leu	Arg Leu Ser Cys Ala	Ala Ser Gly Tyr Ser Phe			
	590		595		600
Thr Gly Tyr Thr	Met Asn Trp Val Arg	Gln Ala Pro Gly Lys Gly			
	605		610		615
Leu Glu Trp Val	Ala Leu Ile Asn Pro	Tyr Lys Gly Val Ser Thr			
	620		625		630
Tyr Asn Gln Lys	Phe Lys Asp Arg Phe	Thr Ile Ser Val Asp Lys			

	635		640		645									
Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu
				650					655					660
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asp
				665					670					675
Ser	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
				680					685					690
Val	Ser	Ser												

<210> 27
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотид для VDJ-сегмента тц

<400> 27

ctcttcacag gtgtcctctc tgaggtccag ctgcagcagt ctggacctg 49

<210> 28
 <211> 59
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотид для VDJ-сегмента тц

<400> 28

gggagaaggt aggactcacc tgaggagact gtgagagtgg tgccttgccc ccagtagtc 59

<210> 29
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотид для VDJ-сегмента тц

<400> 29

tcttcacagg tgtcctctcc caggtgaagc tgcagcaatc tggacctgag c 51

<210> 30
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотид для VDJ-сегмента тц
 <400> 30
 aatgggagaa ggtaggactc acctgaggag acggtgaccg tggtccttg g 51
 <210> 31
 <211> 53
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид для VDJ-сегмента тц
 <400> 31
 tctcttcaca ggtgtcctct ctcaggtcca actgcagcag cctggggctg agc 53
 <210> 32
 <211> 52
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид для VDJ-сегмента тц
 <400> 32
 gagaaggtag gactcacctg aggagactgt gagagtgggt ccttggcccc ag 52
 <210> 33
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид для VDJ-сегмента тц
 <400> 33
 agacgtccac tctgtctttc tcttcacagg tgtcctctcc caggtgcagc tgaagcagtc 60
 <210> 34
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид для VDJ-сегмента тц
 <400> 34

gagaaggtag gactcacctg aggagacggt gactgaggtt ccttgaccc	49
<210> 35	
<211> 40	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид для VDJ-сегмента тц	
<400> 35	
agacgtccac tctgtctttc tcttcacagg tgcctctcc	40
<210> 36	
<211> 40	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид для VDJ-сегмента тц	
<400> 36	
agacgtccac tctgtctttc tcttcacagg tgcctctcc	40
<210> 37	
<211> 43	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид для VJ-сегмента лц	
<400> 37	
actcgaggag atattgtgat gactcaggct gcaccctcta tac	43
<210> 38	
<211> 48	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид для VJ-сегмента лц	
<400> 38	
aactagtact tacgtttcag ctccagcttg gtcccagcac cgaacgtg	48
<210> 39	
<211> 42	
<212> ДНК	

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид для VJ-сегмента лц
 <400> 39
 tctcgaggag acatcgagct cactcagctt ccagcttctt tg 42
 <210> 40
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид для VJ-сегмента лц
 <400> 40
 аactagtact tacgtttgat ctccagcttg gtgccccctc saaagg 46
 <210> 41
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид для VJ-сегмента лц
 <400> 41
 actcgaggag atattgtgct аactcagctt ccagccacct tg 42
 <210> 42
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид для VJ-сегмента лц
 <400> 42
 tactagtact tacgttttat ttccagcttg gtccccctc c 41
 <210> 43
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид для VJ-сегмента лц
 <400> 43

actcgaggag acattgtgat gacacagtct ccacccctccc	40
<210> 44	
<211> 47	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид для VJ-сегмента лц	
<400> 44	
actagtactt acgtttcagc tccagcttgg tcccagcacc gaacgtg	47
<210> 45	
<211> 40	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид для scFv-сегмента	
<400> 45	
atccggagat atccagatga cccagtcacc gagctccctg	40
<210> 46	
<211> 45	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид для scFv-сегмента	
<400> 46	
tactagttat caccaggaga cggtagaccag ggttccttga cccca	45
<210> 47	
<211> 39	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид для scFv-сегмента	
<400> 47	
atccggagaa gtgcagctgc agcagtcagg ccctgagct	39
<210> 48	
<211> 45	
<212> ДНК	

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> олигонуклеотид для scFv-сегмента

<400> 48

tactagttat cacttcagtt ccagcttggt gccagcgccg aaggt

45

<210> 49

<211> 41

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> олигонуклеотид для scFv-сегмента

<400> 49

atccggagac attgtgctga cccagtcgcc tgcctccctg g

41

<210> 50

<211> 45

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> олигонуклеотид для scFv-сегмента

<400> 50

tactagttat caagagctca cagtcactgt ggtgccctgg cccca

45

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная молекула биспецифического антитела, характеризующаяся тем, что включает Fab-фрагмент, содержащий первый сайт связывания первого антигена, одноцепочечный Fv-фрагмент, содержащий второй сайт связывания для второго антигена, и C_{H2} -домен иммуноглобулина IgG1,

при этом Fab-фрагмент и одноцепочечный Fv-фрагмент связаны через C_{H2} -домен,

причем по меньшей мере три аминокислотных остатка C_{H2} -домена, обладающие способностью обеспечивать связывание с Fc-рецепторами, удалены или мутированы путем замены на другую аминокислоту, тем самым ослабляя связывание C_{H2} -домена к Fc-рецепторам,

причем по меньшей мере три аминокислотных остатка C_{H2} -домена состоят из положения последовательности 233 и по меньшей мере двух аминокислот, выбранных из группы, состоящей из положения последовательности 228, 230, 231, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 297, 327 и 330 (нумерация положений последовательностей в соответствии с номенклатурой ЕС), где, кроме того, аминокислотные остатки в положениях 226 и 229 удалены или мутированы посредством замены на другую аминокислоту, где либо первый сайт связывания, либо второй сайт связывания связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью, и где первый сайт связывания или второй сайт связывания связывается с молекулой специфического рецептора Т-клетки или NK-клетки.

2. Молекула антитела по п.1, характеризующаяся тем, что ассоциированный с опухолью антиген выбран из группы, включающей CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CDw52, Fms-подобной тирозинкиназы 3 (FLT-3, CD135), c-Kit (протеин-рецепторной тирозинкиназы, продукт гена KIT) (CD117), CSF1R (CD115), CD133, PDGFR- α (CD140a), PDGFR- β (CD140b), хондроитинсульфат протеогликана 4 (CSPG4, меланома-ассоциированный хондроитинсульфат протеогликана), Muc-1, EGFR, de2-7-EGFR, EGFRvIII, фолатсвязывающий белок, Her2/neu, Her3, PSMA, PSCA, PSA, TAG-72, HLA-DR, IGFR, CD133, IL3R, белок, активирующий фибробласты (FAP), карбоангидраза IX (MN/CA IX), карциноэмбриональный антиген (CEA), EpCAM, CDCP1, Derlin1, тенасцин, Frizzled 1-10, сосудистые антигены VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), эндоглин, CLEC14, Tem1-8 и Tie2; и/или либо первый сайт связывания, либо второй сайт связывания связывает молекулу специфического рецептора Т-клеток или NK-клеток, которая является одной из нижеуказанных: CD3, TCR (рецептор Т-клеток), CD28, CD16, NKG2D, Oх40, 4-1BB, CD2, CD5 и CD95, при этом TCR представляет собой TCR (альфа/бета) или TCR (гамма/дельта).

3. Молекула антитела по п.1 или 2, в которой Fab-фрагмент связан с C_{H2} -доменом через C_{H1} - и V_H -домены тяжелой цепи Fab-фрагмента или через C_L - и V_L -домены легкой цепи Fab-фрагмента,

при этом домены тяжелой цепи Fab-фрагмента или домены легкой цепи Fab-фрагмента расположены на N-конце данной молекулы антитела, где C_{H2} -домен связан с scFv-фрагментом через переменный домен легкой цепи (домен V_L) scFv-фрагмента, содержащий второй сайт связывания, или через переменный домен тяжелой цепи (домен V_H) scFv-фрагмента, который содержит второй сайт связывания, или Fab-фрагмент, который содержит первый сайт связывания для первого антигена, состоит из V_L -домена, слитого с C_{H1} -доменом, и V_H -домена, объединенного с C_L -доменом,

причем C_{H1} -домен Fab-фрагмента объединен с C_{H2} -доменом и/или V_L - C_{H1} -цепь Fab-фрагмента расположена на N-конце молекулы антитела.

4. Молекула антитела по любому из предшествующих пунктов, в которой Fab-фрагмент включает шарнирный участок, при этом первый сайт связывания связывает ассоциированный с опухолью поверхностный антиген, а второй сайт связывания связывает один из следующих элементов: CD3, Т-клеточный рецептор (TCR), CD28, CD16, NKG2D, Oх40, 4-1BB, CD2, CD5 и CD95.

5. Молекула антитела по любому из предшествующих пунктов, которая содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, включающей удаление аминокислоты 228, удаление аминокислоты 229, удаление аминокислоты 230, удаление аминокислоты 231, удаление аминокислоты 232, удаление аминокислоты 233, замену Glu233→Pro, замену Leu234→Val, удаление аминокислоты 234, замену Leu235→Ala, удаление аминокислоты 235, удаление аминокислоты 236, удаление аминокислоты 237, удаление аминокислоты 238, замену Asp265→Gly, замену Asn297→Gln, замену Ala327→Gln и замену Ala330→Ser.

6. Лекарственный препарат для лечения пролиферативной патологии, содержащий в своем составе молекулу антитела по любому из предыдущих пунктов.

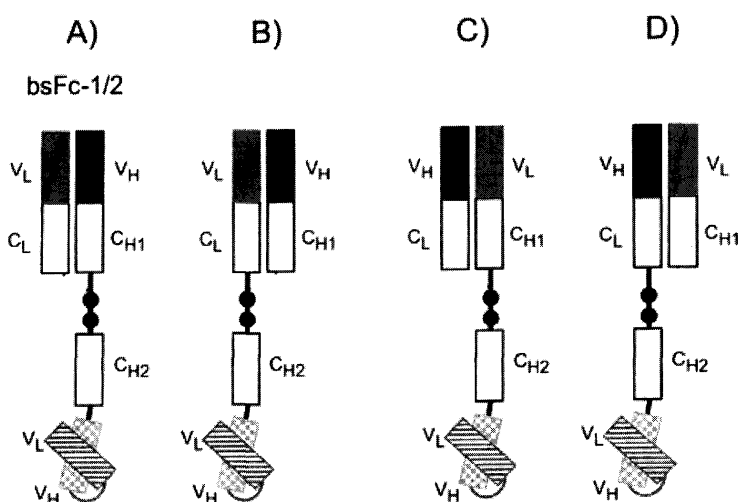
7. Применение молекулы антитела по пп.1-5 для терапии пролиферативной патологии, которая выбрана из группы, включающей гемопозитические злокачественные новообразования, такие как острые и хронические, миелоидные и лимфатические лейкозы, лимфомы, а также твердые опухоли, такие как опухоли желудочно-кишечного тракта, легких, почек, простаты, молочной железы, мозга, яичников, матки, мезенхимальные опухоли и меланома.

8. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу антитела по любому из пп.1-5.

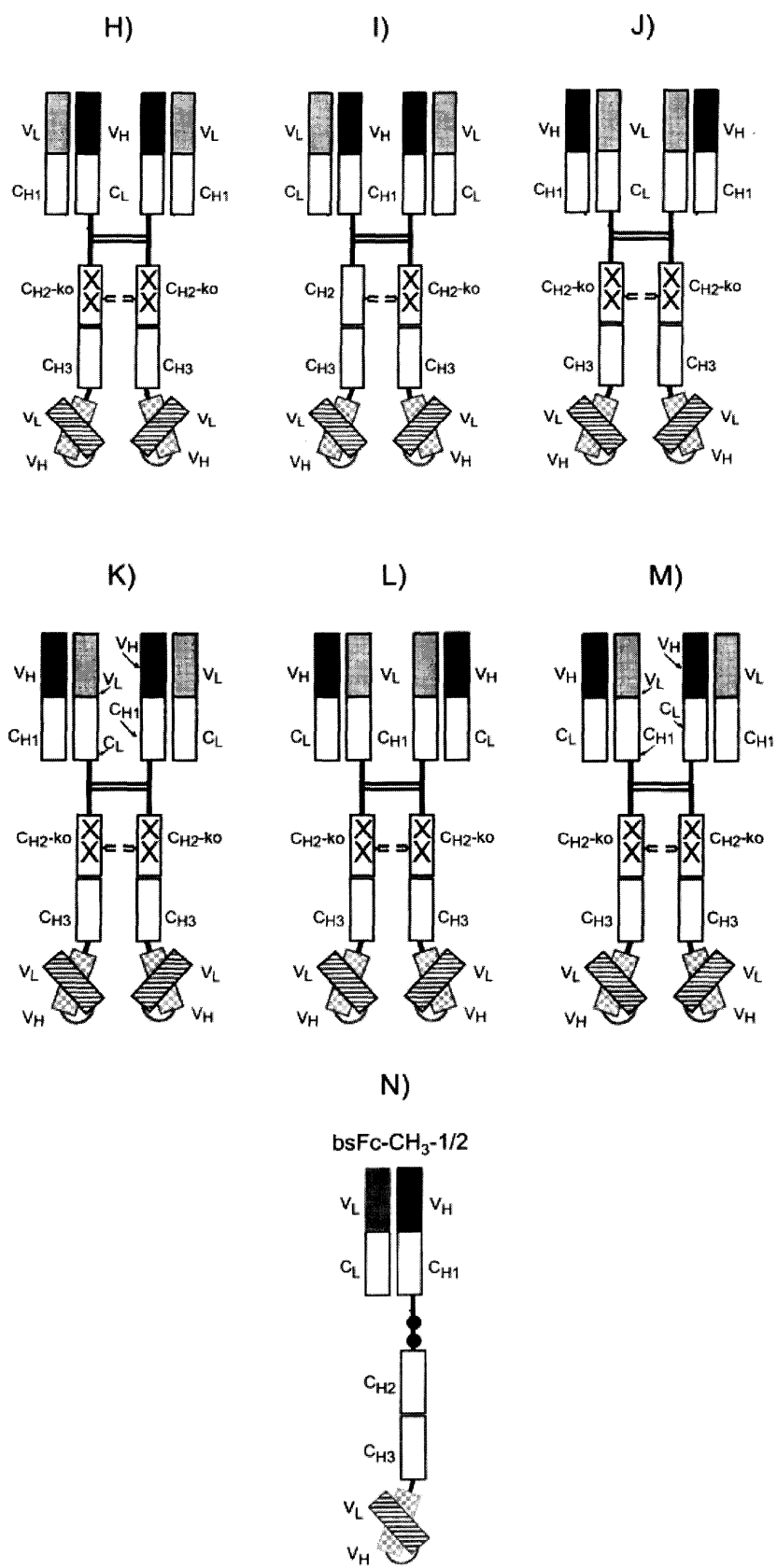
9. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.8 для экспрессии данной молекулы нуклеиновой кислоты.

10. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.8 или вектор по п.9.

11. Способ продуцирования молекулы антитела по любому из пп.1-5, включающий экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу антитела, в условиях, допускающих экспрессию данной нуклеиновой кислоты, при этом молекула антитела экспрессируется в клетке-хозяине или в бесклеточной системе.



Фиг. 1A-1D



Фиг. 1Н-1N

Модификации формата bsFc-1/2

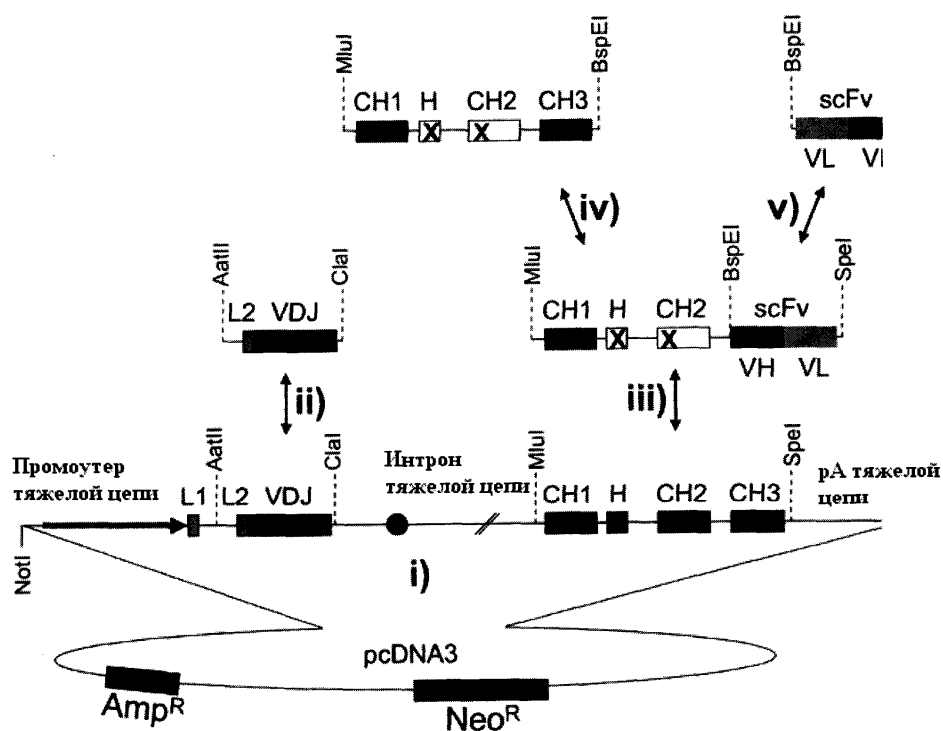
	функциональная петля																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
	верхняя												нижняя																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
	генетическая петля																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
	$CH_1 \Rightarrow \Leftarrow$												$\Rightarrow \Leftarrow CH_2$																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
Ig γ 1 (wt)	К	К	В	Е	Р	К	С	Д	К	Т	Н	Т	С	Р	Р	С	Р	А	Р	Е	Л	Л	Г	С	Р	С	В	В	Л																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										

Фиг. 10

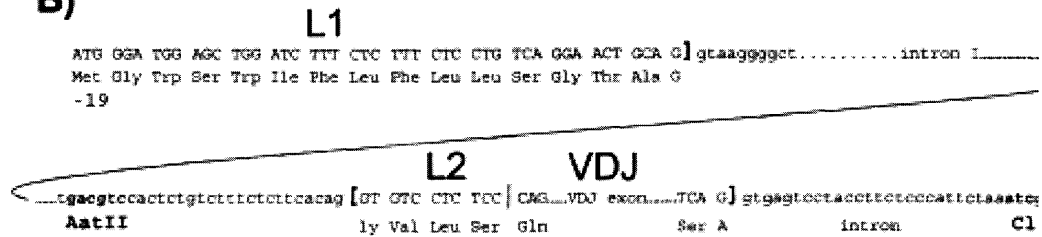
Модификации формата bsFc-1

		функциональная петля																																							
		верхняя												нижняя																											
		генетическая петля																																							
$CH_1 \Rightarrow$		$\Leftarrow$												$\Rightarrow$												$\Leftarrow$		$CH_2 \Rightarrow$												$\Rightarrow$	
Ig γ 1 (wt)	К	К	В	Е	Р	К	С	Д	К	Т	Н	Т	С	Р	Р	С	Р	А	Р	Е	Л	Л	Г	С	Р	С	В	Ф	Л		Д	Н	А	А							
Положение	215						220						226			229		233	234	235	236	237	238		239			242			245	247	249								
bsFc-1																																									
Δ_1																				P	V	A	—								G	Q	S								
Glycan																				P	V	A	—									G	Q	Q	S						
Δ_2																						V	A	—								G	Q	Q	S						
Δ_3																				P	V	A	—									G	Q	Q	S						
Δ_4																																	G	Q	Q	S					
Δ_5																																	G	Q	Q	S					

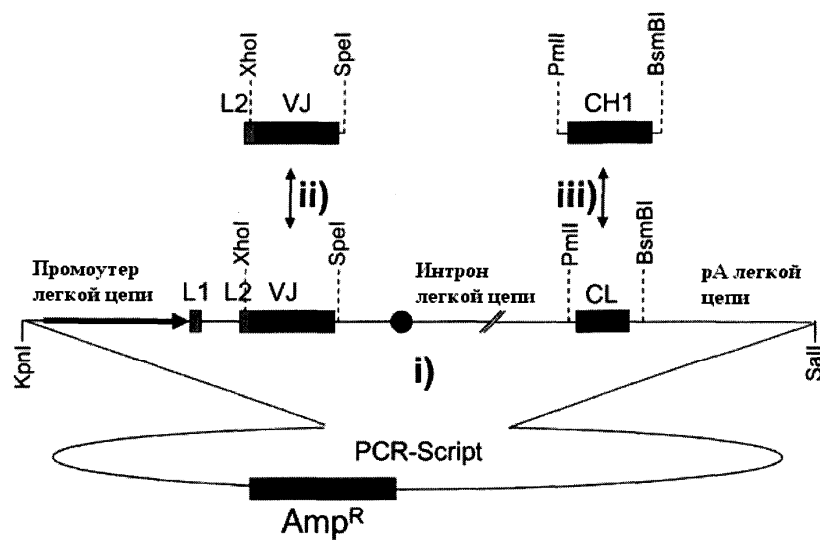
Фиг. 1Р



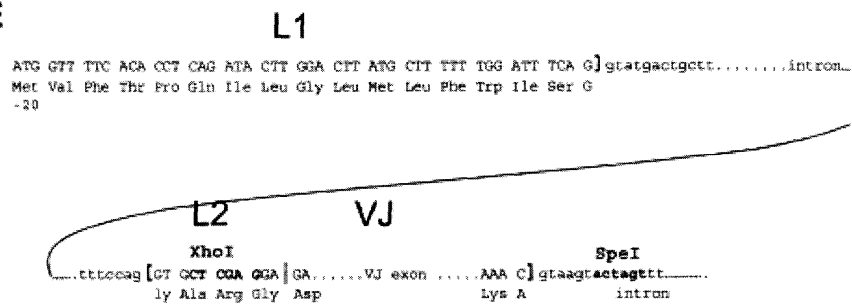
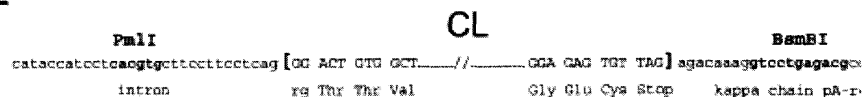
Фиг. 2А

B)**C)**

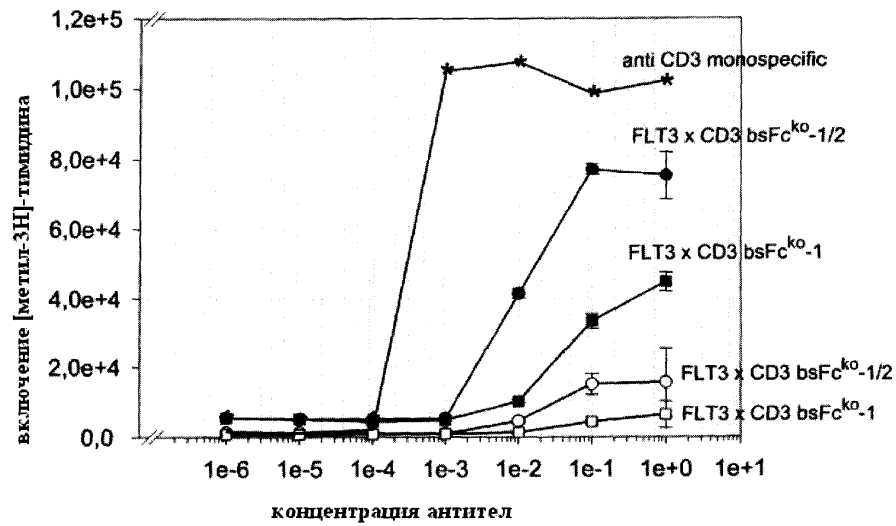
Фиг. 2B, 2C



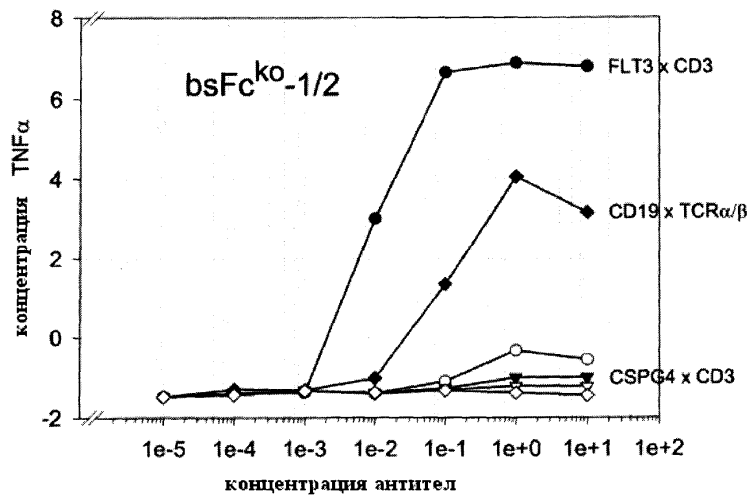
Фиг. 2D

E**F**

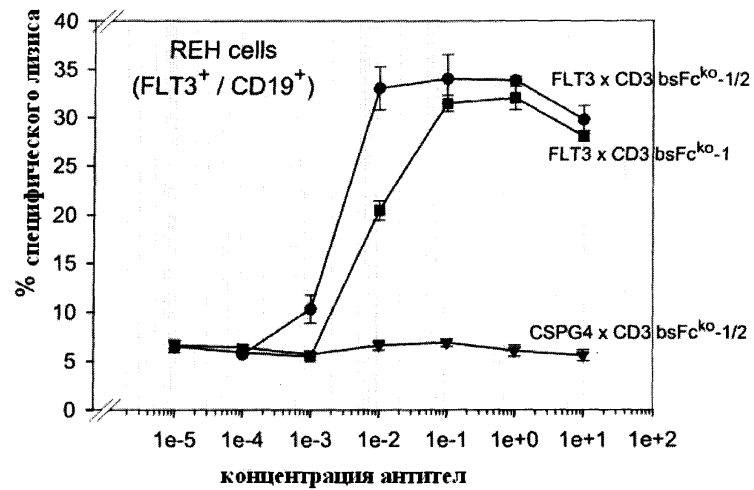
Фиг. 2E, 2F



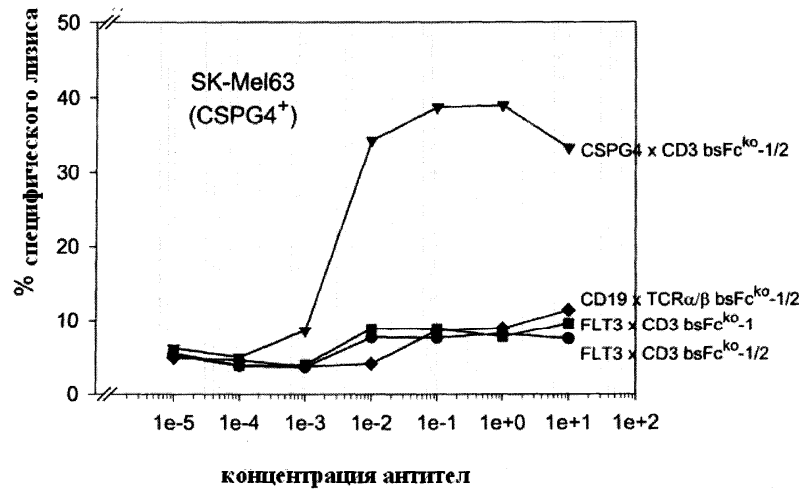
Фиг. 3А



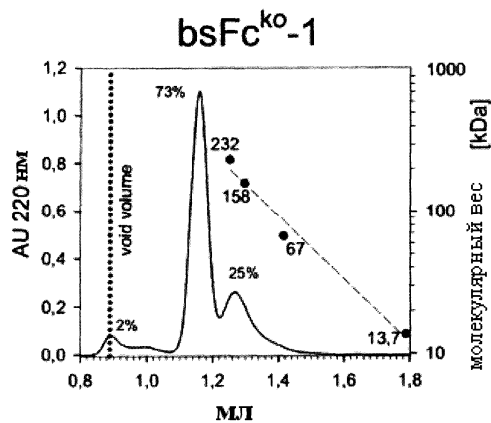
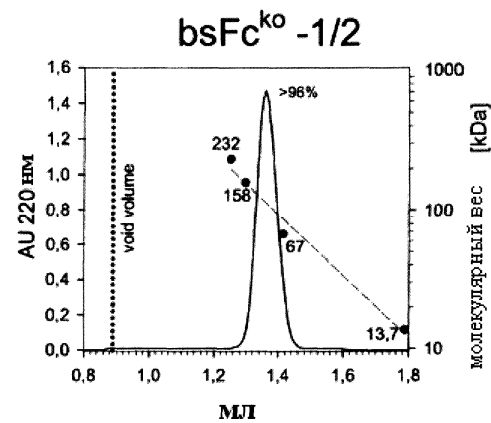
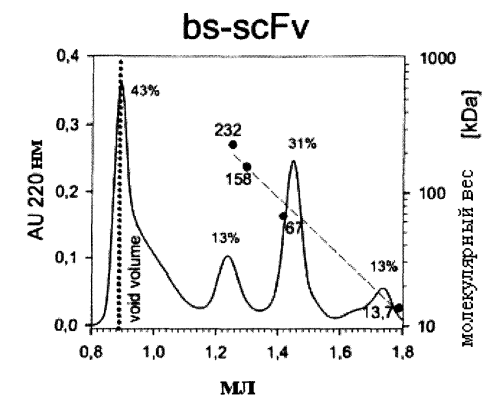
Фиг. 3В



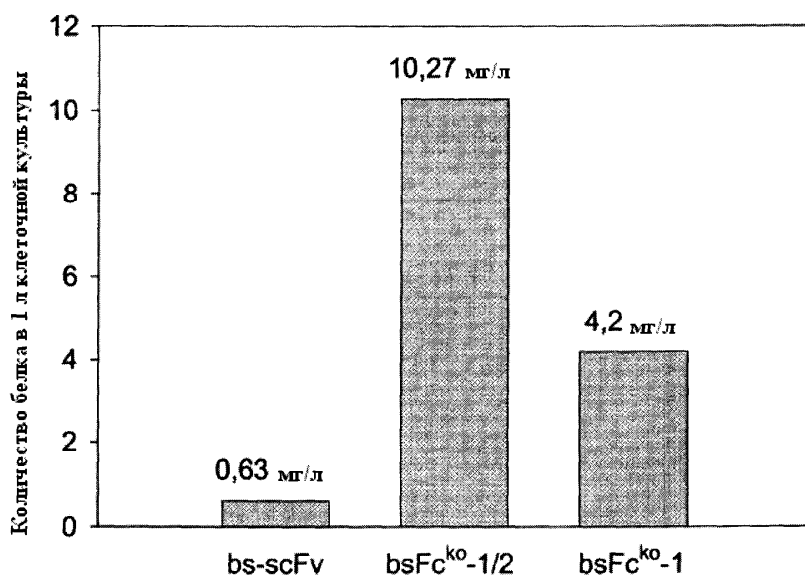
Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 5А



Фиг. 5B

А) последовательности лёгких цепей

1) Анти-FLT3 химерная легкая цепь (клон 4G8): (SEQ ID NO: 1)

DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSI¹SGIPSRFSGS
SGGTDFTL²SINSVETEDFGVYFCQQSNTWPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLN³FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL⁴SSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

2) Анти-FLT3 химерная легкая цепь (клон BV10): (SEQ ID NO: 2)

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTM⁵SCSKSSQLLNSGNQKNYMAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLN⁶FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL⁷SSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

3) Анти-CSPG4 химерная легкая цепь (клон 9.2.27): (SEQ ID NO: 3)

DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGN⁸SFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES⁹GVPA
RFSGSGSR¹⁰TDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLN¹¹FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL¹²SSTLTLSKADYEK
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

4) Анти-CD19 химерная легкая цепь (клон 4G7): (SEQ ID NO: 4)

DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKSLN¹³SGNTYLYWFLRPGQSPQLLIYRMSNLASGVP
DRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDGVYYCMQHLEYPTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLN¹⁴FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL¹⁵SSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

5) Анти-EGFR легкая цепь (клон C225): (SEQ ID NO: 5)

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSG
SGTDFTL¹⁶SINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLN¹⁷FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL¹⁸SSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

Фиг. 6A

В) последовательности тяжелых/главных цепей

- 1) FLT3 х CD3; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон 4G8) и C-терминальная CD3 одинарная цепь (клон UCHT1; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 6)
- QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEDPSSDYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTPDFWGGQTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDIRNYLNWYQQ
KPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGT
KVEIKGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAP
GKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYG
SDWYFDVWGGQGLTVTVSS*
- 2) FLT 3х CD3; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон BV10) и C-терминальная CD3 одинарная цепь (клон UCHT1; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 7)
- QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGSTDYNA
FISRLSISKDNSKQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYANHYAMDYWGQGSTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDIRNYL
NWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPW
TFGQGTKEIKGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMN
WVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RSYYGDSWYFDVWGGQGLTVTVSS*
- 3) FLT3 х TCRα/β; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон 4G8) и C-терминальная TCRα/β одинарная цепь (клон BMA031; V_H-V_L-ориентация)]
(SEQ ID NO: 8)
- QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEDPSSDYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTPDFWGGQTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYVMH
WVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVHYCAR
GSYYDYDGFVYQGGLTVTVSSGGGSGGGSGGGGSGQIVLTQSPAISASPGKEKVTMTCSAT
SSVSVMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQ
QWSSNPLTFGAGTKLELK*
- 4) FLT3 х TCRα/β; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон BV10) и C-терминальная TCRα/β одинарная цепь (клон BMA031; V_H-V_L-ориентация)]
(SEQ ID NO: 9)
- QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGSTDYNA
FISRLSISKDNSKQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYANHYAMDYWGQGSTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTS
YVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVH
YCARGSYDYDGFVYQGGLTVTVSSGGGSGGGSGGGGSGQIVLTQSPAISASPGKEKVTMT
CSATSSVSVMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATY
YCQQWSSNPLTFGAGTKLELK*

Фиг. 6B

- 5) FLT3 x CD28; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон 4G8) и C-терминальная CD28 одинарная цепь (клон 9.3; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 10)

QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEDPSDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTPDFWGGQTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIETQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQ
WYQQKPGQPPKLLIFAAASNVESGVPARFSGSGSGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPYT
FGGGTKLEIKRGGGGSGGGSGGGGSGQVQLQSGPGGLVTPSQSLSTCTVSGFSLSDYGVHW
VRQSPGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKQVFLKMNSLQADDTAVYYCARD
KGYSYYYSMDYWGQGTTLTVSS*

- 6) FLT3 x CD28; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон BV10) и C-терминальная CD28 одинарная цепь (клон 9.3; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 11)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGGSTDYNAA
FISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYANHYIAMDYWGQGTSTVTVSSAST
KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSG
DIETQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQQKPGQPPKLLIFAAASNVESGVPA
RFSGSGSGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGKLEIKRGGGGSGGGGSGGGG
SGQVQLQSGPGGLVTPSQSLSTCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQGLEWLGVIWAGGGTNYNS
ALMSRKSISKDNSKQVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTTLTVSS*

- 7) FLT3 x CD16; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон 4G8) и C-терминальная CD16 одинарная цепь (клон 3G8; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 12)

QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEDPSDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTPDFWGGQTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGSFMM
WYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESIGIPARFSASGSGDTFTLNIHPVEEEDTATYYCQQSNEDPYTF
GGGKLEIKGGGGSGGGSGGGGSGQVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLRTSGMGVGVW
IRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYYCAQINP
AWFAYWGQGTTLTVSS*

- 8) FLT3 x CD16; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон BV10) и C-терминальная CD16 одинарная цепь (клон 3G8; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 13)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGGSTDYNAA
FISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYANHYIAMDYWGQGTSTVTVSSAST
KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDG
DSFMMWYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESIGIPARFSASGSGDTFTLNIHPVEEEDTATYYCQQSNE
DPYTFGGGKLEIKGGGGSGGGSGGGGSGQVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLRTSG
MGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYY
CAQINPAWFAYWGQGTTLTVSS*

Фиг. 6В (продолжение)

- 9) CD19 x CD3; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-CD19 химерная тяжелая цепь (клон 4G7) и C-терминальная анти-CD3 одинарная цепь (клон UCHT1; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 14)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNE
KFKGKATLTS**DKSSSTAYMELSSLTSEDS****AVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSSASTK**
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVGVS**HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL**
NGKEYCKVSNKQLPSP**IEKTISKAKGQPSGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLN**
WYQQKPKGAPKLLIYYSRLESGVPSRFS**SGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGNTLPWT**
FGQGTKEIKGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNW
VRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS
GYGDSWDYFDYWGQGTTLTVSS*

- 10) CD19 x TCRα/β; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-CD19 химерная тяжелая цепь (клон 4G7) и C-терминальная анти-TCRα/β одинарная цепь (клон BMA031; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 15)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNE
KFKGKATLTS**DKSSSTAYMELSSLTSEDS****AVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSSASTK**
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVGVS**HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL**
NGKEYCKVSNKQLPSP**IEKTISKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSY**
VMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTS**DKSSSTAYMELSSLTSEDS****AVHY**
CARGSYDYDGFVYGGQGTTLTVSSGGGSGGGSGGGGQIVLTQSPAIMSASPGKVTMT
SATSSYSVMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGV**PARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYY**
CQQWSSNPLTFGAGTKLELK*

- 11) CD19 x CD28; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-CD19 химерная тяжелая цепь (клон 4G7) и C-терминальная CD28 одинарная цепь (клон 9.3; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 16)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNE
KFKGKATLTS**DKSSSTAYMELSSLTSEDS****AVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSSASTK**
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVGVS**HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL**
NGKEYCKVSNKQLPSP**IEKTISKAKGQPSG**
DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSMLQWYQQKPGQPPKLLIFAASNVESGVPA
RFSGSGSGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPTYFGGGTKLEIKRGGGSGGGSGGGG
SQVKLQQSGPGLVTPSQSL**SITCTVSGFSLSDYGVHWRQSPGQGLEWLGVWAGGGTNYNS**
ALMSRKSISKDNKSQVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYSMDYWGQGTTLTVSS*

- 12) CD19 x CD16; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-CD19 химерная тяжелая цепь (клон 4G7) и C-терминальная CD16 одинарная цепь (клон 3G8; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 17)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNE
KFKGKATLTS**DKSSSTAYMELSSLTSEDS****AVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSSASTK**
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVGVS**HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL**
NGKEYCKVSNKQLPSP**IEKTISKAKGQPSGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGD**
SFMN**WYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEDTATYYCQQSNED**
PYTFGGGTKEIKGGGSGGGSGGGGQVTLKESGPGLQPSQTLSTCSFSGFSLRTSGM
QVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYYC
AQINPAWFAYWGQGTTLTVSS*

Фиг. 6В (продолжение)

- 13) CSPG4 x CD3; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти- CSPG4 химерная тяжелая цепь (клон 9.2.27) и C-терминальная анти-CD3 одинарная цепь (клон UCHT1; V_L-V_H-ориентация)] (SEQ ID NO: 18)

QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSRSWMNWVKQRPQGQLEWIGRIYPGDDTNYN
GKFKGKATLTADKSSSTAYMQVSSLTSVDSAVYFCARGNTVVVPYTMMDYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDIRNY
LNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSSGSGSDTYLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLP
WTFGQGTKVEIKGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGLVQPGSLRLSCAASGSFTGYTM
NWVRQAPGKGLEWALINPYKGVSTNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTSS*

- 14) CSPG4 x TCRα/β; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти- CSPG4 химерная тяжелая цепь (клон 9.2.27) и C-терминальная анти-TCRα/β одинарная цепь (клон BMA031; V_L-V_H-ориентация)] (SEQ ID NO: 19)

QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSRSWMNWVKQRPQGQLEWIGRIYPGDDTNYN
GKFKGKATLTADKSSSTAYMQVSSLTSVDSAVYFCARGNTVVVPYTMMDYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFT
SYVMHWVKQKPGQLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTSDKSSTAYMESSLTSEDSAV
HYCARGSYDYDGFVYGQGTLVTSSGGGSGGGSGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTM
TCSATSSVSYMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAT
YYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK*

- 15) CSPG4 x CD28; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти- CSPG4 химерная тяжелая цепь (клон 9.2.27) и C-терминальная CD28 одинарная цепь (клон 9.3; V_L-V_H-ориентация)] (SEQ ID NO: 20)

QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSRSWMNWVKQRPQGQLEWIGRIYPGDDTNYN
GKFKGKATLTADKSSSTAYMQVSSLTSVDSAVYFCARGNTVVVPYTMMDYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSG
DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYVTSLMQWYQKPGQPPKLIFAASNVESGVPA
RFSGSGSGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQSRKVPYTFGGGTKLEIKRGGGSGGGSGGGS
SQVKLQQSGPLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQLEWLGVIWAGGGTNYNS
ALMSRKSISKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAVYCARDKGSYSYSMDYWGQGTTVTSS*

- 16) CSPG4 x CD16; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти- CSPG4 химерная тяжелая цепь (клон 9.2.27) и C-терминальная CD16 одинарная цепь (клон 3G8; V_L-V_H-ориентация)] (SEQ ID NO: 21)

QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSRSWMNWVKQRPQGQLEWIGRIYPGDDTNYN
GKFKGKATLTADKSSSTAYMQVSSLTSVDSAVYFCARGNTVVVPYTMMDYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFD
GDSFMNWYQKPGQPPKLIYTSNLESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYCQSN
EDPYTFGGGTKLEIKGGGSGGGSGGGSQVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLRTSG
MGVGWIRQPSGKLEWLAHIWWDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVLKIASVDTADTATY
CAQINPAWFAYWGQGTLVTSS*

Фиг. 6В (продолжение)

- 17) EGFR x CD3; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти- EGFR химерная тяжелая цепь (клон C225) и C-терминальная CD3 одинарная цепь (клон UCHT1; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 22)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVGVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQ
QKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNLTPWTFGQ
GTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQ
APGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYY
GDSDWYFDYWGQGLTVTVSS*

- 18) EGFR x TCRA/β; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти- EGFR химерная тяжелая цепь (клон C225) и C-терминальная TCRA/β одинарная цепь (клон BMA031; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 23)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVGVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYVMH
WVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVHYCAR
GSYYDYDGFVYGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAT
SSVSVMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQ
QWSSNPLTFGAGTKLELK*

- 19) EGFR x CD28; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти-EGFR химерная тяжелая цепь (клон C225) и C-терминальная CD28 одинарная цепь (клон 9.3; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 24)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVGVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSG
DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQKPGQPPKLLIFAASNVESGVPA
RFSGSGSGTNFSLNIHPVEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGKLEIKRGGGGSGGGSGGGG
SQVKLQQSGPGLVTPSQSLITCTVSGFSLSDYGVHWRQSPGQGLEWLGVIWAGGGTNYNS
ALMSRKSIKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSSYYSMDYWGQGLTVTVSS*

- 20) EGFR x CD16; bsFc^{ko}-1/2 [N-терминальная анти- EGFR химерная тяжелая цепь (клон C225) и C-терминальная CD16 одинарная цепь (клон 3G8; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 25)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVGVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGSFMI
NWYQKPGQPPKLLIYTSNLESQIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEDTATYYCQQSNEDPYT
FGGGKLEIKGGGGSGGGSGGGGSGVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLRTSGMGVG
WIRQPSGKGLEWLAHIWWDDEKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYYCAQIN
PAWFAYWGQGLTVTVSS*

Фиг. 6B (продолжение)

- 21) FLT3 x CD3; bsFc^{ko}-1 [N-терминальная анти-FLT3 химерная тяжелая цепь (клон 4G8) и С-терминальная CD3 одинарная цепь (клон UCHT1; V_L-V_H-ориентация)]
(SEQ ID NO: 26)

QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCCKSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTTPDFWGGGTTTLTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTP
 SSSLTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVGVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
KSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGAPKLLIYYTSRLESGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSE
 VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYDQ
KFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYGDSDWYFDVWGQGTTLTVSS*

Фиг. 6В (продолжение)



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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