

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193073 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.15

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.05.14

(54) ЕрСАМ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/847,778; PCT/US2019/032224; PCT/
US2019/032307; PCT/US2019/032302;
PCT/US2019/032306

(32) 2019.05.14

(33) US

(86) PCT/US2020/032985

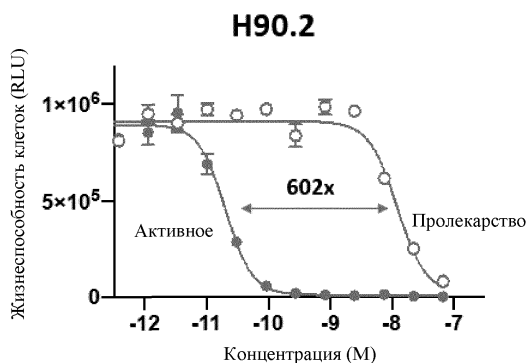
(87) WO 2020/232303 2020.11.19

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

(72) Изобретатель:
Веше Холгер, Остин Ричард Дж., Линь
Шоуэнь Джек, Лемон Брайан, Райт
Кевин, Роча Сони, Квонт Кэтрин (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,
Джермакян Р.В., Парамонова К.В.,
Угрюмов В.М., Христофоров А.А.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к ЕрСАМ-связывающим белкам, фармацевтическим композициям, содержащим такие белки или их фрагменты, а также нуклеиновым кислотам, рекомбинантным экспрессионным векторам и клеткам-хозяевам для получения таких ЕрСАМ-связывающих белков. Настоящее изобретение также относится к способам применения раскрытых ЕрСАМ-связывающих белков для профилактики и/или лечения заболеваний, состояний и нарушений.



A1

202193073

202193073

A1

ЕРСАМ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Описание

Ссылка на родственную заявку

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/847778, поданной 14 мая 2019 года, международной заявкой на выдачу патента № PCT/US2019/032307, поданной 14 мая 2019 года, международной заявкой на выдачу патента № PCT/US2019/032224, поданной 14 мая 2019 года, международной заявкой на выдачу патента № PCT/US2019/US032302, поданной 14 мая 2019 года, и международной заявкой на выдачу патента № PCT/US2019/032306, поданной 14 мая 2019 года, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Включение посредством ссылки

[0002] Все публикации, патенты и заявки на выдачу патента, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на выдачу патента была специально и отдельно указана как включенная посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Исследования показали, что молекула адгезии/активации эпителиальных клеток (EpCAM/CD326) экспрессируется по существу при всех аденокарциномах человека, при определенной плоскоклеточной карциноме, при ретинобластоме и при гепатоклеточной карциноме. См., например, Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) участвует в развитии рака. EpCAM является частью характерных признаков раковых распространяющихся клеток в многочисленных солидных опухолях и нормальных клетках-предшественников, и стволовых клеток. См. *Id.* EpCAM каузально участвует в пролиферации, миграции и сигнальной трансдукции при раке, например, раке молочной железы. См., например, Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 2004, 64: 5818–24.

[0004] Эдреколомаб, анти-EpCAM антитело, показало ограниченную эффективность в исследованиях фазы III. См. Eyvazi S, Farajnia S, Dastmalchi S, Kanipour F, Zarredar H, Bandehpour M. Antibody Based EpCAM Targeted Therapy of Cancer, Review and Update. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018,18(9):857-868. Другие анти-EpCAM антитела,

применяемые в различных клинических исследованиях, включают Адекватумумаб (полностью человеческое моноклональное антитело), Катумаксомаб (химерное антитело), Опортузумаб Монатокс (антитело scFv, конъюгированное с экзотоксином синегнойной палочки А (ETA), Цитатузумаб Богатокс (фрагмент Fab с буганиновым токсином), иммуно-конъюгированное антитело Тукотузумаб (моноклональное антитело м IL2). *См. Id.*

[0005] Существует потребность в большем выборе вариантов лечения, что позволит врачам выбирать терапевтическое средство с наилучшим профилем побочных эффектов для отдельного пациента. Настоящее изобретение относится к новым полипептидам и белковым терапевтическим средствам, полезным в способах лечения, особенно лечения состояний, связанных с аномальной экспрессией ЕpCAM.

Сущность настоящего изобретения

[0006] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к ЕpCAM-связывающему домену, содержащему определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497.

[0007] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен является частью мультиспецифического белка. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит CD3-связывающий домен. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок содержит форму активного лекарственного средства. Согласно некоторым вариантам

осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, связывающий основной сывороточный белок. Согласно некоторым вариантам осуществления основной сывороточный белок содержит сывороточный белок альбумин. Согласно некоторым вариантам осуществления сывороточный белок альбумин содержит человеческий сывороточный белок альбумин. Согласно некоторым вариантам осуществления домен, связывающий основной сывороточный белок, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 378. Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 379. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 492. Согласно некоторым вариантам осуществления домен, связывающий основной сывороточный белок, представляет собой связывающий фрагмент, содержащий линкер и маскирующий фрагмент, где маскирующий фрагмент способен маскировать связывание ЕрСАМ-связывающего домена или CD3-связывающего домена с их соответствующими мишенями. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок содержит форму нерасщепляемого пролекарства. Согласно некоторым вариантам осуществления маскирующий фрагмент содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 380-424, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 380-424. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-507 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-507 и 581. Согласно некоторым вариантам осуществления домен, связывающий основной сывороточный белок, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483. Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 474.

[0008] Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 495, 498-502, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере

75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 495 и 502. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578. Согласно некоторым вариантам осуществления активное лекарственное средство содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 153-179, 180-206, 210-212, 494, 571 и 574.

[0009] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен является частью химерного антигенного рецептора (CAR) или активируемого при определенных условиях химерного антигенного рецептора (ProCAR), где CAR дополнительно содержит по меньшей мере один из трансмембранного домена, костимулирующего домена и внутриклеточного сигнального домена. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен является частью ProCAR, и ProCAR дополнительно содержит (а) связывающий фрагмент, содержащий петлю, не относящуюся к CDR, и расщепляемый линкер, (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, где связывающий фрагмент способен маскировать связывание ЕpСAM-связывающего домена с его мишенью. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент дополнительно содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR). Согласно некоторым вариантам осуществления петля CDR обеспечивает сайт связывания, специфический для основного сывороточного белка. Согласно некоторым вариантам осуществления основной сывороточный белок содержит по меньшей мере один из: сывороточный альбумин, трансферрин, IgG1, IgG2, IgG4, IgG3, мономер IgA, фактор XIII, фибриноген, пентамерный IgM. Согласно некоторым вариантам осуществления основной сывороточный белок содержит сывороточный альбумин. Согласно некоторым вариантам осуществления сывороточный альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин. Согласно некоторым вариантам осуществления ProCAR дополнительно содержит костимулирующий домен, где костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен белка, выбранный из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна, но не более 20 модификаций содержат модификацию аминокислоты, которая опосредует клеточную передачу сигнала, или модификацию аминокислоты, которая фосфорилируется

в ответ на связывание лиганда с кодируемым слитым белком Т-клеточного рецептора. Согласно некоторым вариантам осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, выбранный из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дзета-цепи TCR, субъединицы CD3 эпсилон TCR, субъединицы CD3 гамма TCR, субъединицы CD3 дельта TCR, CD45, CD4, CDS, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточный сигнальный домен происходит из CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 альфа, CD3 бета или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен является частью ProCAR, и где ProCAR содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 485-491.

[0010] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающему введение ЕpCAM-связывающего домена согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей его, субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек.

[0011] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к активному при определенных условиях химерному антигенному рецептору (ProCAR), который содержит одну полипептидную цепь, содержащую (а) связывающий фрагмент, содержащий петлю, не относящуюся к CDR, и расщепляемый линкер, (b) ЕpCAM-связывающий домен, где ЕpCAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, (с) трансмембранный домен и (d) внутриклеточный сигнальный домен, где связывающий фрагмент способен маскировать связывание ЕpCAM-связывающего домена с его мишенью.

Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497.

[0012] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к активному при определенных условиях ЕpCAM-связывающему белку, содержащему связывающий фрагмент (М), который содержит петлю, не относящуюся к CDR, расщепляемый линкер (L), домен, связывающий первый антиген-мишень, (Т1) и домен, связывающий второй антиген-мишень, (Т2), где по меньшей мере один из домена, связывающего первый антиген-мишень, (Т1) и домена, связывающего второй антиген-мишень, (Т2) содержит ЕpCAM-связывающий домен, где ЕpCAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, где петля, не относящаяся к CDR, способна связываться с ЕpCAM-связывающим доменом или доменом, связывающим второй антиген-мишень, и где связывающий фрагмент способен маскировать связывание ЕpCAM-связывающего домена или домена, связывающего второй антиген-мишень, с его мишенью. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент содержит маскирующий фрагмент, и маскирующий фрагмент содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 380-424, или последовательность, содержащую одну или более замен относительно последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 380-424. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен относительно последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483. Согласно некоторым вариантам осуществления домен,

связывающий второй антиген-мишень, (T2) содержит CD3-связывающий домен. Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 474.

[0013] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающему введение активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей его, субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающему введение активного при определенных условиях ЕpСAM-связывающего белка согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей его, субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек.

[0014] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий домен представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий домен представляет собой однодоменное антитело, домен V_{HN}, scFv, домен V_H, домен V_L, Fab, Fab', не относящийся к Ig домен, лиганд, ноттин или низкомолекулярную единицу. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий домен содержит однодоменное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий домен связывается с ЕpСAM с аффинностью связывания (K_d) от около 0,001 нМ до около 500 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий домен связывается с человеческим ЕpСAM, мышинным ЕpСAM, ЕpСAM яванских макаков или их комбинацией.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к мультиспецифическому белку, содержащему ЕpСAM-связывающий домен, где ЕpСAM-связывающий домен представляет собой домен согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок содержит ЕpСAM-связывающий домен согласно настоящему изобретению (анти-ЕpСAM домен), и CD3-связывающий домен (анти-CD3 домен). Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕpСAM домен и анти-CD3 домен расположены в анти-ЕpСAM:анти-CD3 ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕpСAM домен и анти-CD3 домен расположены в анти-CD3: анти-ЕpСAM ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен согласно любому из пунктов

формулы изобретения 1-3 и 49-53 (анти-EpCAM домен), CD3-связывающий домен (анти-CD3 домен) и альбумин-связывающий домен (анти-ALB домен). Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CD3 домен содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO 379 или SEQ ID NO 474. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ALB домен содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO 375, SEQ ID NO 472, SEQ ID NO 473, SEQ ID NO 482 или SEQ ID NO 483.

Согласно некоторым вариантам осуществления анти-EpCAM домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-CD3: анти-ALB: анти-EpCAM ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-EpCAM домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-EpCAM: анти-ALB: анти-CD3 ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-EpCAM домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ALB: анти-EpCAM: анти-CD3 ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-EpCAM домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-CD3: анти-EpCAM: анти-ALB ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-EpCAM домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ALB: анти-CD3: анти-EpCAM ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-EpCAM домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-EpCAM: анти-CD3: анти-ALB ориентации.

[0015] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к мультивалентному белку, содержащему последовательность согласно любому из SEQ ID NO 495, 498-502, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к активному лекарственному средству, содержащему последовательность согласно любому из SEQ ID NO 494, 571 и 574. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к мультивалентному белку, содержащему последовательность согласно любому из SEQ ID NO 485-491.

[0016] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (i)(a) EpCAM-связывающий домен согласно настоящему изобретению, (i)(b) активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор согласно настоящему изобретению, (i)(c) активный при определенных условиях EpCAM-связывающий белок согласно настоящему изобретению, (i)(d) мультиспецифический белок согласно настоящему изобретению, (i)(e) мультивалентный белок согласно настоящему изобретению или (i)(f) активное лекарственное средство согласно настоящему изобретению и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

[0017] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения ЕрСАМ-связывающего домена согласно настоящему изобретению, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЕрСАМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению, в условиях, обеспечивающих экспрессию ЕрСАМ-связывающего домена, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры.

[0018] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения мультиспецифического белка согласно настоящему изобретению, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены мультиспецифического ЕрСАМ-связывающего белка согласно настоящему изобретению, в условиях, обеспечивающих экспрессию мультиспецифического белка, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры.

[0019] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающему введение ЕрСАМ-связывающего домена согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей его, субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающему введение мультиспецифического белка согласно настоящему изобретению, мультивалентного белка согласно настоящему изобретению, активного лекарственного средства согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение агента в комбинации с ЕрСАМ-связывающим доменом согласно настоящему изобретению, мультиспецифическим белком согласно настоящему изобретению, мультивалентным белком согласно настоящему изобретению, активным лекарственным средством согласно настоящему изобретению или фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен селективно связывается с опухолевыми клетками, экспрессирующими ЕрСАМ. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевое заболевание содержит заболевание, связанное с солидной опухолью. Согласно

некоторым вариантам осуществления заболевание, связанное с солидной опухолью, является метастатическим. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевое заболевание содержит по меньшей мере одно из колоректального рака, рака предстательной железы, нейроэндокринного рака, рака щитовидной железы, мелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака эндометрия, рака поджелудочной железы, рака желчных протоков, рака желчного пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, аденокарциномы. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение агента в комбинации с активным при определенных условиях химерным антигенным рецептором согласно настоящему изобретению, активным при определенных условиях ЕрСАМ-связывающим белком согласно настоящему изобретению или фармацевтической композицией, содержащей их. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен селективно связывается с опухолевыми клетками, экспрессирующими ЕрСАМ. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевое заболевание содержит заболевание, связанное с солидной опухолью. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание, связанное с солидной опухолью, является метастатическим. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевое заболевание представляет собой по меньшей мере одно из колоректального рака, рака предстательной железы, нейроэндокринного рака, рака щитовидной железы, мелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака эндометрия, рака поджелудочной железы, рака желчных протоков, рака желчного пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, аденокарциномы.

[0020] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора согласно настоящему изобретению, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор согласно настоящему изобретению, в условиях, обеспечивающих экспрессию активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения активного при определенных условиях ЕрСАМ-связывающего белка согласно настоящему изобретению, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены активного при определенных условиях ЕрСАМ-связывающего белка согласно настоящему изобретению,

в условиях, обеспечивающих экспрессию активного при определенных условиях ЕpСAМ-связывающего белка, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения мультивалентного белка согласно настоящему изобретению, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены мультивалентного белка согласно настоящему изобретению, в условиях, обеспечивающих экспрессию мультивалентного белка, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения активного лекарственного средства согласно настоящему изобретению, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены активного лекарственного средства согласно настоящему изобретению, в условиях, обеспечивающих экспрессию активного лекарственного средства, и выделение, и очистку полученного лекарственного средства из культуры.

[0021] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к клетке, содержащей CAR согласно настоящему изобретению.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к клетке, содержащей ProCAR согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления клеткой является Т-клетка или NK-клетка. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу, предусматривающему трансфекцию клетки согласно настоящему изобретению вектором или РНК, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR или ProCAR.

[0022] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к активному при определенных условиях химерному антигенному рецептору, который имеет более высокий терапевтический индекс по сравнению с химерным антигенным рецептором (CAR), который не содержит (а) связывающий фрагмент, но в остальном идентичен активному при определенных условиях химерному антигенному рецептору. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор имеет терапевтический индекс, который в по меньшей мере от около 5 раз до около 100 раз выше, чем терапевтический индекс химерного антигенного рецептора (CAR), который не содержит (а) связывающий фрагмент, но в остальном идентичен активному при определенных условиях химерному антигенному рецептору. Согласно некоторым вариантам осуществления белок содержит последовательность, которая на по меньшей

мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578. Согласно некоторым вариантам осуществления белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 576. Согласно некоторым вариантам осуществления белок содержит последовательность согласно SEQ ID NO 576. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях ЕрСАМ-связывающий белок имеет более высокий терапевтический индекс по сравнению с ЕрСАМ-связывающим белком, который не содержит связывающий фрагмент (М) или расщепляемый линкер (L), но в остальном идентичен активному при определенных условиях ЕрСАМ-связывающему белку. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях ЕрСАМ-связывающий белок имеет терапевтический индекс, который в по меньшей мере от около 5 раз до около 100 раз выше терапевтического индекса ЕрСАМ-связывающего белка, который не содержит связывающий фрагмент (М) или расщепляемый линкер (L), но в остальном идентичен активному при определенных условиях ЕрСАМ-связывающему белку.

[0023] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (i)(a) активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор согласно настоящему изобретению или (i)(b) активный при определенных условиях ЕрСАМ-связывающий белок согласно настоящему изобретению и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающему введение активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей его, субъекту, нуждающемуся в этом.

[0024] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающему введение активного при определенных условиях ЕрСАМ-связывающего белка согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей его, субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевое заболевание содержит по меньшей мере одно из колоректального рака, рака предстательной железы, нейроэндокринного рака, рака щитовидной железы, мелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака

желудка, рака яичников, рака эндометрия, рака поджелудочной железы, рака желчных протоков, рака желчного пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, аденокарциномы.

[0025] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу повышения терапевтического индекса ЕpСAM-связывающего домена, причем способ предусматривает конъюгирование ЕpСAM-связывающего домена со связывающим фрагментом, содержащим расщепляемый линкер и петлю, не относящуюся к CDR,

- где петля, не относящаяся к CDR, содержит сайт связывания, специфический для ЕpСAM-связывающего домена,

- где ЕpСAM-связывающий домен замаскирован от связывания с его мишенью связывающим фрагментом,

- где ЕpСAM-связывающий домен способен связываться с его мишенью при расщеплении расщепляемого линкера.

[0026] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен, конъюгированный со связывающим фрагментом, является частью активного при определенных условиях мультиспецифического белка, где мультиспецифический белок дополнительно содержит CD3-связывающий домен. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483. Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 379 и 474. Согласно некоторым вариантам осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581.

[0027] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична SEQ ID NO 576. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность согласно SEQ ID NO 576. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен, конъюгированный со связывающим фрагментом, является частью активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора, где активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор дополнительно содержит по меньшей мере один из трансмембранного домена, внутриклеточного сигнального домена и костимулирующего домена. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор содержит последовательность, которая на по меньшей мере около

75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 485-491.

[0028] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу повышения терапевтического индекса ЕpСAM-связывающего белка, содержащего домен, связывающий первый антиген-мишень, и домен, связывающий второй антиген-мишень, где по меньшей мере один из домена, связывающего первый антиген-мишень, и домена, связывающего второй антиген-мишень, содержит ЕpСAM-связывающий домен, причем способ предусматривает конъюгирование домена, связывающего первый антиген-мишень, или домена, связывающего второй антиген-мишень, со связывающим фрагментом, содержащим расщепляемый линкер и петлю, не относящуюся к CDR,

- где петля, не относящаяся к CDR, содержит сайт связывания, специфический для домена, связывающего первый антиген-мишень, или домена, связывающего второй антиген-мишень,

- где по меньшей мере один из домена, связывающего первый антиген-мишень, или домена, связывающего второй антиген-мишень, замаскирован от связывания с его мишенью посредством связывающего фрагмента, и

- где домен, связывающий первый антиген-мишень, или домен, связывающий второй антиген-мишень, который замаскирован, способен связываться с его мишенью при расщеплении расщепляемого линкера.

[0029] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152. Согласно некоторым вариантам осуществления петля, не относящаяся к CDR, содержит сайт связывания, специфический для ЕpСAM-связывающего домена. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере один из первого или домена, связывающего второй антиген-мишень содержит CD3-связывающий домен. Согласно некоторым вариантам осуществления петля, не относящаяся к CDR, содержит сайт связывания,

специфический для CD3-связывающего домена. Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична SEQ ID NO 474. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497. Согласно некоторым вариантам осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична SEQ ID NO 576. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность согласно SEQ ID NO 576.

[0030] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу повышения терапевтического индекса ЕpCAM-связывающего белка, содержащего ЕpCAM-связывающий домен и CD3-связывающий домен, причем способ предусматривает конъюгирование CD3-связывающего домена со связывающим фрагментом, содержащим расщепляемый линкер и петлю, не относящуюся к CDR, где петля, не относящаяся к CDR, содержит сайт связывания, специфический для CD3-связывающего домена. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более

замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152. Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична SEQ ID NO 474. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483. Согласно некоторым вариантам осуществления EpCAM-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497. Согласно некоторым вариантам осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична SEQ ID NO 576. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность согласно SEQ ID NO 576.

[0031] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к EpCAM-нацеленному активному при определенных условиях мультиспецифическому белку, содержащему EpCAM-связывающий домен, CD3-связывающий домен, альбумин-связывающий домен, где альбумин-связывающий домен содержит петлю, не относящуюся к CDR, которая содержит сайт связывания, специфический для CD3-связывающего домена, и расщепляемый линкер, где EpCAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более

замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152. Согласно некоторым вариантам осуществления альбумин-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСAМ-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497. Согласно некоторым вариантам осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична SEQ ID NO 576. Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность согласно SEQ ID NO 576.

[0032] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей ЕрСAМ-нацеленный активный при определенных условиях мультиспецифический белок согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения ЕрСAМ-нацеленного активного при определенных условиях мультиспецифического белка согласно настоящему изобретению, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены ЕрСAМ-нацеленного активного при определенных условиях мультиспецифического белка согласно настоящему изобретению, в условиях, обеспечивающих экспрессию ЕрСAМ-нацеленного активного при определенных условиях мультиспецифического белка, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры.

[0033] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания,

предусматривающему введение ЕpСAM-нацеленного активного при определенных условиях мультиспецифического белка согласно настоящему изобретению, или фармацевтической композиции согласно пункту формулы изобретения 149 или 150 субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевое заболевание содержит заболевание, связанное с солидной опухолью. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание, связанное с солидной опухолью, является метастатическим. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевое заболевание содержит по меньшей мере одно из колоректального рака, рака предстательной железы, нейроэндокринного рака, рака щитовидной железы, мелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака эндометрия, рака поджелудочной железы, рака желчных протоков, рака желчного пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, аденокарциномы.

[0034] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к ЕpСAM-связывающему домену, содержащему последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или одну или более аминокислотных замен относительно последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или одну или более аминокислотных замен относительно последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или одну или более замен относительно последовательности, выбранной из SEQ ID NO 115-152. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающий домен представляет собой однодоменное антитело, домен VHH, scFv, домен VH, домен VL, Fab, Fab', не относящийся к Ig домен, лиганд, ноттин или низкомолекулярную единицу. Согласно некоторым вариантам

осуществления ЕрСAМ-связывающий домен содержит однодоменное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий домен связывается с ЕрСAМ с аффинностью связывания (K_d) от около 0,001 нМ до около 500 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСAМ-связывающий домен связывается с человеческим ЕрСAМ, мышинным ЕрСAМ, ЕрСAМ яванских макаков или их комбинацией.

[0035] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к мультиспецифическому белку, содержащему ЕрСAМ-связывающий домен, где ЕрСAМ-связывающий домен представляет собой домен согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок содержит ЕрСAМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению (анти-ЕрСAМ домен) и CD3-связывающий домен (анти-CD3 домен). Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕрСAМ домен и анти-CD3 домен расположены в анти-ЕрСAМ:анти-CD3 ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕрСAМ домен и анти-CD3 домен расположены в анти-CD3: анти-ЕрСAМ ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок содержит ЕрСAМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению (анти-ЕрСAМ домен), CD3-связывающий домен (анти-CD3 домен) и альбумин-связывающий домен (анти-ALB домен). Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CD3 домен содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO 379 или SEQ ID NO 474. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ALB домен содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO 375, SEQ ID NO 472, SEQ ID NO 473, SEQ ID NO 482 или SEQ ID NO 483. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕрСAМ домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-CD3: анти-ALB: анти-ЕрСAМ ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕрСAМ домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ЕрСAМ: анти-ALB: анти-CD3 ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕрСAМ домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ALB: анти-ЕрСAМ: анти-CD3 ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕрСAМ домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ALB: анти-ЕрСAМ: анти-CD3 ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕрСAМ домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-CD3: анти-ЕрСAМ: анти-ALB ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕрСAМ домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ALB: анти-CD3: анти-ЕрСAМ ориентации. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕрСAМ домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ЕрСAМ: анти-CD3: анти-ALB ориентации.

[0036] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к мультивалентному белку, содержащему последовательность согласно любому из SEQ ID NO 485-491. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (i)(a) ЕрСАМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению, (i)(b) мультиспецифический белок согласно настоящему изобретению или (i)(c) мультивалентный белок согласно настоящему изобретению и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

[0037] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу получения ЕрСАМ-связывающего домена согласно настоящему изобретению, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЕрСАМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению, в условиях, обеспечивающих экспрессию ЕрСАМ-связывающего домена, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения мультиспецифического белка согласно настоящему изобретению, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены мультиспецифического ЕрСАМ-связывающего белка согласно настоящему изобретению, в условиях, обеспечивающих экспрессию мультиспецифического белка, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры.

[0038] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающему введение ЕрСАМ-связывающего домена согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

[0039] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающему введение мультиспецифического белка согласно настоящему изобретению, мультивалентного белка согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение агента в комбинации с ЕрСАМ-связывающим доменом согласно

настоящему изобретению, мультиспецифическим белком согласно настоящему изобретению, мультивалентным белком согласно настоящему изобретению или фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСAM-связывающий домен селективно связывается с опухолевыми клетками, экспрессирующими ЕрСAM. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевое заболевание содержит заболевание, связанное с солидной опухолью. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание, связанное с солидной опухолью, является метастатическим.

Краткое описание чертежей

[0040] Новые признаки настоящего изобретения подробно изложены в приложенной формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет достигнуто при обращении к нижеследующему подробному описанию, в котором представлены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения, и прилагаемым чертежам, где:

[0041] На **Фиг. 1** представлены результаты анализа репрезентативной зависимой от Т-клеток клеточно-опосредованной цитотоксичности с NCI-H508 клетками с применением иллюстративных слитых белков согласно настоящему изобретению, содержащих анти-ЕрСAM домен, как описано в настоящем документе, и анти-CD3 домен.

[0042] На **Фиг. 2** представлены результаты анализа репрезентативной зависимой от Т-клеток клеточно-опосредованной цитотоксичности с применением иллюстративных слитых белков согласно настоящему изобретению, содержащих анти-ЕрСAM домен, как описано в настоящем документе, и анти-CD3 домен.

[0043] На **Фиг. 3** представлены результаты анализа репрезентативной зависимой от Т-клеток клеточно-опосредованной цитотоксичности с применением иллюстративных слитых белков согласно настоящему изобретению, содержащих анти-ЕрСAM домен, как описано в настоящем документе, и анти-CD3 домен.

[0044] На **Фиг. 4** представлены результаты анализа репрезентативной зависимой от Т-клеток клеточно-опосредованной цитотоксичности с применением иллюстративных слитых белков согласно настоящему изобретению, содержащих анти-ЕрСAM домен, как описано в настоящем документе, и анти-CD3 домен.

[0045] На **Фиг. 5** представлены результаты анализа репрезентативной зависимой от Т-клеток клеточно-опосредованной цитотоксичности с применением иллюстративных слитых белков согласно настоящему изобретению, содержащих гуманизированный анти-ЕрСAM домен, как описано в настоящем документе, и анти-CD3 домен.

[0046] На **Фиг. 6** проиллюстрированы иллюстративные конструкции ProCAR. Одна иллюстративная конструкция включает анти-человеческий EpCAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 485). Одна иллюстративная конструкция включает анти-человеческий сывороточный альбумин sdAb, анти-человеческий EpCAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 486). Одна иллюстративная конструкция включает анти-человеческий сывороточный альбумин sdAb, анти-человеческий EpCAM sdAb, эпитоп FLAG, CD8 шарнирная область/трансмембранный домен, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 487). Одна иллюстративная конструкция включает анти-человеческий сывороточный альбумин sdAb, анти-человеческий EpCAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 488). Одна иллюстративная конструкция включает анти-человеческий сывороточный альбумин sdAb, сайт расщепления протеазой 3, анти-человеческий EpCAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 489). Одна иллюстративная конструкция включает анти-человеческий сывороточный альбумин sdAb, сайт расщепления протеазой 3, анти-человеческий EpCAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 490). Одна иллюстративная конструкция включает анти-GFP sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 491).

[0047] На **Фиг. 7** показано стерическое блокирование анти-EpCAM sdAb H90 посредством HSA указанных конструкций при соотношениях CAR-Т:клетки-мишени 10:1, 5:1, 2,5:1 и 1,25:1.

[0048] На **Фиг. 8А-8С** приведены гистограммы EpCAM-Fc/окрашивание Alexa Fluor 647 CAR-Т-клеток согласно **Фиг. 6**, которые были сгруппированы согласно низкой (**Фиг. 8А**), средней (**Фиг. 8В**) или высокой (**Фиг. 8С**) экспрессии CAR на основе анти-FLAG окрашивания, что демонстрирует эффективность EpCAM mask 1 при блокировании ProCAR EpCAM-связывающей активности. Числа относятся к идентификационным номерам последовательностей (например, 491 = SEQ ID NO 491).

[0049] На **Фиг. 9А-9С** приведены гистограммы EpCAM-Fc/окрашивание Alexa Fluor 647 CAR-Т-клеток согласно **Фиг. 6**, которые были сгруппированы согласно низкой (**Фиг.**

9A), средней (**Фиг. 9B**) или высокой (**Фиг. 9C**) экспрессии CAR на основе анти-FLAG окрашивания, что демонстрирует эффективность EpCAM mask 2 при блокировании ProCAR EpCAM-связывающей активности. Числа относятся к идентификационным номерам последовательностей (например, 488 = SEQ ID NO 488).

[0050] На **Фиг. 10** продемонстрирована маскировка анти-EpCAM sdAb H90 конструкциями согласно **Фиг. 6** при соотношениях CAR-Т:клетки-мишени 10:1, 5:1, 2,5:1 и 1,25:1.

[0051] На **Фиг. 11** показана зависимость от сайта расщепления протеазой активация активности уничтожения клеток EpCAM ProCAR mask 2.

[0052] На **Фиг. 12A-12C** проиллюстрирована активация протеазой EpCAM Mask 1 ProCAR антиген-связывающей активности при низкой (**Фиг. 12A**), средней (**Фиг. 12B**) или высокой (**Фиг. 12C**) экспрессии CAR на основе анти-FLAG окрашивания. Числа относятся к идентификационным номерам последовательностей (например, 489 = SEQ ID NO 489).

[0053] На **Фиг. 13A-13C** проиллюстрирована активация протеазой EpCAM Mask 2 ProCAR антиген-связывающей активности при низкой (**Фиг. 13A**), средней (**Фиг. 13B**) или высокой (**Фиг. 13C**) экспрессии CAR на основе анти-FLAG. Числа относятся к идентификационным номерам последовательностей (например, 485 = SEQ ID NO 485).

[0054] На **Фиг. 14A-14C** показано изменение в процентах массы тела у мышей после введения иллюстративных молекул EpCAM ProTriTAC (EpCAM ProTriTAC, содержащие линкер L040 согласно **Фиг. 14B**, EpCAM ProTriTAC, содержащие нерасщепляемый линкер согласно **Фиг. 14C**) и молекул EpCAM TriTAC (**Фиг. 14A**) согласно настоящему изобретению.

[0055] На **Фиг. 15A-15C** показана кинетика связывания для различных EpCAM-связывающих доменов, H13 (**Фиг. 15A**), H90 (**Фиг. 15B**) и H90.2 (**Фиг. 15C**).

[0056] На **Фиг. 16A-16C** показаны результаты анализа зависимой от Т-клеток цитотоксичности (TDCC анализ) на клетках HCT116, с использованием белков ProTriTAC, TriTAC или активных лекарственных средств (СТ), содержащих EpCAM-связывающие домены H13 (**Фиг. 16A**), H90.2 (**Фиг. 16B**) и H138.2 (**Фиг. 16C**).

[0057] На **Фиг. 17A-17C** показаны результаты анализа зависимой от Т-клеток цитотоксичности (TDCC анализ) на клетках NCI-H929, с использованием белков ProTriTAC, TriTAC или активных лекарственных средств (СТ), содержащих EpCAM-связывающие домены H13 (**Фиг. 17A**), H90.2 (**Фиг. 17B**) и H138.2 (**Фиг. 17C**).

[0058] На **Фиг. 18A-18B** показаны результаты анализа зависимой от Т-клеток цитотоксичности (TDCC анализ) на клетках HCT116 (**Фиг. 18A**) и HCT116 (EpCAM-нокаут,

КО) (**Фиг. 18В**), с использованием TriTAC, содержащего EpCAM-связывающие домены H13 и H90.2.

[0059] На **Фиг. 19** показаны результаты анализа проточной цитометрии для измерения связывания клеток HCT116 дикого типа (WT) и клеток HCT116 (EpCAM-нокаут, КО) и EpCAM-связывающих доменов H13 и H90.2.

[0060] На **Фиг. 20** показаны результаты анализа TDCC на клетках SKBR3, с использованием вариантов нерасщепляемого пролекарства или активного лекарственного средства (СТ), содержащих EpCAM-связывающие домены H13 или H90.2

[0061] На **Фиг. 21А-21В** представлены репрезентативные графики, демонстрирующие эффект маскировки, достигаемый вариантами нерасщепляемого пролекарства, содержащего EpCAM-связывающие домены H13 (**Фиг. 21А**) или H90.2 (**Фиг. 21В**), по сравнению с активными лекарственными средствами, содержащими эти домены.

[0062] На **Фиг. 22А-22Н** показаны результаты анализа TDCC на различных клеточных линиях, с применением вариантов нерасщепляемого пролекарства (NCLV), ProTriTAC (L040) или активного лекарственного средства (СТ), содержащих EpCAM-связывающие домены H13 или H90.2. На **Фиг. 22А** показаны результаты для клеток CAPAN2, на **Фиг. 22В** показаны результаты для клеток DMS53, на **Фиг. 22С** показаны результаты для клеток HepG2, на **Фиг. 22D** показаны результаты для клеток KMRC3, на **Фиг. 22Е** показаны результаты для клеток MDAРCA2b, на **Фиг. 22F** показаны результаты для клеток OVCAR8, на **Фиг. 22G** показаны результаты для клеток PЕCАРJ41, на **Фиг. 22Н** показаны результаты для клеток SKBR3.

[0063] На **Фиг. 23А-23В** показана эффективность вариантов ProTriTAC (**Фиг. 23В**) и TriTAC (**Фиг. 23А**), содержащих EpCAM-связывающий домен H13, на мышинной модели опухоли.

[0064] На **Фиг. 24А-24D** показаны профили цитокинов после введения вариантов ProTriTAC и TriTAC, содержащих EpCAM-связывающий домен H13, у яванских макак, на **Фиг. 24А** показаны уровни IFN-гамма, на **Фиг. 24В** показаны уровни IL-2, на **Фиг. 24С** показаны уровни IL-6 и на **Фиг. 24D** показаны уровни IL-10.

[0065] На **Фиг. 25А-25В** показаны концентрации в плазме после введения вариантов ProTriTAC и TriTAC, содержащих EpCAM-связывающий домен H13 (**Фиг. 25А**) или H90.2 (**Фиг. 25В**), у яванских макак.

[0066] На **Фиг. 26** показан вариабельный домен молекулы иммуноглобулина, содержащий определяющие комплементарность области (CDR1, CDR2 и CDR3), и петли, не относящиеся к CDR, соединяющие нить бета (AB, CC', C'' D, EF и DE).

[0067] На **Фиг. 27** показано иллюстративное расположение антиген-мишень-связывающего домена (aTarget 1), расщепляемого линкера и связывающего фрагмента (aTarget 2) согласно настоящему изобретению.

[0068] На **Фиг. 28** показан пример активного при определенных условиях рецептора, как описано в настоящем документе.

[0069] На **Фиг. 29А-29К** показана эффективность контроля TriTAC, белков EpCAM ProTriTAC и EpCAM TriTAC на установленной модели опухоли LoVo (рак ободочной кишки), на **Фиг. 29А** показаны результаты для контроля TriTAC, на **Фиг. 29В** показаны результаты для EpCAM TriTAC при 0,003 мг/кг, на **Фиг. 29С** показаны результаты для EpCAM TriTAC при 0,01 мг/кг, на **Фиг. 29D** показаны результаты для EpCAM TriTAC при 0,03 мг/кг, на **Фиг. 29Е** показаны результаты для EpCAM TriTAC при 0,1 мг/кг, на **Фиг. 29F** показаны результаты для EpCAM TriTAC при 0,1 мг/кг, на **Фиг. 29G** показаны результаты для EpCAM ProTriTAC при 0,03 мг/кг, на **Фиг. 29H** показаны результаты для EpCAM ProTriTAC при 0,1 мг/кг, на **Фиг. 29I** показаны результаты для EpCAM ProTriTAC при 0,3 мг/кг, на **Фиг. 29J** показаны результаты для EpCAM ProTriTAC при 1 мг/кг, и на **Фиг. 29К** показаны результаты для EpCAM ProTriTAC при 3 мг/кг.

[0070] На **Фиг. 30А-30Е** представлены уровни выживания (**Фиг. 30А-30В**), аланинтрансаминазы (ALT) (**Фиг. 30С**), аспартаттрансаминазы (AST) (**FIG. 30D**) и общего билирубин (**Фиг. 30Е**) после введения вариантов ProTriTAC или TriTAC, содержащих EpCAM-связывающий домен.

[0071] На **Фиг. 31** представлены результаты и сводные данные гистопатологического исследования с использованием контроля GFP TriTAC, EpCAM TriTAC или EpCAM ProTriTAC.

[0072] На **Фиг. 32** приведено схематическое изображение EpCAM-нацеленного триспецифического белка.

Подробное описание настоящего изобретения

[0073] В настоящем документе описаны триспецифические белки, которые нацелены на EpCAM, их фармацевтические композиции, а также нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения таких белков. Настоящее изобретение также относится к способам применения раскрытых EpCAM-нацеленных триспецифических белков для профилактики и/или лечения заболеваний, состояний и нарушений. EpCAM-нацеленные триспецифические белки способны специфически связываться с EpCAM, а также с CD3 и имеют домен с увеличенным периодом полувыведения, такой как домен, связывающийся с человеческим альбумином

(ALB). На **Фиг. 32** приведен неограничивающий пример триспецифического ЕpСАМ-связывающего белка.

Определенные термины

[0074] Используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных случаев и не предназначена для ограничения. В контексте настоящего изобретения формы единственного числа предназначены для включения форм множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Кроме того, в той степени, в которой термины «включающий», «включает», «имеющий», «имеет», «с» или их варианты используются в подробном описании настоящего изобретения и/или формуле изобретения, такие термины являются включающими аналогично термину «содержащий».

[0075] Термин «около» или «приблизительно» означает в пределах допустимого диапазона ошибок для конкретного значения, как определено специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как значение измеряют или определяют, например, от ограничений системы измерения. Например, «приблизительно» может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения в зависимости от практики для данного значения. Если конкретные значения описаны в описании настоящего изобретения и формуле изобретения, если не указано иное, следует предполагать, что термин «приблизительно» означает допустимый диапазон ошибок для конкретного значения.

[0076] Термины «индивидуум», «пациент» или «субъект» используются взаимозаменяемо. Ни один из терминов не требует и не ограничивается ситуацией, характеризующейся наблюдением (например, постоянным или периодическим) медицинским работником (например, врачом, дипломированной медсестрой, практикующей медсестрой, фельдшером, санитаром или работником хосписа).

[0077] «Антитело», как правило, относится к Y-образному тетрамерному белку, содержащему две тяжелые (H) и две легкие (L) полипептидные цепи, удерживаемые вместе ковалентными дисульфидными связями и нековалентными взаимодействиями. Легкие цепи человека содержат переменный домен (VL) и константный домен (CL), где константный домен может быть легко классифицирован как каппа или лямбда на основе аминокислотной последовательности и генных локусов. Каждая тяжелая цепь содержит один переменный домен (VH) и константную область, которая в случае IgG, IgA и IgD содержит три домена, называемых CH1, CH2 и CH3 (IgM и IgE имеют четвертый домен, CH4). В классах IgG, IgA и IgD домены CH1 и CH2 разделены гибкой шарнирной областью, которая представляет собой богатый пролином и цистеином сегмент переменной длины (в общем от около 10

до около 60 аминокислот в IgG). Вариабельный домен как в легкой, так и в тяжелой цепях соединены с константными доменами областью «J» из около 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также имеет область «D» из около 10 дополнительных аминокислот. Каждый класс антитела дополнительно содержит межцепочечные и внутрицепочечные дисульфидные связи, образованные спаренными остатками цистеина. В молекулах иммуноглобулинов есть два типа нативных дисульфидных мостиков или связей: межцепочечные и внутрицепочечные дисульфидные связи. Расположение и число межцепочечных дисульфидных связей варьируются в зависимости от класса и вида иммуноглобулинов. Межцепочечные дисульфидные связи расположены на поверхности иммуноглобулина, доступны для растворителя и обычно относительно легко восстанавливаются. В изоформе IgG1 человека присутствуют четыре межцепочечных дисульфидных связи, по одной от каждой тяжелой цепи к легкой цепи и две между тяжелыми цепями. Межцепочечные дисульфидные связи не требуются для ассоциации цепей. Как хорошо известно, богатая цистеином шарнирная область IgG1 тяжелой цепи в общем состоит из трех частей: верхней шарнирной области, центральной шарнирной области и нижней шарнирной области. Специалистам в данной области техники понятно, что шарнирная область IgG1 содержит цистеины в тяжелой цепи, которые включают межцепочечные дисульфидные связи (две тяжелая/тяжелая, две тяжелая/легкая), которые обеспечивают структурную гибкость, которая облегчает движения Fab. Межцепочечные дисульфидные связи между легкой и тяжелой цепями IgG1 образуются между C214 каппа- или лямбда-легкой цепи и C220 в верхней шарнирной области тяжелой цепи. Межцепочечные дисульфидные связи между тяжелыми цепями находятся в положениях C226 и C229 (все пронумерованы в соответствии с индексом ЕС в соответствии с Kabat, et al., *infra.*)

[0078] В контексте настоящего изобретения термин «антитело» включает поликлональные антитела, мультиклональные антитела, моноклональные антитела, химерные антитела, деиммунизированные, гуманизированные и приматизированные антитела, антитела с привитыми CDR, человеческие антитела, рекомбинантно полученные антитела, интратела, мультиспецифические антитела, биспецифические антитела, моновалентные антитела (например, моновалентные антитела IgG), поливалентные антитела, антиидиотипические антитела, синтетические антитела, включая мутеины и их варианты, фрагменты иммуноспецифических антител, такие как фрагменты hIgG, V-NAR, Fv, Fd, Fab, F(ab')₂, F(ab'), Fab2, Fab3, одноцепочечные фрагменты (например, ди-scFv, scFv, scFvFc, scFv-zipper, scFab), дисульфидно-связанные Fv (sdFv), фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как

нанотела или антитела с одним переменным доменом, содержащие только один переменный домен, как например sdAb (домен VH, VL или VHH), «г IgG» («полуантитело»), диатела, одноцепочечные диатела, tandemные диатела (Tandab), tandemный di-scFv, tandemный tri-scFv, «минитела» в некоторых случаях представлены следующей структурой: (VH-VL-CH3)2, (scFv-CH3)2, ((scFv)2-CH3+CH3), ((scFv)2-CH3) или (scFv-CH3-scFv)2, мультитела, такие как триатела или тетратела, и их производные, включая слитые Fc и другие модификации, и любую другую иммунореактивную молекулу, если она содержит домен, имеющий сайт связывания для преимущественной ассоциации или связывания с белком EpCAM. Более того, если из контекста не следует иное, термин дополнительно включает все классы антител (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) и все подклассы (т.е. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2). Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, обычно обозначают соответствующей строчной греческой буквой альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю, соответственно. Легкие цепи антител любого вида позвоночных могут быть отнесены к одному из двух четко различающихся типов, называемых kappa (kappa) и lambda (lambda), на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. Согласно некоторым вариантам осуществления EpCAM-связывающие белки содержат антитело, содержащее только тяжелую цепь, как например домен VH или VHH. В некоторых случаях EpCAM-связывающие белки содержат антитело, содержащее только тяжелую цепь, которое является сконструированным человеческим доменом VH. В некоторых примерах сконструированный человеческий домен VH получают путем пэннинга библиотек фагового дисплея. Согласно некоторым вариантам осуществления EpCAM-связывающие белки содержат VHH. В контексте настоящего изобретения термин «VHH» относится к связывающему домену одноцепочечного антитела, лишенного легкой цепи. В некоторых случаях VHH происходит из антител типа, который обнаруживается у верблюдовых или хрящевых рыб, которые в природе лишены легких цепей, или относится к синтетическому и неиммунизированному VHH, который может быть сконструирован соответствующим образом. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область, кодируемую экзонами V, D и J. В некоторых случаях VHH представляет собой нативный VHH, такой как VHH, происходящий из верблюдовых, или рекомбинантный белок, содержащий переменный домен тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления VHH происходит из видов, выбранных из группы, состоящей из верблюдовых, лам, викуньей, гуанако и хрящевых рыб (таких как, без ограничения, акулы). Согласно другому варианту осуществления VHH происходит из альпаки (такой как, без ограничения, Huacaya Alpaca или Suri alpaca).

[0079] В контексте настоящего изобретения «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к тому факту, что определенные части вариабельных доменов сильно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность неравномерно распределена по вариабельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых определяющими комплементарность областями (CDR) или гипервариабельными областями, как в вариабельных доменах легкой цепи, так и в вариабельных доменах тяжелой цепи. Более высоко консервативные части вариабельных доменов называются каркасом (FR). Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре области FR, в значительной степени принимающих конфигурацию β -листа, соединенные тремя CDR, которые образуют петли, соединяющие структуру β -листа и в некоторых случаях образующие часть структуры β -листа. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от областей FR и, вместе с CDR из другой цепи, способствуют образованию сайта связывания с антигеном антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены не участвуют напрямую в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности. Присвоение аминокислот каждому домену, каркасной области и CDR осуществляется согласно некоторым вариантам осуществления в соответствии с одной из схем нумерации, представленных Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th Ed.), US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication NO 91-3242, Chothia et al., 1987, PMID: 3681981, Chothia et al., 1989, PMID: 2687698, MacCallum et al., 1996, PMID: 8876650, or Dubel, Ed. (2007) *Handbook of Therapeutic Antibodies*, 3rd Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH и Co or AbM (Oxford Molecular/MSI Pharmacopia), если не указано иное. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения ЕpCAM-связывающие белки содержат антитела, содержащие только тяжелую цепь, как например домены VH или VHH, и содержат три CDR. Такие антитела, содержащие только тяжелую цепь, согласно некоторым вариантам осуществления связывают ЕpCAM как мономер без зависимости от димеризации с участком VL (вариабельный участок легкой цепи) для оптимальной аффинности связывания.

[0080] «Нумерация остатков вариабельного домена согласно Кабату» или «нумерация положения аминокислоты согласно Кабату» и их варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных

доменов легкой цепи, составляющих антитела, согласно Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты в соответствии с укорочением или вставкой в FR или CDR переменного домена. Например, переменный домен тяжелой цепи может включать вставку одной аминокислоты (остаток 52a по Кабату) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. согласно Кабату) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Кабату может быть определена для данного антитела путем выравнивания областей гомологии последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной по Кабату последовательностью. Не предполагается, что CDR согласно настоящему изобретению обязательно соответствуют нумерации по Кабату.

[0081] Термин остатки (или области) «каркаса» или «FR» относится к остаткам переменного домена, отличным от остатков CDR или гиперпеременной области, как определено в настоящем документе. «Консенсусный каркас человека» представляет собой каркас, который представляет собой наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в выбранных последовательностях каркаса VL или VH иммуноглобулина человека.

[0082] В контексте настоящего изобретения термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в переменной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками на антигене и обладать разными биологическими эффектами. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно расположенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных случаях эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

[0083] В контексте настоящего изобретения термин «процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной последовательности, после выравнивания последовательности и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для

определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах компетенции специалиста в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как EMBOSS MATCHER, EMBOSS WATER, EMBOSS STRETCHER, EMBOSS NEEDLE, EMBOSS LALIGN, BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

[0084] В контексте настоящего изобретения «период полувыведения» используется в обычном смысле, как описано в Goodman and Gillman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics 21-25 (Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman, and Alfred Gilman, eds., 6th ed. 1980). Кратко, этот термин означает количественную меру периода времени выведения лекарственного средства. Выведение большинства лекарственных средств происходит экспоненциально (т.е. следует кинетике первого порядка), поскольку концентрации лекарственных средств обычно не достигают тех, которые требуются для насыщения процесса выведения. Скорость экспоненциального процесса может быть выражена его константой скорости k , которая выражает относительное изменение за единицу времени, или его полупериодом $t_{1/2}$, временем, необходимым для завершения процесса на 50%. Единицы измерения этих двух констант представляют собой время-1 и время соответственно. Константа скорости первого порядка и полупериод реакции связаны простым образом ($k \times t_{1/2} = 0,693$) и могут соответственно взаимноизменяться. Поскольку кинетика выведения первого порядка определяет, что постоянная доля лекарственного средства теряется в единицу времени, график зависимости логарифмической концентрации лекарственного средства от времени является линейным во все моменты времени после фазы начального распределения (т.е. после завершения всасывания и распределения лекарственного средства). Период полувыведения лекарственного средства можно точно определить по такому графику.

[0085] В контексте настоящего изобретения «аффинность связывания» относится к родству белков, описанных в настоящем документе, с их мишенями связывания и выражается численно с использованием значений « K_d ». Если указано, что два или более белков обладают сравнимой аффинностью связывания с их мишенями связывания, то значения K_d для связывания соответствующих белков с их мишенями связывания находятся в пределах ± 2 -кратного различия друг от друга. Если указано, что два или более белков имеют сравнимую аффинность связывания с единственной мишенью связывания, то

значения K_d для связывания соответствующих белков с указанной единственной мишенью связывания находятся в пределах ± 2 -кратного различия друг от друга. Если указано, что белок связывается с двумя или более мишенями с сопоставимой аффинностью связывания, то значения K_d для связывания указанного белка с двумя или более мишенями находятся в пределах ± 2 -кратного различия друг от друга. Как правило, более высокое значение K_d соответствует более слабому связыванию. Согласно некоторым вариантам осуществления « K_d » измеряют с помощью анализа связывания радиоактивно меченного антигена (RIA) или анализа поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). Согласно определенным вариантам осуществления также определяют «скорость при ассоциации», или «скорость ассоциации», или «скорость для ассоциации», или «константу ассоциации», и «скорость при диссоциации», или «скорость диссоциации», или «скорость для диссоциации», или «константу диссоциации», используя способ поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). Согласно дополнительным вариантам осуществления « K_d », «константу ассоциации» и «константу диссоциации» измеряют с использованием OCTET® Systems (Pall Life Sciences). В иллюстративном способе измерения аффинности связывания с использованием OCTET® Systems лиганд, например, биотинилированный ЕрСАМ человека или яванских макак, иммобилизуют на поверхности стрептавидинового наконечника капиллярного сенсора OCTET®, стрептавидиновые наконечники которого затем активируют в соответствии с инструкциями производителя с использованием около 20-50 мкг/мл белка ЕрСАМ человека или яванских макак. Раствор PBS/казеин также вводят в качестве блокирующего агента. Для кинетических измерений ассоциации варианты ЕрСАМ-связывающего белка вводят при концентрации в интервале от около 10 нг/мл до около 100 мкг/мл, от около 50 нг/мл до около 5 мкг/мл или от около 2 нг/мл до около 20 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие однодоменные белки используют при концентрации в интервале от около 2 нг/мл до около 20 мкг/мл. Полная диссоциация наблюдается в случае отрицательного контроля, аналитического буфера без связывающих белков. Затем определяют кинетические параметры реакций связывания, используя соответствующий инструмент, например, программное обеспечение ForteBio.

[0086] В контексте настоящего изобретения, согласно некоторым вариантам осуществления, термин «лечение», или «лечить», или «обработка» относится к терапевтическому лечению, при котором целью является замедление (уменьшение) нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания, или получение

благоприятных или желаемых клинических результатов. Для целей, описанных в настоящем документе, благоприятные или желаемые клинические результаты включают без ограничения облегчение симптомов, уменьшение степени состояния, нарушения или заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния, нарушения или заболевания, отсрочку начала или замедление прогрессирования состояния, нарушения или заболевания, улучшение состояния, нарушения или заболевания и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемую или необнаруживаемую, или облегчение или улучшение состояния, нарушения или заболевания. Лечение включает получение клинически значимого ответа без чрезмерных побочных эффектов. Лечение также включает продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью без лечения. Согласно другим вариантам осуществления термин «лечение», или «лечить», или «обработка» относится к профилактическим мерам, цель которых состоит в том, чтобы отсрочить наступление или уменьшить тяжесть нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания, как например, в случае индивидуума, который предрасположен к заболеванию (например, индивидуум, являющийся носителем генетического маркера заболевания, такого как рак молочной железы).

[0087] В контексте настоящего изобретения «TriTAC», «ErCAM-нацеленный TriTAC» или «ErCAM-нацеленный триспецифический белок» относится к триспецифическому связывающему белку, который не является активируемым при определенных условиях, и содержит связывающий фрагмент, который является специфическим для основного сывороточного белка, домен, связывающий первый антиген-мишень, и домен, связывающий второй антиген-мишень, где по меньшей мере один из домена, связывающего первый антиген-мишень, и домена, связывающего второй антиген-мишень, содержит ErCAM-связывающий белок, как описано в настоящем документе, и по меньшей мере один из домена, связывающего первый антиген-мишень, и домена, связывающего второй антиген-мишень, содержит домен, который связывается с CD3, таким как человеческий CD3.

[0088] В контексте настоящего изобретения «ProTriTAC» или «ErCAM-нацеленный протриспецифический белок» относится к триспецифическому связывающему белку, который активируется при определенных условиях и содержит (i) расщепляемый линкер (например, содержит последовательность согласно SEQ ID NO 425-471 и SEQ ID NO 503-506)), (ii) связывающий фрагмент, который является специфическим для основного сывороточного белка, а также содержит маскирующий фрагмент (например, содержит последовательность согласно SEQ ID NO 380-424), который препятствует связыванию домена, связывающего первый антиген-мишень, или домена, связывающего второй

антиген-мишень, с их мишенью, где по меньшей мере один из домена, связывающего первый антиген-мишень, и домена, связывающего второй антиген-мишень, содержит EpCAM-связывающий белок, как описано в настоящем документе. Белки ProTriTAC согласно настоящему изобретению в некоторых случаях активируются из замаскированного состояния в активированное состояние посредством расщепления расщепляемого линкера, например, в среде, обогащенной протеазой, такой как микросреда опухоли, с образованием активного лекарственного средства. Активное лекарственное средство, как раскрыто в настоящем документе, в некоторых случаях содержит EpCAM-связывающий домен согласно настоящему изобретению и CD3-связывающий домен согласно настоящему изобретению. Пример активного лекарственного средства приведен в SEQ ID NO 153-179, 180-206, 210-212, 494, 571 и 574, или последовательности, которая на по меньшей мере около 75% - 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 153-179, 180-206, 210-212, 494, 571 и 574, как например, на около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 153-179, 180-206, 210-212, 494, 571 и 574.

[0089] В контексте настоящего изобретения «нерасщепляемое пролекарство» относится к ProTriTAC, как раскрыто выше, где расщепляемый линкер замещен нерасщепляемым линкером (например, линкер согласно SEQ ID NO 507). Пример активного лекарственного средства приведен в SEQ ID NO 495 и 502, или последовательности, которая на по меньшей мере около 75% - 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 495 и 502, как например, на около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 495 и 502.

[0090] В структуре, не относящейся к бета-сэндвичу, (*например*, дарпин, аффимер, аффитело) «петли, не относящиеся к CDR» относятся к области, которая (1) доступна для рандомизации последовательности с обеспечением конструирования специфичностей для второго антигена, и (2) удалена от области (областей), определяющей (определяющих) первичную специфичность, обычно используемой (используемых) в каркасе, обеспечивая одновременное взаимодействие каркаса с обоими антигенами без стерического влияния. Для этой цели область (области), определяющая (определяющие) первичную специфичность, может (могут) быть определена (определены) с применением каркаса,

установленного в публикации Skrlac 2015 (*Trends in Biotechnol*, 33:408-418). Выборка каркаса перечислена ниже:

Структура	Область (области), определяющая (определяющие) первичную специфичность
Аффитело	13 остатков в двух спиралях
Аффимер	12-36 остатков
Антикалин	Четыре петли (до 24 аминокислот)
Авимер	11 остатков
Центирин	13 остатков
дарпин	7 остатков в каждом n-повторе или 8 остатков в каждом n-повторе
финомер	6 остатков в RT- и n-Src-петле
домен Куница	1-2 петли

[0091] В контексте настоящего изобретения «химерный антигенный рецептор» или «CAR» или «CARs» относится к сконструированным рецепторам, которые придают клеткам специфичность в отношении антигена (например, Т-клеткам). CAR содержит множество доменов, например, по меньшей мере один домен, связывающий антиген-мишень, трансмембранный домен, один или более костимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен. Каждый домен может быть соединен линкером. В контексте настоящего изобретения «ProCAR» относится к активируемому при определенных условиях CAR, содержащему E_рCAM-связывающий домен согласно настоящему изобретению.

E_рCAM-связывающие белки

[0092] В настоящем документе описаны белки, которые связываются с E_рCAM, их фармацевтические композиции, а также нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения таких белков. Настоящее изобретение также относится к способам применения раскрытых E_рCAM-связывающих белков для профилактики и/или лечения заболеваний, состояний и нарушений. Согласно некоторым вариантам осуществления E_рCAM-связывающие белки являются частью

мультиспецифических (например, триспецифических) белков, которые содержат ЕpСAM-связывающий домен, как описано в настоящем документе.

[0093] Молекула адгезии эпителиальных клеток (ЕpСAM) представляет собой мембранный гликопротеин, который экспрессируется в большинстве нормального эпителия человека и чрезмерно экспрессируется при большинстве карцином. Эта молекула отвечает за адгезию клетки с клеткой и дополнительно участвует в передаче сигнала, миграции клеток, пролиферации и дифференцировке. Поэтому ЕpСAM является мишенью иммунотерапии в клинических исследованиях нескольких солидных опухолей. Она, как было обнаружено, играет важную роль в обнаружении и выделении циркулирующих опухолевых клеток (СТС). ЕpСAM, как было показано в различных исследованиях, полезна для диагностики и терапии различных карцином. Кроме того, во многих случаях наблюдали, что опухолевые клетки экспрессируют ЕpСAM в намного большей степени, чем их родительский эпителий или менее агрессивные формы указанного рака. Например, было показано, что экспрессия ЕpСAM значительно выше в опухолевой ткани и в аденокарциноме, чем в нормальном эпителии предстательной железы ($n=76$, $p<0,0001$), что позволяет предположить, что повышенная экспрессия ЕpСAM является ранним событием развития рака предстательной железы. См. Poczatek, J Urol., 1999, 162, 1462-1644. Кроме того, в большинстве случаев как плоскоклеточных карцином, так и аденокарцином шейки матки было показано, что сильная экспрессия ЕpСAM коррелирует с повышенной пролиферацией и с исчезновением маркеров конечной дифференцировки. См. Litvinov, Am. J. Pathol. 1996, 148, 865-75. Одним примером является рак молочной железы, где чрезмерная экспрессия ЕpСAM в опухолевых клетках является прогностическим фактором выживания. См. Gastl, Lancet. 2000, 356, 1981-1982. Кроме того, ЕpСAM была описана в качестве маркера обнаружения распространяющихся опухолевых клеток у пациентов, страдающих плоскоклеточной карциномой головы, шеи и легкого. См. Chaubal, Anticancer Res 1999, 19, 2237-2242, Piyathilake, Hum Pathol. 2000, 31, 482-487. Нормальный плоский эпителий, как обнаружено в эпидермисе, полости рта, эпиглоттисе, глотке, дыхательном горле и пищеводе, не значительно экспрессирует ЕpСAM. См. Quak, Hybridoma, 1990, 9, 377-387.

[0094] Предполагается, что ЕpСAM служит для прикрепления эпителиальных клеток упорядоченным или строго упорядоченным образом. См. Litvinov, J Cell Biol. 1997, 139, 1337-1348. Полагают, что при злокачественной трансформации эпителиальных клеток быстро растущие опухолевые клетки нарушают высокий клеточный порядок эпителия. Следовательно, предполагается, что поверхностное распределение ЕpСAM станет менее ограниченным, и молекула будет лучше экспонироваться на опухолевых клетках.

Ожидается, что из-за своего происхождения из эпителиальных клеток опухолевые клетки большинства карцином будут экспрессировать ЕpCAM на своей поверхности.

[0095] ЕpCAM представляет собой интегрированный в мембрану гликопротеин массой 40 кДа из 314 аминокислот со специфической экспрессией в определенных эпителиях и во многих карциномах человека. См., например, в Balzar, J. Mol. Med. 1999, 77, 699-712). ЕpCAM был обнаружен и впоследствии клонирован посредством распознавания мышинным моноклональным антителом 17-1А/эдреколомаб. См. Goettlinger, Int J Cancer. 1986, 38, 47-53 and Simon, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990, 87, 2755-2759. Моноклональное антитело 17-1А было получено путем иммунизации мышей клетками карциномы толстой кишки человека. См. Korowski, Somatic Cell Genet. 1979, 5, 957-971. Было показано, что EGF-подобные повторы ЕpCAM опосредуют латеральные и взаимные взаимодействия при адгезии гомофильных клеток. См., например, Balzar, Mol. Cell. Biol. 2001, 21, 2570-2580) и, по этой причине, преимущественно расположены между эпителиальными клетками (Litvinov, J Cell Biol. 1997, 139, 1337-1348, Balzar, J Mol Med. 1999, 77, 699-712 and Trebak, J Biol Chem. 2001, 276, 2299-2309).

[0096] ЕpCAM также известна под следующими альтернативными наименованиями: адгезивная молекула эпителиальных клеток, опухолеассоциированный трансдуктор кальциевого сигнала, основной белок, ассоциированный с опухолью желудочно-кишечного тракта GA733-2, аденокарцинома-ассоциированный антиген, гликопротеин клеточной поверхности Trop-1, эпителиальный гликопротеин 314, TACSTD1, EGP314, MIC18, TROP1, M4S1, KSA, поверхностный маркер хромосомы 4 мембранного компонента (гликопротеин с размером 35 кДа), антиген, идентифицированный посредством моноклонального антитела AUA-1, гликопротеин человеческого эпителия-2, поверхностный антиген эпителиальных клеток, эпителиальный гликопротеин, KS1/4 антиген, CD326 антиген, GA722-2, HEGP314, HNPCC8, Еp-CAM, DIAR5, EGP-2, EGP40, KS 1/4, MK-1, M1S2, ESA и EGP. Иллюстративные последовательности белка для ЕpCAM приведены в UniProtKB ID NO. P16422 и B5MCA4. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающие белки согласно настоящему изобретению связываются с последовательностью ЕpCAM, приведенной в UniProtKB ID NO. P16422 (SEQ ID NO478) или B5MCA4 (SEQ ID NO475).

[0097] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-связывающий домен связывается с внеклеточным доменом зрелого белка ЕpCAM. Последовательность внеклеточного домена человека приведена в SEQ ID NO 479, последовательность внеклеточного домена яванских макаков приведена в SEQ ID NO 480 и последовательность внеклеточного домена мышей приведена в SEQ ID NO 481.

[0098] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 475. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим последовательность SEQ ID NO 475. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 476. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим последовательность SEQ ID NO 476. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 477. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 477. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 478. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 478. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 479. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 479. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 480. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 480. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 481. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен связывается с белком, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO 481.

[0099] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие домены, раскрытые в настоящем документе, распознают ЕрСАМ полной длины. В определенных случаях ЕрСАМ-связывающие домены, раскрытые в настоящем изобретении, распознают эпитоп внутри ЕрСАМ, как например, в некоторых случаях ЕрСАМ-связывающие белки взаимодействуют с одной или более аминокислотами, обнаруживаемыми в домене ЕрСАМ человека. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (*например*, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в домене ЕрСАМ. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несвязанных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в домене ЕрСАМ.

[00100] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению связываются с белком ЕрСАМ полной длины или его фрагментом, как например, содержащими эпитоп фрагментами внутри белка ЕрСАМ полной длины, как описано выше. В некоторых случаях содержащий эпитоп фрагмент содержит антигенные или иммуногенные фрагменты и их производные белка ЕрСАМ. Содержащие эпитоп фрагменты, включая антигенные или иммуногенные фрагменты, согласно некоторым вариантам осуществления составляют 12 аминокислот или более, например, 20 аминокислот или более, 50 или 100 аминокислот или более. Фрагменты ЕрСАМ согласно некоторым вариантам осуществления составляют 95% или более от длины полного белка, 90% или более, 75%, или 50%, или 25%, или 10% или более от длины полного белка. Согласно некоторым вариантам осуществления содержащие эпитоп фрагменты ЕрСАМ, включая антигенные или иммуногенные фрагменты, способны вызывать релевантный иммунный ответ у пациента. Производные ЕрСАМ включают, согласно некоторым вариантам осуществления, варианты последовательности, где одна или более (например, 1-20, как например 15 аминокислот, или до 20%, как например, до 10%, или 5%, или 1% от числа аминокислот на основе общей длины белка) делеций, вставок или замен были сделаны в последовательности ЕрСАМ согласно SEQ ID NO 475-481.

[00101] Согласно некоторым вариантам осуществления замены содержат консервативные замены. Производные и варианты в некоторых примерах выполняют по существу такую же биологическую функцию, что и белок, из которого они происходят. Например, производные и варианты ЕрСАМ являются в некоторых случаях сопоставимым образом антигенными или иммуногенными по сравнению с белком, из которого они происходят, имеют либо лиганд-связывающую активность, либо имеют способность образовывать активный комплекс с рецептором, либо предпочтительно и то и другое, которые имеет белок, из которого они происходят, и имеют такое же распределение в ткани, что и ЕрСАМ.

[00102] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок специфически связывается с ЕрСАМ с эквивалентной или более хорошей аффинностью, чем аффинность эталонного ЕрСАМ-связывающего белка, и ЕрСАМ-связывающий белок согласно таким вариантам осуществления содержит ЕрСАМ-связывающую молекулу с созревшей аффинностью и происходит из ЕрСАМ-связывающей

родительской молекулы, причем он содержит одну или более аминокислотных мутаций (например, стабилизирующая мутация, дестабилизирующая мутация) относительно ЕрСАМ-связывающей родительской молекулы. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающая молекула с созревшей аффинностью обладает превосходной стабильностью в отношении выбранных дестабилизирующих агентов, такой как у эталонной ЕрСАМ-связывающей родительской молекулы. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающая молекула с созревшей аффинностью идентифицирована в процессе, предусматривающем пэннинг одной или более предварительных кандидатных ЕрСАМ-связывающих молекул, происходящих из одной или более ЕрСАМ-связывающих родительских молекул, экспрессированных в библиотеке фагового дисплея, относительно белка ЕрСАМ, такого как человеческий белок ЕрСАМ. Предварительная кандидатная ЕрСАМ-связывающая молекула содержит, согласно некоторым вариантам осуществления, аминокислотные замены в переменных областях, CDR или каркасных остатках, по сравнению с родительской молекулой.

[00103] В контексте настоящего изобретения «фаговый дисплей» относится к методике, с помощью которой вариантные полипептиды отображаются как слитые белки с по меньшей мере частью белка оболочки на поверхности частиц фага, например, нитчатого фага. Полезность фагового дисплея заключается в том, что большие библиотеки рандомизированных вариантов белков могут быть быстро и эффективно отобраны для тех последовательностей, которые связываются с молекулой-мишенью с высокой аффинностью. Отображение библиотек пептидов и белков на фаге было использовано для скрининга миллионов полипептидов на предмет наличия у них свойств специфического связывания. Способы поливалентного фагового дисплея использовали для отображения небольших случайных пептидов и небольших белков посредством слияния либо с геном ИП, либо с геном VIII нитчатого фага. См., например, Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol, 3:355-362 (1992), и процитированные в нем ссылки. В случае моновалентного фагового дисплея библиотека белков или пептидов сливается с геном ИП или его частью и экспрессируется на низких уровнях в присутствии белка гена ИП дикого типа, так что фаговые частицы отображают одну копию или не отображают ни одной копии слитых белков. Эффекты авидности снижаются по сравнению с поливалентным фагом, так что отбор осуществляется на основе внутренней аффинности лиганда, и используются фагмидные векторы, которые упрощают манипуляции с ДНК. См., например, Lowman and Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 3:205-0216 (1991).

[00104] Согласно некоторым вариантам осуществления пэннинг включает использование различных моментов и концентраций связывания для идентификации

ЕрСАМ-связывающих молекул с повышенными или пониженными скоростями ассоциации среди прекандидатных ЕрСАМ-связывающих молекул. Согласно некоторым вариантам осуществления пэннинг включает использование различных моментов времени отмывки для идентификации ЕрСАМ-связывающих молекул с повышенными или пониженными скоростями диссоциации среди прекандидатных ЕрСАМ-связывающих молекул. Согласно некоторым вариантам осуществления пэннинг включает как различные моменты времени связывания, так и различные моменты времени промывки. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинируют одну или более стабилизирующих мутаций для повышения стабильности ЕрСАМ-связывающей молекулы с созревшей аффинностью, например, путем шаффлинга для создания комбинаторной библиотеки второй стадии из таких мутантов и проведения второго раунда пэннинга с последующим отбором по связыванию.

[00105] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающая молекула с созревшей аффинностью обладает эквивалентной или лучшей аффинностью в отношении белка ЕрСАМ (как например, человеческого белка ЕрСАМ), чем аффинность родительской ЕрСАМ-связывающей молекулы, но имеет пониженную перекрестную реактивность или согласно некоторым вариантам осуществления увеличенную перекрестную реактивность, с выбранными веществами, такими как лиганды, белки, антигены и тому подобное, помимо эпитопа ЕрСАМ, для которого родительская ЕрСАМ-связывающая молекула является специфической или предназначена быть специфической. Что касается последнего, ЕрСАМ-связывающая молекула с созревшей аффинностью, согласно некоторым вариантам осуществления, более успешно проходит тестирование на животных моделях, если ЕрСАМ-связывающая молекула с созревшей аффинностью реагирует как с ЕрСАМ человека, так и с соответствующей мишенью животной модели, например, мышиным ЕрСАМ или ЕрСАМ яванских макаков. Согласно некоторым вариантам осуществления родительская ЕрСАМ-связывающая молекула связывается с ЕрСАМ человека с аффинностью около 500 нМ или менее, 400 нМ или менее, 300 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 50 нМ или менее, 10 нМ или менее, и с ЕрСАМ яванских макаков с аффинностью около 500 нМ или менее, 400 нМ или менее, 300 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 50 нМ или менее, 15 нМ или менее или 10 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающая молекула с созревшей аффинностью, идентифицированная после одного раунда пэннинга, связывается с ЕрСАМ человека с аффинностью около 5 нМ или менее, как например, 1 нМ или менее, и с ЕрСАМ яванских макаков с аффинностью около 7,5 нМ или менее, как например, 1 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающая молекула с созревшей аффинностью, идентифицированная после двух раундов пэннинга,

связывается с ЕpСAМ человека с аффинностью около 2,5 нМ или менее, и с ЕpСAМ яванских макак с аффинностью около 3,5 нМ или менее.

[00106] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAМ-связывающий белок содержит антиген-специфический связывающий домен, полипептид, который специфически связывается с мишенями, такими как мишени на больных клетках или мишени на других клетках, которые поддерживают болезненное состояние, как например, мишени на стромальных клетках, которые поддерживают рост опухоли, или мишени на иммунных клетках, которые поддерживают иммуносупрессию, опосредованную заболеванием. В некоторых примерах антиген-специфический связывающий домен включает домены, связывающие антитела, одноцепочечные антитела, Fab, Fv, Т-клеточный рецептор, лиганд-связывающие домены, рецептор-связывающие домены, доменные антитела, однодоменные антитела, минитела, нанотела, пептитела или различные другие имитаторы антител (такие как аффимеры, аффитины, альфатела, атримеры, молекулы на основе CTLA4, аднектины, антикалины, белки на основе домена Куница, авимеры, ноттины, финомеры, дарпины, аффитены, аффилины, монотела и белки на основе белков повтора armadillo).

[00107] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAМ-связывающий домен представляет собой анти-ЕpСAМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или вариант антитела ЕpСAМ-связывающего домена или его антигенсвязывающего фрагмента. В контексте настоящего изобретения «вариант антитела» относится к вариантам и производным антитела или антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления предполагаются варианты аминокислотной последовательности анти-ЕpСAМ антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в настоящем документе. Например, согласно определенным вариантам осуществления предполагается, что варианты аминокислотной последовательности анти-ЕpСAМ антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в настоящем документе, улучшают аффинность связывания и/или другие их биологические свойства. Иллюстративный способ получения вариантов аминокислотных последовательностей предусматривает без ограничения введение соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или синтез пептида. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела или его антигенсвязывающих фрагментов.

[00108] Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть сделана для получения конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например, связыванием антигена. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к вариантам, содержащим одну или более аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для мутагенеза замещения, включают области CDR и каркаса. Примеры таких замен описаны ниже. Аминокислотные замены могут быть введены в представляющее интерес антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, а продукты проверены на желаемую активность, например, сохраненное/улучшенное связывание антигена, пониженная иммуногенность, измененная антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) или улучшенная опосредованная Т-клетками цитотоксичность (TDCC). Для получения вариантов антител предусмотрены как консервативные, так и неконсервативные аминокислотные замены.

[00109] В другом примере замены для создания варианта анти-ЕрСАМ-антитела или его антигенсвязывающих фрагментов заменяют один или более остатков гипервариабельной области родительского антитела. В общем, варианты затем отбирают на основе улучшений желаемых свойств по сравнению с исходным антителом или его антигенсвязывающими фрагментами, например, повышенной аффинности, пониженной аффинности, пониженной иммуногенности, повышенной зависимости связывания от pH.

[00110] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb), как например, вариабельный домен тяжелой цепи (VH), вариабельный домен (VHH) происходящего из ламы sdAb, пептид, лиганд или низкомолекулярную единицу, специфическую для ЕрСАМ. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен, описанный в настоящем документе, представляет собой любой домен, который связывается с ЕрСАМ, включая без ограничения домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. Согласно определенным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен представляет собой однодоменное антитело. Согласно другим вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен представляет собой пептид. Согласно другим вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен представляет собой небольшую молекулу.

[00111] В общем, необходимо отметить, что в контексте настоящего изобретения термин «однодоменное антитело» используется в самом широком смысле, не ограничивается конкретным биологическим источником или конкретным способом получения. Однодоменные антитела представляют собой антитела, чьи определяющие комплементарность области являются частью одного доменного полипептида. Примеры

включают без ограничения антитела, содержащие тяжелую цепь, антитела, естественно лишенные легких цепей, однодоменные антитела, полученные из обычных 4-х цепочечных антител, сконструированные антитела и структуры с одним доменом, отличные от тех, которые происходят из антител. Однодоменные антитела могут быть любыми из известных в данной области техники или любыми из последующих однодоменных антител. Однодоменные антитела могут происходить из любого вида, включая без ограничения мышь, человека, верблюда, ламу, козу, кролика, крупный рогатый скот. Например, согласно некоторым вариантам осуществления однодоменные антитела согласно настоящему изобретению получают: (1) посредством выделения домена VHH антитела природного происхождения, содержащего тяжелую цепь, (2) посредством экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей домен VHH природного происхождения, (3) посредством «гуманизации» домена VHH природного происхождения или посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой гуманизированный VHH домен, (4) посредством «верблюдизации» домена VHH природного происхождения из любого животного вида, и в частности из видов млекопитающих, как например из человека, или посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой верблюдизированный домен VH, (5) посредством «верблюдизации» «доменного антитела» или «Dab», или посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой верблюдизированный домен VH, (6) посредством использования синтетических или полусинтетических способов получения белков, полипептидов или других аминокислотных последовательностей, (7) посредством получения нуклеиновой кислоты, кодирующей однодоменное антитело с использованием методик синтеза нуклеиновых кислот, известных в данной области техники, с последующей экспрессией полученной таким образом нуклеиновой кислоты, и/или (8) посредством любой комбинации одного или более из вышеуказанных.

[00112] Согласно одному варианту осуществления однодоменное антитело соответствует домену VHH антител природного происхождения, содержащих тяжелую цепь, направленных против ЕpСAM. Как дополнительно описано в настоящем документе, такие последовательности VHH в общем могут быть сгенерированы или получены путем подходящей иммунизации видов лам с применением ЕpСAM (т.е. так, чтобы вызвать иммунный ответ и/или антитела, содержащие тяжелую цепь, направленные против ЕpСAM), путем получения подходящего биологического образца у указанной лампы (такого как образец крови, образец сыворотки или образец В-клеток), и путем создания последовательностей VHH, направленных против ЕpСAM, с применением указанного образца, с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники.

[00113] Согласно другому варианту осуществления такие домены VHH природного происхождения против ЕрСАМ получают из нативных библиотек последовательностей VHH верблюдовых, например, путем скрининга такой библиотеки с использованием ЕрСАМ или по меньшей мере одной его части, фрагмента, антигенной детерминанты или эпитопа, с использованием одного или более способов скрининга, известных в данной области техники. Такие библиотеки и способы описаны, например, в WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 и WO 03/035694. В качестве альтернативы используют улучшенные синтетические или полусинтетические библиотеки, полученные из нативных библиотек VHH, такие как библиотеки VHH, полученные из нативных библиотек VHH такими способами, как случайный мутагенез и/или шаффлинг CDR, например, описанные в WO 00/43507.

[00114] Согласно другому варианту осуществления еще один способ получения последовательностей VHH, направленных против ЕрСАМ, предусматривает подходящую иммунизацию трансгенного млекопитающего, которое способно экспрессировать антитела, содержащие тяжелую цепь (т.е. так, чтобы вызвать иммунный ответ и/или антитела, содержащие тяжелую цепь, направленные против ЕрСАМ), с получением подходящего биологического образца у указанного трансгенного млекопитающего (такого как образец крови, образец сыворотки или образец В-клеток), а затем генерирование последовательностей VHH, направленных против ЕрСАМ, с применением указанного образца, с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники. Например, для этой цели могут быть использованы крысы или мыши, экспрессирующие антитела, содержащие тяжелую цепь, а также дополнительные способы и методики, описанные в WO 02/085945 и в WO 04/049794.

[00115] Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ЕрСАМ однодоменное антитело согласно настоящему изобретению содержит однодоменное антитело с аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности нечеловеческого антитела и/или домена VHH природного происхождения, например, анти-ЕрСАМ антитело ламы, но которое было «гуманизировано», а именно путем замещения одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности указанного нечеловеческого анти-ЕрСАМ и/или последовательности VHH природного происхождения (и в частности в каркасных последовательностях) одним или более аминокислотными остатками, которые присутствуют в соответствующем положении (положениях) в домене VH обычного 4-х цепочечного антитела человеческого происхождения (например, как указано выше). Это можно выполнять способом, известным в данной области техники, что очевидно

специалисту, например, на основе дальнейшего описания, приведенного в настоящем документе. Следует снова отметить, что такие гуманизированные анти-ЕрСАМ однодоменные антитела согласно настоящему изобретению получают любым подходящим способом, известным как таковой (т.е., как указано в пунктах (1) - (8) выше), и, таким образом, нет строгого ограничения в отношении полипептидов, которые получают с использованием полипептида, который содержит домен VHH природного происхождения, в качестве исходного материала. Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления однодоменное анти-ЕрСАМ антитело, как описано в настоящем документе, содержит однодоменное антитело с аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности домена VH природного происхождения, но которая была «верблюдизирована», а именно путем замены одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности домена VH природного происхождения из обычного 4-х цепочечного антитела одним или более аминокислотными остатками, которые находятся в соответствующем положении (положениях) в домене VHH антитела, содержащего тяжелую цепь. Такие замены «верблюдизации» предпочтительно вставляют в положения аминокислот, которые образуют и/или присутствуют на границе раздела VH-VL, и/или при, так называемых, отличительных остатках верблюдовых. См., например, WO 94/04678 и Davies and Riechmann (1994 и 1996)). Предпочтительно, последовательность VH, которая используется в качестве исходного материала или стартовой точки для создания или конструирования верблюдизированного одиночного домена, предпочтительно представляет собой последовательность VH млекопитающего, более предпочтительно последовательность VH человека, такую как последовательность VH3. Однако следует отметить, что такие верблюдизированные анти-ЕрСАМ однодоменные антитела согласно настоящему изобретению, согласно определенному варианту осуществления, получают любым подходящим способом, известным в данной области техники (т.е. как указано в пунктах (1) - (8) выше), и таким образом, нет строгого ограничения в отношении полипептидов, которые получают с использованием полипептида, который содержит нечеловеческое анти-ЕрСАМ антитело и/или домен VH природного происхождения в качестве исходного материала. Например, как далее описано в настоящем документе, как «гуманизация», так и «верблюдизация» проводятся путем предоставления нуклеотидной последовательности, которая кодирует домен VHH или домен VH природного происхождения, соответственно, и затем изменения одного или более кодонов в указанной нуклеотидной последовательности таким образом, что новая нуклеотидная последовательность кодирует «гуманизированное» или «верблюдизированное» однодоменное антитело, соответственно.

Затем эта нуклеиновая кислота может быть экспрессирована с получением желаемого однодоменного анти-ЕрСАМ антитела согласно настоящему описанию. В качестве альтернативы, согласно другим вариантам осуществления, на основе аминокислотной последовательности домена VHH или домена VH природного происхождения, соответственно, конструируют и затем синтезируют *de novo* с использованием известных методик пептидного синтеза аминокислотную последовательность желаемого гуманизированного или верблюдизированного однодоменного анти-ЕрСАМ антитела согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления, на основе аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности домена VHH или домена VH природного происхождения, соответственно, нуклеотидную последовательность, кодирующую желаемое гуманизированное или верблюдизированное анти-ЕрСАМ однодоменное антитело согласно настоящему изобретению, соответственно, конструируют и затем синтезируют *de novo*, используя известные способы синтеза нуклеиновых кислот, после чего полученная таким образом нуклеиновая кислота экспрессируется с использованием известных способов экспрессии, с получением таким образом желаемого анти-ЕрСАМ однодоменного антитела согласно настоящему изобретению.

[00116] Другие подходящие способы и методики получения анти-ЕрСАМ однодоменного антитела согласно настоящему изобретению и/или нуклеиновых кислот, кодирующих его, начиная с последовательностей VH или последовательностей VHH природного происхождения, например, предусматривают объединение одной или более частей одной или более последовательностей VH природного происхождения (таких как одна или более каркасных последовательностей (FR) и/или последовательности определяющей комплементарность области (CDR)), одной или более частей одной или более последовательностей VHH природного происхождения (таких как одна или более последовательностей FR или последовательностей CDR), и/или одной или более синтетических или полусинтетических последовательностей подходящим способом, так чтобы поучить анти-ЕрСАМ однодоменное антитело согласно настоящему изобретению или нуклеотидную последовательность, или нуклеиновую кислоту, кодирующую его.

[00117] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен представляет собой анти-ЕрСАМ специфическое антитело, содержащее переменную определяющую комплементарность область CDR1 тяжелой цепи, переменную CDR2 тяжелой цепи, переменную CDR3 тяжелой цепи, переменную CDR1 легкой цепи, переменную CDR2 легкой цепи и переменную CDR3 легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен

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

[00118] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAМ-связывающий домен представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая состоит из четырех каркасных областей/последовательностей (f1-f4), прерывающихся тремя определяющими комплементарность областями/последовательностями, как представлено в формуле: f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4, где r1, r2 и r3 представляют собой определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и f1, f2, f3 и f4 представляют собой каркасные остатки. Каркасные остатки ЕpСAМ-связывающего белка согласно настоящему изобретению содержат, например, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 или 94 аминокислотных остатков, и определяющие комплементарность области содержат, например, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 аминокислотных остатков. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAМ-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-38, 207-209 и 496-497.

[00119] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие белки, описанные в настоящем документе, содержат полипептид, имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID NO 1-38, их подпоследовательностей и их вариантов. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAМ-связывающий белок имеет гомологичность по меньшей мере 70%-95% или более с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO 1-38, их подпоследовательностей и их вариантов. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAМ-связывающий белок имеет гомологичность по меньшей мере 60%, 61%, 62%, 63%, 63%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-

497, их подпоследовательностей и их вариантов. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок имеет идентичность по меньшей мере 70%-95% или более с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497, их подпоследовательностей и их вариантов. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок имеет идентичность по меньшей мере 60%, 61%, 62%, 63%, 63%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497, их подпоследовательностей и их вариантов.

[00120] Согласно некоторым вариантам осуществления CDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно любому из SEQ ID NO 39-76 или последовательность, содержащую одну или более замен по сравнению с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR2 содержит последовательность согласно любому из SEQ ID NO 77-114 или последовательность, содержащую одну или более замен по сравнению с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR3 содержит последовательность согласно любому из SEQ ID NO 115-152 или последовательность, содержащую одну или более замен по сравнению с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152.

[00121] Согласно различным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению на по меньшей мере около 60%, около 61%, по меньшей мере около 62%, около 63%, около 64%, около 65%, около 66%, около 67%, около 68%, около 69%, около 70%, около 71%, около 72%, около 73%, около 74%, около 75%, около 76%, около 77%, около 78%, около 79%, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентичен аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497.

[00122] Согласно различным вариантам осуществления определяющая комплементарность область ЕрСАМ-связывающего домена согласно настоящему изобретению на по меньшей мере около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентична аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO 39-76.

[00123] Согласно различным вариантам осуществления определяющая комплементарность область ЕрСАМ-связывающего домена согласно настоящему изобретению на по меньшей мере около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентична аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO 77-114.

[0027] Согласно различным вариантам осуществления определяющая комплементарность область ЕрСАМ-связывающего домена согласно настоящему изобретению на по меньшей мере около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентична аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO 115-152.

[00124] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен является перекрестно реагирующим с ЕрСАМ человека, яванских макак и мышей. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий домен является специфическим для ЕрСАМ человека. Согласно определенным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие домены, раскрытые в настоящем документе, связываются с человеческим ЕрСАМ с человеческой Kd (hKd). Согласно определенным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие домены, раскрытые в настоящем документе, связываются с ЕрСАМ яванских макак с суно Kd (сKd). Согласно определенным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие домены, раскрытые в настоящем документе, связываются с ЕрСАМ яванских макак с мышинной Kd (mKd). Согласно определенным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие домены, раскрытые в настоящем документе, связываются с ЕрСАМ яванских макак и с человеческим ЕрСАМ с суно Kd (сKd) и человеческой Kd (hKd), соответственно. Согласно определенным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие домены, раскрытые в настоящем документе, связываются с ЕрСАМ яванских макак, мышинным ЕрСАМ и человеческим ЕрСАМ с суно Kd (сKd), мышинной Kd (mKd) и человеческой Kd (hKd), соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок связывается с человеческим, мышинным и яванских макак ЕрСАМ со сопоставимыми аффинностями связывания (т.е. значения hKd, mKd и сKd не различаются на более чем $\pm 10\%$). Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и сKd находятся в диапазоне от около 0,001 нМ до около 500 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и сKd

находятся в диапазоне от около 0,001 нМ до около 450 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,001 нМ до около 400 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,001 нМ до около 350 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,001 нМ до около 300 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,001 нМ до около 250 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,001 нМ до около 200 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,001 нМ до около 150 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,001 нМ до около 100 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,1 нМ до около 90 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,2 нМ до около 80 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,3 нМ до около 70 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,4 нМ до около 50 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,5 нМ до около 30 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,6 нМ до около 10 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,7 нМ до около 8 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,8 нМ до около 6 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 0,9 нМ до около 4 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления hKd, mKd и cKd находятся в диапазоне от около 1 нМ до около 2 нМ.

[00125] Согласно некоторым вариантам осуществления любой из указанных выше ЕрСАМ-связывающих доменов (например, анти-ЕрСАМ однодоменные антитела согласно SEQ ID NO 1-38) представляют собой аффинный антитела с включенной меткой для облегчения очистки. Согласно некоторым вариантам осуществления метка аффинного пептида представляет собой шесть последовательных гистидиновых остатков, также указываемых как 6X-his (SEQ ID NO 377).

[00126] Согласно определенным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие домены согласно настоящему изобретению более преимущественно связываются со связанным с мембраной ЕрСАМ, чем с растворимым ЕрСАМ. Связанный с мембраной ЕрСАМ относится к присутствию ЕрСАМ в или на поверхности клеточной мембраны клетки, которая экспрессирует ЕрСАМ. Растворимый ЕрСАМ относится к

ЕрСАМ, который более не присутствует в или на поверхности клеточной мембраны клетки, которая экспрессирует или экспрессировала ЕрСАМ. В некоторых случаях ЕрСАМ присутствует в кровотоке и/или лимфатической циркуляции у субъекта. Согласно одному варианту осуществления ЕрСАМ-связывающие домены связываются со связанным с мембраной ЕрСАМ по меньшей мере в 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз сильнее, чем с растворимым ЕрСАМ. Согласно одному варианту осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению преимущественно связываются со связанным с мембраной ЕрСАМ в 30 раз сильнее, чем с растворимым ЕрСАМ. Определение более преимущественного связывания антиген-связывающего белка со связанным с мембраной ЕрСАМ, чем с растворимым ЕрСАМ, может быть легко осуществлено с применением анализов связывания.

[00127] Предполагается, что согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок является достаточно небольшим и составляет не более 25 кДа, не более 20 кДа, не более 15 кДа или не более 10 кДа, согласно некоторым вариантам осуществления. В определенных случаях ЕрСАМ-связывающий белок составляет 5 кДа или менее, если он представляет собой пептид или низкомолекулярную единицу.

[00128] Согласно другим вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки, описанные в настоящем изобретении, содержат связующие на основе низкомолекулярных единиц (SME) для ЕрСАМ. SME связующие представляют собой небольшие молекулы, составляющие в среднем около 500 - 2000 Да по размеру, и присоединяются к ЕрСАМ-связывающим белкам известными способами, такими как сортазное лигирование или конъюгирование. В этих случаях ЕрСАМ-связывающий белок содержит домен, содержащий последовательность распознавания сортазы, например, LPETG (SEQ ID NO 376). Для присоединения SME связующего к ЕрСАМ-связывающему белку, содержащему последовательность распознавания сортазы, белок инкубируют с сортазой и SME связующим, посредством чего сортаза присоединяет SME связующее к последовательности распознавания. Согласно другим вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки, описанные в настоящем изобретении, содержат пептид ноттин для связывания ЕрСАМ. Ноттины представляют собой дисульфид-стабилизированные пептиды со структурой цистеинового узла и имеют средние размеры около 3,5 кДа. Ноттины, как предполагается, связываются с определенными опухолевыми молекулами, такими как ЕрСАМ. Согласно другим вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки, описанные в настоящем документе, содержат природный лиганд ЕрСАМ.

[00129] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок содержит более чем один домен и относится к однополипептидной

модели с гибкой связью доменов. Это позволяет легко получать и производить ЕрСАМ-связывающие белки, поскольку они могут быть кодированы одной молекулой кДНК, легко включаемой в вектор. Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления, когда ЕрСАМ-связывающие белки, описанные в настоящем документе, представляют собой мономерную одну полипептидную цепь, отсутствуют проблемы спаривания цепей или необходимость димеризации. Предполагается, что в таких вариантах осуществления ЕрСАМ-связывающие белки, описанные в настоящем документе, имеют пониженную склонность к агрегации.

[00130] В ЕрСАМ-связывающих белках, содержащих более чем один домен, домены связаны одним или более внутренними линкерами. Согласно определенным вариантам осуществления внутренние линкеры являются «короткими», т.е. состоят из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков. Таким образом, в некоторых случаях, внутренние линкеры состоят из около 12 или менее аминокислотных остатков. В случае 0 аминокислотных остатков, внутренний линкер представляет собой пептидную связь. Согласно определенным вариантам осуществления внутренние линкеры являются «длинными», т.е. состоят из 15, 20 или 25 аминокислотных остатков. Согласно некоторым вариантам осуществления внутренние линкеры состоят из от около 3 до около 15, например, 8, 9 или 10 непрерывных аминокислотных остатков. Что касается аминокислотного состава внутренних линкеров, пептиды выбирают на основе свойств, которые придают гибкость ЕрСАМ-связывающим белкам, не взаимодействуют со связывающими доменами, а также устойчивы к расщеплению протеазами. Например, глициновые и сериновые остатки в общем обеспечивают устойчивость к протеазе. Примеры внутренних линкеров, подходящих для связывания доменов в ЕрСАМ-связывающих белках, включают без ограничения $(GS)_n$ (SEQ ID NO 365), $(GGS)_n$ (SEQ ID NO 366), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO 367), $(GGSG)_n$ (SEQ ID NO 368), $(GGSGG)_n$ (SEQ ID NO 369), $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO 370), $(GGGGG)_n$ (SEQ ID NO 371) или $(GGG)_n$ (SEQ ID NO 372), где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Согласно одному варианту осуществления линкер представляет собой $(GGGSGGGSGGGSGGGGS)$ (SEQ ID NO 373), $(GGGSGGGSGGGGS)$ (SEQ ID NO 374) или $(GGGSGGGGS)$ (SEQ ID NO 375).

[00131] В некоторых случаях, когда ЕрСАМ-связывающий белок содержит более одного домена, домены внутри ЕрСАМ-связывающих белков конъюгированы с использованием ферментативного способа сайт-специфической конъюгации, который предусматривает использование фермента трансглутаминазы млекопитающих или бактерий. Микробные трансглутаминазы (mTG) представляют собой универсальные инструменты в современных исследованиях и биотехнологии. Доступность больших

количеств относительно чистых ферментов, простота использования и отсутствие регуляции кальцием и гуанозин-5'-трифосфатом (GTP) сделали mTG основным сшивающим ферментом, используемым как в пищевой промышленности, так и в биотехнологии. В настоящее время mTG используют во многих применениях для присоединения белков и пептидов к небольшим молекулам, полимерам, поверхностям, ДНК, а также к другим белкам. См., например, Pavel Strp, Veracity of microbial transglutaminase, Bioconjugate Chem. 25, 5, 855-862.

[00132] В некоторых примерах представлены ЕpСAМ-связывающие белки, содержащие более одного домена, где один из доменов содержит акцепторный глутамин в константной области, который затем может быть конъюгирован с другим доменом через линкер на основе лизина (например, любая первичная аминокислотная цепь, которая является субстратом для TGase, например, содержащая алкиламин, оксоамин), где конъюгация происходит исключительно на одном или более акцепторных остатках глутамина, присутствующих в нацеливающем фрагменте за пределами сайта связывания антигена (например, вне варибельной области, в константной области). Таким образом, конъюгация не происходит при глутамине, например, глутамине, по меньшей мере частично экспонированном на поверхности, внутри варибельной области. ЕpСAМ-связывающий белок, в некоторых примерах, образуется в результате реакции одного из доменов с линкером на основе лизина в присутствии TGase.

[00133] Согласно некоторым вариантам осуществления, когда один или более доменов внутри ЕpСAМ-связывающих белков непосредственно соединены, получают гибридный вектор, в котором ДНК, кодирующие непосредственно соединенные домены, сами непосредственно лигированы друг с другом. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда применяются линкеры, получают гибридный вектор, в котором ДНК, кодирующая один домен, лигирована с ДНК, кодирующей один конец линкерного фрагмента, и ДНК, кодирующая другой домен, лигирована с другим концом линкерного фрагмента.

[00134] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAМ-связывающий белок представляет собой одноцепочечные варибельные фрагменты (scFv), однодоменные антитела, такие как варибельный домен тяжелой цепи (VH), варибельный домен легкой цепи (VL) и варибельный домен (VHH) однодоменного антитела, происходящего из верблюжьих. Согласно другим вариантам осуществления ЕpСAМ-связывающий белок представляет собой связывающий домен, не относящийся к Ig, т.е. имитатор антитела, такой как антикарины, аффилины, молекулы аффитела, аффимеры, аффитины, альфатела, авимеры, дарпины, финомеры, пептиды домена Куница и монотела.

Согласно другим вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок представляет собой лиганд или пептид, который связывается с или ассоциируется с ЕрСАМ. Согласно еще одним вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок представляет собой нуклеин. Согласно еще одним вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок представляет собой низкомолекулярное вещество.

[00135] Согласно определенным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению могут быть включены в ЕрСАМ-нацеленные триспецифические белки. Согласно некоторым вариантам осуществления триспецифические белки содержат CD3-связывающий домен, домен с увеличенным периодом полувыведения и ЕрСАМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий триспецифический белок содержит триспецифическое антитело.

Мультиспецифические ЕрСАМ-нацеленные белки, такие как ЕрСАМ-нацеленные триспецифические белки (также упоминаемые в настоящем документе как ЕрСАМ-нацеленные TriTAC белки или молекулы)

[00136] Согласно одному аспекту в настоящем документе описан мультиспецифический или мультивалентный белок, содержащий ЕрСАМ-связывающий белок согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, который специфически связывается с CD3. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, который специфически связывается с человеческим CD3. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, который специфически связывается с CD3-гамма. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, который специфически связывается с CD3-дельта. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, который специфически связывается с CD3-эпсилон.

[00137] Согласно дополнительным вариантам осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, который специфически связывается с Т-клеточным рецептором (TCR). Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, который специфически связывается с альфа-цепью TCR. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, который специфически связывается с β -цепью TCR.

[00138] Согласно определенным вариантам осуществления CD3-связывающий домен мультиспецифического белка проявляет не только мощные аффинности связывания для CD3 с человеческим CD3, но также показывает отличную перекрестную реактивность с соответствующими белками CD3 яванских макаков. В некоторых случаях CD3-связывающий домен мультиспецифических белков перекрестно реагирует с CD3 яванских макаков. В определенных случаях соотношения KD человека:яванских макаков (hKd: cKd) для связывания CD3 составляют от 20:1 до 1:2.

[00139] Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен мультиспецифического белка представляет собой любой домен, который связывается с CD3, включая без ограничения домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела или антигенсвязывающих фрагментов CD3-связывающих антител, таких как однодоменные антитела (sdAb), фрагменты Fab, Fab', F(ab)₂ и Fv, фрагменты, состоящие из одной или более CDR, одноцепочечные антитела (например, одноцепочечные фрагменты Fv (scFv)), дисульфид-стабилизированные фрагменты Fv (dsFv), гетероконъюгированные антитела (например, биспецифические антитела), фрагменты pFv, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей и димеры, состоящие из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи. В некоторых случаях CD3-связывающий домен предпочтительно происходит из того же вида, в котором мультиспецифический белок, содержащий однодоменный сывороточный альбумин-связывающий белок, описанный в настоящем документе, в конечном итоге будет применяться. Например, для применения у людей, CD3-связывающий домен мультиспецифического белка, содержащего EPCAM-связывающий белок, описанный в настоящем документе, предпочтительно содержит человеческие или гуманизированные остатки антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела. Иллюстративная аминокислотная последовательность CD3-связывающего домена мультиспецифического (например, триспецифического) EPCAM-нацеленного TriTAC белка согласно настоящему изобретению представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO 379 или последовательность, которая на по меньшей мере около 75% - 100% идентична SEQ ID NO 379, как например, на по меньшей мере около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO 379.

[00140] Согласно некоторым вариантам осуществления домен, связывающий сывороточный альбумин, (также упоминаемый в настоящем документе как домен с увеличенным периодом полувыведения) мультиспецифического белка, содержащего

ЕрСАМ-связывающий белок, как описано в настоящем документе, может представлять собой любой домен, который связывается с сывороточным альбумином, включая без ограничения домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления домен, связывающий сывороточный альбумин, представляет собой одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен (VHH) происходящего из верблюдовых sdAb, или антигенсвязывающие фрагменты HSA-связывающих антител, такие как фрагменты Fab, F(ab')₂ и Fv, фрагменты, состоящие из одной или более CDR, одноцепочечные антитела (*например*, одноцепочечные фрагменты Fv (scFv)), дисульфид-стабилизированные фрагменты Fv (dsFv), гетероконъюгированные антитела (*например*, биспецифические антитела), фрагменты pFv, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей и димеры, состоящие из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи, пептид, лиганд или низкомолекулярную единицу, специфическую для сывороточного альбумина. Согласно определенным вариантам осуществления HSA-связывающий домен представляет собой однодоменное антитело. Согласно другим вариантам осуществления домен, связывающий сывороточный альбумин, представляет собой пептид. Согласно другим вариантам осуществления домен, связывающий сывороточный альбумин, представляет собой небольшую молекулу. Предполагается, что домен, связывающий сывороточный альбумин, мультиспецифического связывающего белка, содержащего одноцепочечный переменный фрагмент CD3-связывающего белка, является достаточно небольшим и составляет не более 25 кДа, не более 20 кДа, не более 15 кДа или не более 10 кДа согласно некоторым вариантам осуществления. В определенных случаях домен, связывающий сывороточный альбумин, составляет 5 кДа или менее, если он представляет собой пептид или низкомолекулярную единицу. Иллюстративная аминокислотная последовательность домена, связывающего сывороточный альбумин, мультиспецифического (*например*, триспецифического) ЕрСАМ-нацеленного TrITAC белка согласно настоящему изобретению представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO 378 или последовательность, которая на по меньшей мере около 75% - 100% идентична SEQ ID NO 378, как например, на по меньшей мере около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO 378.

[00141] Домен с увеличенным периодом полувыведения мультиспецифического связывающего белка, как описано в настоящем документе, содержащего одноцепочечный

вариабельный фрагмент CD3-связывающего белка, приводит к измененной фармакодинамике и фармакокинетики одноцепочечного вариабельно фрагмента CD3-связывающего белка. Как указано выше, домен с увеличенным периодом полувыведения увеличивает период полувыведения. Домен с увеличенным периодом полувыведения также изменяет фармакодинамические свойства, включая изменение распределения в ткани, проникновения и диффузии одноцепочечного вариабельно фрагмента CD3-связывающего белка. Согласно некоторым вариантам осуществления домен с увеличенным периодом полувыведения обеспечивает улучшенное нацеливание на ткань (включая опухоль), распределение в ткани, проникновение в ткань, диффузию внутри ткани и повышенную эффективность по сравнению с белком без домена с увеличенным периодом полувыведения. Согласно одному варианту осуществления в терапевтических способах эффективно и благоприятно используют уменьшенное количество мультиспецифического связывающего белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент CD3-связывающего белка, что приводит к снижению побочных эффектов, как например пониженному воздействию не на мишень, такому как цитотоксичность неопухолевых клеток.

[00142] Кроме того, аффинность связывания домена с увеличенным периодом полувыведения, согласно некоторым вариантам осуществления выбирают для достижения конкретного периода полувыведения у конкретного мультиспецифического связывающего белка, содержащего ЕpСAM-связывающий белок, как описано в настоящем документе. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления домен с увеличенным периодом полувыведения имеет высокую аффинность связывания. Согласно другим вариантам осуществления домен с увеличенным периодом полувыведения имеет среднюю аффинность связывания. Согласно другим вариантам осуществления домен с увеличенным периодом полувыведения имеет низкую или крайне ограниченную аффинность связывания. Иллюстративные аффинности связывания включают K_d 10 нМ или менее (высокая), от 10 нМ до 100 нМ (средняя) и более 100 нМ (низкая). Как указано выше, аффинности связывания со сывороточным альбумином определяют известными способами, такими как поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

[00143] ЕpСAM-нацеленный мультиспецифический белок согласно настоящему изобретению согласно определенным вариантам осуществления содержит (А) первый домен, который связывается с CD3, (В) второй домен, который представляет собой домен с увеличенным периодом полувыведения, и (С) третий домен, который представляет собой ЕpСAM-связывающий белок, как описано в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления первый домен содержит scFv, которое специфически

связывается с CD3. CD3, например, представляет собой человеческий белок CD3. Согласно определенным вариантам осуществления второй домен содержит sdAb, который специфически связывается с основным сывороточным белком. В некоторых случаях основной сывороточный белок представляет собой альбумин, такой как сывороточный альбумин, как например, человеческий сывороточный альбумин.

[00144] Домены (A), (B) и (C) согласно некоторым вариантам осуществления связаны через линкеры L1 и L2 в любой одной из следующих ориентаций: H₂N-(A)-L1-(C)-L2-(B)-COOH, H₂N-(B)-L1-(A)-L2-(C)-COOH, H₂N-(C)-L1-(B)-L2-(A)-COOH, H₂N-(C)-L1-(A)-L2-(B)-COOH, H₂N-(A)-L1-(B)-(C)-L2-COOH или H₂N-(B)-(C)-(A)-COOH.

[00145] ЕрСAМ-нацеленный мультиспецифический белок согласно настоящему изобретению, согласно некоторым вариантам осуществления содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере от около 70% до около 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 153-206 и 210-212. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСAМ-нацеленный мультиспецифический белок согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 77%, около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99%, до около 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 153-206 и 210-212.

Активные при определенных условиях мультиспецифические ЕрСAМ-нацеленные белки, такие как активные при определенных условиях ЕрСAМ-нацеленные триспецифические белки (так же упоминаются в настоящем изобретении как ЕрСAМ-нацеленный ProTriTAC или протриспецифический белки или молекулы)

[00146] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к активному при определенных условиях мультиспецифическому белку, содержащему ЕрСAМ-связывающий домен, как раскрыто в настоящем документе (например, согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение

относится к EpCAM-нацеленному протриспецифическому/ProTriTAC белку, содержащему EpCAM-связывающий домен согласно настоящему изобретению).

[00147] Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, который специфически связывается с CD3, и связывающий фрагмент, который специфически связывается с основным сывороточным белком, таким как человеческий сывороточный альбумин. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент способен маскировать взаимодействие EpCAM-связывающего домена или CD3-связывающего домена с их мишенями. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержит маскирующий фрагмент и расщепляемый линкер, такой как расщепляемый протеазой линкер. Иллюстративные последовательности маскирующего фрагмента внутри связывающего фрагмента представляют собой последовательности согласно SEQ ID NO 380-424 или последовательность, содержащую одну или более замен относительно последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 380-424. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент содержит модифицированную последовательность петли, не относящейся к CDR, и расщепляемый линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506, 508-550 и 581, или последовательность, которая содержит одну или более замен относительно последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506, 508-550 и 581. Согласно некоторым вариантам осуществления маскирующий фрагмент содержит модифицированную последовательность петли, не относящейся к CDR, и нерасщепляемый линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления нерасщепляемый линкер содержит последовательность согласно SEQ ID NO 507, или последовательность, которая содержит одну или более замен относительно SEQ ID NO 507. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483. Согласно некоторым вариантам осуществления CD3-связывающий домен EpCAM ProTriTAC согласно настоящему изобретению содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентична SEQ ID NO 474.

[00148] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-нацеленный ProTriTAC согласно настоящему изобретению содержит от N-конца к С-концу связывающий фрагмент, который представляет собой анти-ALB домен, содержащий петлю, не относящуюся к CDR, с сайтом связывания для CD3-связывающего домена (например, CD3-связывающего домена, имеющего последовательность SEQ ID NO 474 или на по меньшей мере около 75% идентичную ей), расщепляемый линкер, CD3-связывающий домен и на С-конце анти-ЕpCAM-связывающий домен. ЕpCAM-связывающий домен ProTriTAC согласно некоторым вариантам осуществления на по меньшей мере около 60%, около 61%, по меньшей мере около 62%, около 63%, около 64%, около 65%, около 66%, около 67%, около 68%, около 69%, около 70%, около 71%, около 72%, около 73%, около 74%, около 75%, около 76%, около 77%, около 78%, около 79%, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентичен аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497

[00149] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-нацеленный ProTriTAC согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере по меньшей мере около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 495, 498, 499, 500, 502, 569, 570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к ЕpCAM-нацеленному ProTriTAC согласно настоящему изобретению, содержащему аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO 576, фармацевтической композиции, содержащей его, и способу его применения для лечения заболевания, такого как опухолевое заболевание, как описано в настоящем документе.

[00150] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpCAM-нацеленный ProTriTAC согласно настоящему изобретению, в форме нерасщепляемого пролекарства, содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере по меньшей мере около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 495 и 502.

[00151] Иллюстративная последовательность активного ЕpCAM-нацеленного лекарственного средства (СТ), как описано в настоящем документе, представляет собой последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, около 80%, около 85%, около

90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентична SEQ ID NO 153-179, 180-206, 210-212, 494, 571 и 574.

[00152] Связывающий фрагмент способен синергетически расширять терапевтическое окно активного при определенных условиях ЕрСAM-нацеленного протриспецифического белка, как посредством стерической маскировки, так и посредством специфической маскировки. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент комбинирует как стерическую маскировку (например, посредством связывания с основным сывороточным альбумином), так и специфическую маскировку (например, посредством петель, не относящихся к CDR, связывая CDR анти-ЕрСAM домена или анти-CD3 scFv домена). В некоторых случаях модификация петель, не относящихся к CDR, внутри связывающего фрагмента, не влияет на связывание альбумина. Расщепляемый протеазой линкер в некоторых случаях обеспечивает активацию ЕрСAM-нацеленного протриспецифического белка в ходе одного протеолитического события, таким образом обеспечивая более эффективное превращение протриспецифической молекулы в микросреде опухоли. Далее, опухолеассоциированная протеолитическая активация в некоторых случаях выявляет активный рекрутер Т-клеток с минимальной активностью вне опухоли после активации. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к формату рекрутера Т-клеток с увеличенным периодом полувыведения (ProTriTAC), содержащему ЕрСAM-связывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, который в некоторых случаях представляет собой новый и улучшенный подход к конструированию активных при определенных условиях рекрутеров Т-клеток.

[00153] Период полувыведения ЕрСAM-связывающего домена в активной при определенных условиях протриспецифической форме, согласно некоторым вариантам осуществления, увеличен в общем кровообращении посредством использования связывающего фрагмента, как описано выше, который действует как предохранительный выключатель, удерживающий мультиспецифический белок в формате «про» в инертном состоянии до тех пор, пока он не достигнет микросреды опухоли, где он активируется при определенных условиях посредством расщепления линкера и способен связываться со своим антигеном (антигенами)-мишенью. Предохранительный выключатель в определенных случаях дает несколько преимуществ: некоторые примеры включают (i) расширение терапевтического окна для активного при определенных условиях ЕрСAM-нацеленного белка, (ii) снижение опосредованного мишенью распределения лекарственного средства посредством поддержания активного при определенных условиях

ЕрСАМ-нацеленного белка в кровотоке, (iii) снижение концентрации нежелательного активированного белка в системном кровотоке, тем самым минимизируя распространение химии, производства и контроля связанных примесей, например, предварительно активированного лекарственного продукта, эндогенных вирусов, белков клетки-хозяина, ДНК, выщелачиваемых веществ, противовспенивателей, антибиотиков, токсинов, растворителей, тяжелых металлов, (iv) снижение концентрации нежелательных активированных белков в системном кровотоке, тем самым минимизируя распространение связанных с продуктом примесей, агрегатов, продуктов распада, вариантов продукта в результате окисления, дезамидирования, денатурации, потери С-концевого Lys в MAb, (v) предотвращение аберрантной реактивации в кровотоке, (vi) снижение токсичности, ассоциированной с утечкой активированных видов из пораженной ткани или других патофизиологических состояний, например, опухолей, аутоиммунных заболеваний, воспалений, вирусных инфекций, событий ремоделирования тканей (таких как инфаркт миокарда, заживление кожных ран) или внешних повреждений (например, рентгеновское излучение, компьютерная томография, УФ-облучение) и (vii) снижение неспецифического связывания активного при определенных условиях ЕрСАМ-нацеленного белка. Кроме того, после активации или, другими словами, после выхода из строя предохранительного выключателя, активный при определенных условиях ЕрСАМ-нацеленный белок отделяется от предохранительного выключателя, который обеспечивал увеличенный период полувыведения, и, таким образом, выводится из циркуляции. Например, если лекарственное средство непреднамеренно активируется за пределами опухолевой среды или если оно просачивается из опухолевой среды после активации, оно, вероятно, будет быстро выведено и с меньшей вероятностью вызовет повреждение нормальных тканей, снижая таким образом токсичность.

[00154] Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях мультиспецифический ЕрСАМ-связывающий белок, как описано в настоящем документе, имеет улучшенный терапевтический индекс по сравнению с терапевтическим индексом ЕрСАМ-связывающего белка, который не является активным при определенных условиях, а скорее является постоянно активным. Например, ЕрСАМ ProTriTAC согласно некоторым вариантам осуществления имеет увеличенный терапевтический индекс по сравнению с ЕрСАМ TriTAC. Увеличение терапевтического индекса, согласно некоторым вариантам осуществления, составляет от по меньшей мере около в 2 раза до около в 1000 раз, как например от около в 4 раза до около в 800 раз, от около в 6 раз до около в 800 раз, от около в 6 раз до около в 600 раз, от около в 10 раз до около в 400 раз, от около в 20 раз до около в 200 раз, от около в 30 раз до около в 150 раз,

от около в 50 раз до около в 100 раз. Увеличение терапевтического индекса, согласно некоторым вариантам осуществления, связывают с конъюгированием ЕрСAМ-связывающего домена со связывающим фрагментом, как описано выше, с петлей, не относящейся к CDR, и расщепляемым линкером.

[00155] «Терапевтический индекс» (ТИ) (также называемый «терапевтическим окном») представляет собой согласно некоторым вариантам осуществления сравнение минимального количества терапевтического агента (например, ЕрСAМ TriTAC, ЕрСAМ ProTriTAC, ЕрСAМ CAR, ЕрСAМ ProCAR), которое вызывает терапевтический эффект (например, повышение выживаемости пациента с раком, экспрессирующим ЕрСAМ, получающего лечение терапевтическим агентом, как указано выше) с минимально переносимой дозой. Пример расширения терапевтического индекса ProTriTAC показан в **Таблице 14**. В некоторых случаях улучшение терапевтического индекса проявляется в улучшении EC_{50} ЕрСAМ TriTAC по сравнению с ЕрСAМ ProTriTAC при опосредованном Т-клетками уничтожении раковых клеток.

[00156] Согласно некоторым вариантам осуществления формат активного при определенных условиях ЕрСAМ-нацеленного белка обеспечивает ЕрСAМ-связывающий домен со значительно более длительным периодом полувыведения из сыворотки и снижает вероятность его нежелательной активации в кровотоке, приводя таким образом к «био-улучшенному» варианту.

[00157] Связывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, содержит по меньшей мере одну петлю, не относящуюся к CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления петля, не относящаяся к CDR, обеспечивает сайт связывания для связывания связывающего фрагмента со ЕрСAМ-связывающим доменом согласно настоящему изобретению. В некоторых случаях связывающий фрагмент маскирует связывание ЕрСAМ-связывающего домена с его антигеном-мишенью, например, посредством стерической окклюзии, посредством специфических межмолекулярных взаимодействий или комбинации обоих.

[00158] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент, как описано в настоящем документе дополнительно содержит определяющие комплементарность области (CDR), например, специфические для связывания основного сывороточного белка (например, человеческого сывороточного альбумина). В некоторых случаях связывающий фрагмент согласно настоящему изобретению представляет собой домен, происходящий из молекулы иммуноглобулина (молекулы Ig). Ig может принадлежать к любому классу или подклассу (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM и т.д.). Полипептидная цепь молекулы Ig складывается в серию параллельных бета-цепей,

связанных петлями. В варибельной области три петли составляют «определяющие комплементарность области» (CDR), которые определяют специфичность связывания антигена с данной молекулой. Молекула IgG содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, или ее антигенсвязывающий фрагмент. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (сокращенно VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Области VH и VL могут быть далее подразделены на области гиперварибельности, называемые определяющими комплементарностью областями (CDR), которые гиперварибельны по последовательности и/или участвуют в распознавании антигена, и/или обычно образуют структурно определенные петли, чередующиеся с областями, которые более консервативны, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[00159] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, содержащее только тяжелую цепь. Как показано на **Фиг. 26**, варибельный домен антитела, содержащего только тяжелую цепь, имеет несколько бета-цепей, которые расположены в двух листах. Варибельный домен антитела, содержащего только тяжелую цепь, содержит три гиперварибельные петли или определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области FR1, FR2, FR3 и FR4. Три CDR варибельного домена (CDR1, CDR2, CDR3) образуют кластер на одном конце бета-бочки. CDR представляют собой петли, которые соединяют бета-цепи В-С, С'-С'' и F-G складки иммуноглобулина, тогда как нижние петли, которые соединяют бета-цепи АВ, СС', С''-D и E-F складки иммуноглобулина, и верхние петли, которые соединяют цепи D-E складки иммуноглобулина, представляют собой петли, не относящиеся к CDR.

[00160] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения по меньшей мере некоторые или все аминокислотные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 являются частью «петли, не относящейся к CDR» описанных в настоящем документе связывающих фрагментов, таких как связывающий фрагмент, представляющий собой антитело, содержащее только тяжелую цепь. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения по меньшей мере некоторые аминокислотные остатки константного домена, CH1, CH2 или CH3, являются частью

«петли, не относящейся к CDR» описанных в настоящем документе связывающих фрагментов. Петли, не относящиеся к CDR, включают согласно некоторым вариантам осуществления одну или более AB, CD, EF и DE петель C1-домена Ig или Ig-подобной молекулы, AB, CC', EF, FG, BC и EC' петель C2- домена Ig или Ig-подобной молекулы, DE, BD, GF, A(A1A2)B и EF петель I (промежуточного) домена Ig или Ig-подобной молекулы.

[00161] Полагают, что в пределах варибельного домена CDR отвечают за распознавание и связывание антигена, тогда как остатки FR считаются каркасом для CDR. Однако в некоторых случаях некоторые остатки FR играют важную роль в распознавании и связывании антигена. Остатки каркасной области, влияющие на связывание Ag, делятся на две категории. Первые представляют собой остатки FR, которые контактируют с антигеном, таким образом, являются частью сайта связывания, и некоторые из этих остатков близки по последовательности к CDR. Другие остатки представляют собой те, которые находятся далеко от CDR в последовательности, но находятся в непосредственной близости от нее в трехмерной структуре молекулы, например, петля в тяжелой цепи.

[00162] Согласно некоторым вариантам осуществления петля, не относящаяся к CDR, модифицирована с получением сайт связывания антигена, специфического для основного сывороточного белка, такого как альбумин. Согласно некоторым вариантам осуществления петля, не относящаяся к CDR, модифицирована с получением сайт связывания антигена, специфического для ЕpCAM-связывающего домена, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления петля, не относящаяся к CDR, модифицирована с получением сайт связывания антигена, специфического для CD3-связывающего домена, как описано в настоящем документе.

[00163] Предполагается, что для модификации петли, не относящейся к CDR, могут быть использованы различные методы, например, сайт-направленный мутагенез, случайный мутагенез, вставка по меньшей мере одной аминокислоты, которая является чужеродной для аминокислотной последовательности петли, не относящейся к CDR, аминокислотная замена. В некоторых примерах антигенный пептид вставлен в петлю, не относящуюся к CDR. В некоторых примерах антигенный пептид заменен на петлю, не относящуюся к CDR. Модификация, генерирующая сайт связывания антигена, в некоторых случаях находится только в одной петле, не относящейся к CDR. В других случаях более чем одна петля, не относящаяся к CDR, подвергается модификации. Например, модификация находится в любой из петель, не относящихся к CDR, показанных на **Фиг. 26**, т.е. AB, CC', C''-D, EF и D-E. В некоторых случаях модификация находится в петле DE. В других случаях модификации происходят во всех четырех петлях AB, CC', C''-D, E-F.

[00164] В определенных примерах связывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с ЕpСAM-связывающим доменом посредством их петли АВ, СС', С'' D или EF и связываются с основным сывороточным белком, таким как альбумин, посредством их петли В-С, С'-С'' или F-G. В определенных примерах связывающий фрагмент связывается с ЕpСAM-связывающим доменом посредством его петли АВ, СС', С'' D и EF и связывается с основным сывороточным белком, таким как альбумин, посредством его петли ВС, С'С'' и FG. В определенных примерах связывающий фрагмент связывается с ЕpСAM-связывающим доменом посредством одной или более из петель АВ, СС', С'' D и E-F и связывается с основным сывороточным белком, таким как альбумин, посредством одной или более из петель ВС, С'С'' и FG. В определенных примерах связывающий фрагмент связывается с основным сывороточным белком, таким как альбумин, посредством его петли АВ, СС', С'' D или EF и связывается с ЕpСAM-связывающим доменом посредством его петли ВС, С'С'' или FG. В определенных примерах связывающий фрагмент связывается с основным сывороточным белком, таким как альбумин, посредством его петли АВ, СС', С'' D и EF и связывается с ЕpСAM-связывающим доменом посредством его петли ВС, С'С'' и FG. В определенных примерах связывающий фрагмент согласно первому варианту осуществления связывается с основным сывороточным белком, таким как альбумин, посредством одной или более из петель АВ, СС', С'' D и E-F и связывается с ЕpСAM-связывающим белком посредством одной или более из петель ВС, С'С'' и FG. В определенных примерах связывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с CD3-связывающим доменом посредством их петли АВ, СС', С'' D или EF и связываются с основным сывороточным белком, таким как альбумин, посредством их петли В-С, С'-С'' или F-G. В определенных примерах связывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с основным сывороточным белком, таким как альбумин, посредством их петли АВ, СС', С'' D или EF и связываются с CD3-связывающим доменом посредством их петли В-С, С'-С'' или F-G. В определенных примерах связывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с CD3-связывающим доменом посредством их петли АВ, СС', С'' D или EF и связываются с ЕpСAM-связывающим доменом посредством их петли В-С, С'-С'' или F-G. В определенных примерах связывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с ЕpСAM-связывающим доменом посредством их петли АВ, СС', С'' D или EF и связываются со CD3-связывающим доменом посредством их петли В-С, С'-С'' или F-G.

[00165] Основной сывороточный белок содержит, например, альбумин, фибриноген или глобулин. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие

фрагменты представляют собой сконструированные структуры. Сконструированные структуры содержат, например, sdAb, scFv, Fab, VHH, домен фибронектина типа III, иммуноглобулин-подобную структуру (как рассматривается в Halaby et al., 1999. Prot Eng 12(7):563-571), дарпин, пептид цистеинового узла, липокалин, структуру пучка из трех спиралей, молекулу, связывающую альбумин, относящийся к белку G, или аптамерную структуру ДНК или РНК.

[00166] В некоторых случаях связывающие фрагменты содержат сайт связывания для основного сывороточного белка. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR внутри связывающих фрагментов обеспечивают сайт связывания для основного сывороточного белка. Основной сывороточный белок в некоторых примерах представляет собой глобулин, альбумин, трансферрин, IgG1, IgG2, IgG4, IgG3, IgA мономер, фактор XIII, фибриноген, IgE или пентамерный IgM. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие фрагменты содержат сайт связывания для легкой цепи иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR обеспечивают сайт связывания для легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых примерах легкая цепь иммуноглобулина представляет собой Igκ свободную легкую цепь или Igλ свободную легкую цепь.

[00167] Согласно дополнительным вариантам осуществления связывающие фрагменты относятся к любому виду полипептидов. Например, в определенных случаях связывающие фрагменты представляют собой природные пептиды, синтетические пептиды или структуры фибронектина или сконструированные основные сывороточные белки. Согласно некоторым примерам связывающие фрагменты содержат любой тип связывающего домена, включая без ограничения домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), растворимый фрагмент TCR, однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен (VHH) нанотела, происходящего из верблюдовых. Согласно другим вариантам осуществления связывающие фрагменты представляют собой не относящиеся к Ig связывающие домены, т.е. имитатор антитела, такой как антикарины, аффилины, молекулы аффитела, аффимеры, аффитины, альфатела, авимеры, дарпины, финомеры, пептиды домена Куница и монотела.

[00168] В настоящем документе предполагается, что связывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, содержит по меньшей мере один расщепляемый

линкер. Согласно одному аспекту расщепляемый линкер содержит полипептид, имеющий последовательность, распознаваемую или расщепляемую специфическим для последовательности образом. Связывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, в некоторых случаях содержит расщепляемый протеазой линкер, распознаваемый или расщепляемый специфическим для последовательности образом. Согласно некоторым вариантам осуществления расщепляемый протеазой линкер распознается специфическим для последовательности образом посредством матричной металлопротеазы (ММР), например, MMP9. В некоторых случаях расщепляемый протеазой линкер, распознаваемый MMP9, содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность PR(S/T)(L/I)(S/T). В некоторых случаях расщепляемый протеазой линкер, распознаваемый MMP9, содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность LEATA. В некоторых случаях расщепляемый протеазой линкер распознается специфическим для последовательности образом посредством MMP11.

[illegible]

[00170] Таблица 1: Иллюстративные протеазы и последовательности распознавания протеазой

Протеаза	Последовательность домена расщепления	SEQ ID NO:
MMP7	KRALGLPG	508
MMP7	(DE) ₈ RPLALWRS(DR) ₈	509
MMP9	PR(S/T)(L/I)(S/T)	510
MMP9	LEATA	511
MMP11	GGAANLVRGG	512
MMP14	SGRIGFLRTA	513
MMP	PLGLAG	514
MMP	PLGLAX	515
MMP	PLGC(me)AG	516
MMP	ESPAYYTA	517
MMP	RLQLKL	518
MMP	RLQLKAC	519
MMP2, MMP9, MMP14	EP(Cit)G(Hof)YL	520
Активатор пламиногена урокиназного типа (uPA)	SGRSA	521
Активатор пламиногена урокиназного типа (uPA)	DAFK	523
Активатор пламиногена урокиназного типа (uPA)	GGGRR	524
Лизосомальный фермент	GFLG	525
Лизосомальный фермент	ALAL	526
Лизосомальный фермент	FK	527
Катепсин В	NLL	528
Катепсин D	PIC(Et)FF	529
Катепсин К	GGPRGLPG	530
Простат-специфический антиген	HSSKLQ	531
Простат-специфический антиген	HSSKLQL	532
Простат-специфический антиген	HSSKLQEDA	533
Протеаза вируса простого герпеса	LVLASSSFGY	534
Протеаза HIV	GVSQNYPIVG	535

Протеаза	Последовательность домена расщепления	SEQ ID NO:
Протеаза CMV	GVVQASCRLA	536
Тромбин	F(Pip)RS	537
Тромбин	DPRSFL	538
Тромбин	PPRSFL	539
Каспаза-3	DEV D	540
Каспаза-3	DEVDP	541
Каспаза-3	KGSGDVEG	542
Фермент превращения интерлейкина 1 β	GWEHDG	543
Энтерокиназа	EDDDDKA	544
FAP	KQEQNPGST	545
Калликреин 2	GKA FRR	546
Плазмин	DAFK	547
Плазмин	DVLK	548
Плазмин	DAFK	549
TOP	ALLLALL	550

[00171] Известно, что протеазы секретируются некоторыми больными клетками и тканями, например, опухолевыми или раковыми клетками, создавая микроокружение, обогащенное протеазами, или богатое протеазами микроокружение. В некоторых случаях кровь субъекта обогащена протеазами. В некоторых случаях клетки, окружающие опухоль, секретируют протеазы в микроокружение опухоли. Клетки, окружающие опухоль, секретирующие протеазы, включают без ограничения стромальные клетки опухоли, миофибробласты, клетки крови, тучные клетки, В-клетки, NK-клетки, регуляторные Т-клетки, макрофаги, цитотоксические Т-лимфоциты, дендритные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, полиморфно-ядерные клетки и другие клетки. В некоторых случаях протеазы присутствуют в крови субъекта, например, протеазы, нацеленные на аминокислотные последовательности, обнаруживаемые в микробных пептидах. Эта функция позволяет нацеленным терапевтическим средствам, таким как антигенсвязывающие белки, иметь дополнительную специфичность, поскольку Т-клетки не будут связываться с антигенсвязывающим белком, за исключением обогащенного протеазами микроокружения целевых клеток или тканей.

[00172] Другие неограничивающие примеры линкеров, которые могут использоваться в конструкциях, описанных в настоящем документе, представлены в Перечне последовательностей далее.

Интеграция в химерные антигенные рецепторы (CAR)

[00173] ЕpСAM-связывающие белки согласно настоящему изобретению могут в определенных примерах быть включены в химерный антигенный рецептор (CAR) или ProCAR. Сконструированная иммунная эффекторная клетка, например, Т-клетка или НК-клетка, может применяться для экспрессии CAR, который включает ЕpСAM-связывающий белок, содержащий, например, анти-ЕpСAM однодоменное антитело, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления CAR, включающий ЕpСAM-связывающий белок, как описано в настоящем документе, соединен с трансмембранным доменом через шарнирную область, и далее с костимулирующим доменом, например, функциональным сигнальным доменом, полученным из OX40, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) или 4-1BB. Согласно некоторым вариантам осуществления CAR дополнительно содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен, как например 4-1BB и/или CD3 дзета. Иллюстративные последовательности ProCAR, содержащего ЕpСAM-связывающий домен, представляют собой последовательности согласно SEQ ID NO485-491 или последовательности, которые на по меньшей мере около 75% - 100% идентичны последовательности, выбранной из SEQ ID NO 485-491, как например, на около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100%.

[00174] Активные при определенных условиях рецепторы, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере один связывающий фрагмент, содержащий петлю, не относящуюся к CDR. Согласно одному аспекту связывающий фрагмент маскирует связывание ЕpСAM-связывающего домена до активации. Расщепляемый линкер, например, содержит сайт расщепления протеазой или сайт рН-зависимого расщепления. Расщепляемый линкер, в определенных случаях, расщепляется только в микросреде опухоли. Таким образом, связывающий фрагмент, соединенный с расщепляемым линкером и дополнительно связанный с ЕpСAM-связывающим доменом, в некоторых примерах, поддерживает ЕpСAM-связывающий домен в инертном состоянии в кровотоке до тех пор, пока расщепляемый линкер не будет отщеплен в микросреде опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент связывается с ЕpСAM-связывающим доменом. Согласно некоторым вариантам осуществления петля, не относящаяся к CDR,

обеспечивает сайт связывания для связывания фрагмента со EpCAM-связывающим доменом. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент маскирует связывание EpCAM-связывающего домена с его антигеном-мишенью, например, посредством пространственной окклюзии, посредством специфических внутримолекулярных взаимодействий, таких как взаимодействия внутри различных доменов полипептида, содержащего связывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент дополнительно содержит определяющие комплементарность области (CDR).

[00175] В некоторых случаях связывающий фрагмент CAR или proCAR, как описано в настоящем документе, представляет собой домен, происходящий из молекулы иммуноглобулина (молекула Ig), как описано выше, в части, соответствующей активным при определенных условиях мультиспецифическим EpCAM-нацеленным белкам согласно настоящему изобретению.

[00176] На **Фиг. 27** приведено схематическое изображение части иллюстративного расщепляемого активного при определенных условиях рецептора согласно настоящему изобретению. Активный при определенных условиях рецептор содержит EpCAM-связывающий домен (aTarget1), расщепляемый линкер и связывающий фрагмент (aTarget2). EpCAM-связывающий домен обладает специфичностью в отношении первой мишени (EpCAM), тогда как связывающий фрагмент обладает специфичностью в отношении второй мишени. Связывающий фрагмент также имеет модифицированную петлю, не относящуюся к CDR, которая ингибирует связывание EpCAM-связывающего домена с его мишенью. Сразу после расщепления при расщепляемом линкере, связывающий фрагмент может быть высвобожден, обеспечивая связывание EpCAM-связывающего домена.

[00177] На **Фиг. 28** приведено схематическое изображение активации иллюстративного активного при определенных условиях рецептора согласно настоящему изобретению. Неактивный рецептор (неактивный ProCAR) содержит EpCAM-связывающий домен (анти-опухолевая мишень sdAb или scFv), соединенный со связывающим фрагментом (анти-мишень 2 sdAb) через линкер, содержащий сайт расщепления протеазой. Связывающий фрагмент содержит маскирующий пептид/фрагмент, вставленный в одну или более петель, не относящихся к CDR, так что связывающий фрагмент связывается с и ингибирует EpCAM-антиген-связывающий домен. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент обладает специфичностью в отношении данной мишени, как описано далее в настоящем документе. Рецептор также содержит трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Рецептор обеспечен в Т-клетке (CAR-T). При воздействии микросредой опухоли сайт

расщепления протеазой расщепляется опухолеассоциированными пртеазами, активируя таким образом рецептор, создавая активный рецептор, который не содержит связывающий фрагмент. Рецептор теперь содержит активный антигенсвязывающий домен. Так как рецептор интернализован клеткой, образуются новые рецепторы, которые содержат связывающий фрагмент и являются неактивными.

[00178] Расщепляемый линкер связывающего фрагмента, согласно некоторым вариантам осуществления содержит сайт расщепления протеазой, подобный описанному выше, в отношении активных при определенных условиях мультиспецифических белков, содержащих ЕрСАМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению. Например, расщепляемый линкер согласно некоторым вариантам осуществления содержит последовательность, выбранную из Таблицы 1 или из других последовательностей линкеров, представленных в таблице последовательностей.

Трансmemбранный домен

[00179] Активные при определенных условиях химерные антигенные рецепторы, слитые белки Т-клеточного рецептора и Т-клеточные рецепторы согласно настоящему изобретению включают трансmemбранный домен для вставки в мембрану эукариотической клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления трансmemбранный домен расположен между ЕрСАМ-связывающим доменом и внутриклеточным доменом. Согласно некоторым вариантам осуществления трансmemбранный домен расположен между ЕрСАМ-связывающим доменом и костимулирующим доменом.

[00180] Любой трансmemбранный (ТМ) домен, который обеспечивает вставку полипептида в клеточную мембрану эукариотической клетки (*например*, млекопитающего), является подходящим для применения. В качестве неограничивающего примера ТМ последовательность IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 551) может применяться. Дополнительные неограничивающие примеры подходящих ТМ последовательностей включают: а) происходящую из CD8 бета: GLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC (SEQ ID NO: 552), b) происходящую из CD4: ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC (SEQ ID NO: 553), c) происходящую из CD3 дзета: LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV (SEQ ID NO: 554), d) происходящую из CD28: WVLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 555), e) происходящую из CD134 (OX40): AAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL (SEQ ID NO: 556) и f) происходящую из CD7: ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA (SEQ ID NO: 557).

Шарнирная область

[00181] В некоторых случаях активные при определенных условиях химерные антигенные рецепторы, слитые белки Т-клеточного рецептора и Т-клеточные рецепторы согласно настоящему изобретению содержат шарнирную область (также упоминаемую в настоящем документе как «спейсер»), где шарнирная область расположена между ЕpСAМ-связывающим доменом и трансмембранным доменом. В некоторых случаях шарнирная область представляет собой шарнирную область тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых случаях шарнирная область представляет собой полипептид шарнирной области, происходящий из рецептора (*например*, CD8-происходящая шарнирная область).

[00182] Шарнирная область может иметь длину от около 4 аминокислот до около 50 аминокислот (aa), например, от около 4 aa до около 10 aa, от около 10 aa до около 15 aa, от около 15 aa до около 20 aa, от около 20 aa до около 25 aa, от около 25 aa до около 30 aa, от около 30 aa до около 40 aa или от около 40 aa до около 50 aa.

[00183] Подходящие спейсеры могут быть легко выбраны и могут иметь любую из ряда подходящих длин, как например от 1 аминокислоты (*например*, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, включая от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и могут составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

[00184] Иллюстративные спейсеры включают глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n и (GGGS)_n, где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере один), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры могут применяться, как Gly, так и Ser являются относительно неструктурированными и поэтому могут служить в качестве нейтральной связки между компонентами. Глициновые полимеры могут применяться, глицин имеет доступ к значительно даже большему пространству ϕ - ψ , чем аланин, и значительно менее ограничен, чем остатки с длинными боковыми цепями (см. Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Иллюстративные спейсеры содержат аминокислотные последовательности, включающие без ограничения GGSG, GGS GG, GSGSG, GS GGG, GGGSG, GSSSG и тому подобное.

[00185] Аминокислотные последовательности шарнирной области иммуноглобулина известны из уровня техники, см., *например*, Tan *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 162, and Huck *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 1779. Неограничивающие примеры шарнирной области иммуноглобулина могут включать одну из следующих аминокислотных последовательностей: DKTHT, CPPC, CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO:

558), см., например, Glaser *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280:41494), ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 559), KSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 560), KCCVDCP (SEQ ID NO: 561), KYGPPCP (SEQ ID NO: 562), EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 563), шарнирная область человеческого IgG1), ERKCCVECP (SEQ ID NO: 564), шарнирная область человеческого IgG2), ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO: 565), шарнирная область человеческого IgG3), SPNMVPHANHAQ (SEQ ID NO: 566), шарнирная область человеческого IgG4), и тому подобное.

[00186] Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область содержит аминокислотную последовательность шарнирной области человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Шарнирная область может включать одну или более аминокислотных замен, и/или вставок, и/или делеций по сравнению с шарнирной областью дикого типа (природного происхождения). Например, His229 шарнирной области человеческого IgG1 может быть замещен на Туг, так что шарнирная область содержит последовательность EPKSCDKTYTCPPCP (SEQ ID NO: 567), см., например, Yan *et al.* (2012) *J. Biol. Chem.* 287:5891.

[00187] Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, происходящую из человеческого CD8, например, шарнирная область содержит аминокислотную последовательность TTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 568) или ее вариант.

Активные при определенных условиях химерные антигенные рецепторы

[00188] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к активному при определенных условиях химерному антигенному рецептору (CAR). В общем CAR содержит множество доменов, включая нацеливающий антиген-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Активный при определенных условиях CAR согласно настоящему изобретению содержит множество доменов, включая связывающий фрагмент, нацеливающий антиген-связывающий домен, который связывается с ЕpCAM, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой сигнальный домен белка, включая без ограничения ZAP70, CD3 дзета и 4-1BB.

[00189] Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор дополнительно содержит костимулирующий домен. Согласно некоторым вариантам осуществления

костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен белка, включая без ограничения OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), и их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[00190] Согласно некоторым вариантам осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, включая без ограничения альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дзета-цепи TCR, субъединицы CD3 эpsilon TCR, субъединицы CD3 gamma TCR, субъединицы CD3 delta TCR, CD45, CD4, CDS, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональные фрагменты и их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[00191] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к клетке (например, Т-клетке), сконструированной для экспрессии CAR. Согласно одному аспекту клетка трансформирована CAR, и CAR экспрессируется на клеточной поверхности. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка (например, Т-клетка) трансдуцирована вирусным вектором, кодирующим CAR. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусным вектором является ретровирусный вектор. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусным вектором является лентивирусный вектор. Согласно некоторым таким вариантам осуществления клетка может стабильно экспрессировать CAR. Согласно другому варианту осуществления клетка (*например*, Т-клетка) трансфицирована нуклеиновой кислотой, например, мРНК, кДНК, ДНК, кодирующей CAR. Согласно некоторым таким вариантам осуществления клетка может временно экспрессировать CAR.

Активные при определенных условиях слитые белки Т-клеточного рецептора

[00192] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к активным при определенных условиях слитым белкам Т-клеточного рецептора. В контексте настоящего изобретения «слитый белок Т-клеточного рецептора (TCR)» или «TFP» включает рекомбинантный полипептид, происходящий из различных полипептидов, содержащих TCR, который в общем способен i) связываться с поверхностным антигеном на клетках-мишенях и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, при совместном расположении в или на поверхности Т-клетки.

[00193] Активный при определенных условиях TFP содержит связывающий фрагмент, ЕrСAM-связывающий домен и субъединицу Т-клеточного рецептора. Согласно некоторым вариантам осуществления субъединица Т-клеточного рецептора дополнительно

содержит по меньшей мере часть внеклеточного домена Т-клеточного рецептора, трансмембранный домен и внутриклеточный домен Т-клеточного рецептора. Согласно некоторым вариантам осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, включая без ограничения альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дзета-цепи TCR, субъединицы CD3 эпсилон TCR, субъединицы CD3 гамма TCR, субъединицы CD3 дельта TCR, CD45, CD4, CDS, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональные фрагменты или их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[00194] Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточный домен Т-клеточного рецептора содержит стимулирующий домен. Стимулирующий домен может происходить из субъединицы Т-клеточного рецептора, включая без ограничения субъединицу бета, субъединицу альфа, субъединицу дельта, субъединицу гамма, субъединицу эпсилон или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления стимулирующий домен содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или его часть, включая без ограничения субъединицу TCR CD3 дзета, субъединицу TCR CD3 эпсилон, субъединицу TCR CD3 гамма, субъединицу TCR CD3 дельта, цепь дзета TCR, цепь рецептора 1 Fc эпсилон, цепь рецептора 2 Fc эпсилон, цепь рецептора 1 Fc гамма, цепь рецептора 2a Fc гамма, цепь рецептора 2b 1 Fc гамма, цепь рецептора 2b2 Fc гамма, цепь рецептора 3a Fc гамма, цепь рецептора 3b Fc гамма, цепь рецептора 1 Fc бетта, TYROBP (DAP12), CDS, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональные фрагменты или их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[00195] Согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях TFR дополнительно содержит костимулирующий домен. Согласно некоторым вариантам осуществления костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен белка, включающий без ограничения OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), и 4-1BB (CD137), и их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[00196] Согласно некоторым вариантам осуществления EpcAM-связывающий домен соединен с внеклеточным доменом Т-клеточного рецептора посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4. В некоторых случаях кодируемая

линкерная последовательность содержит последовательность длинного линкера (LL). В некоторых случаях кодируемая последовательность длинного линкера содержит $(G_4S)_n$, где n = от 2 до 4. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит последовательность короткого линкера (SL). В некоторых случаях кодируемая последовательность короткого линкера содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 3.

[00197] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к клетке (например, Т-клетке), сконструированной для экспрессии активного при определенных условиях слитого белка Т-клеточного рецептора (TFP). Согласно одному аспекту клетка трансформируется активным при определенных условиях TFP, и активный при определенных условиях TFP экспрессируется на поверхности клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка (например, Т-клетка) трансдуцируется вирусным вектором, кодирующим активный при определенных условиях TFP. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор является ретровирусным вектором. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. Согласно некоторым таким вариантам осуществления клетка может стабильно экспрессировать активный при определенных условиях TFP. Согласно другому варианту осуществления клетка (например, Т-клетка) трансфицируется нуклеиновой кислотой, например, мРНК, кДНК, ДНК, кодирующей активный при определенных условиях TFP. Согласно некоторым таким вариантам осуществления клетка может временно экспрессировать активный при определенных условиях TFP.

Активные при определенных условиях Т-клеточные рецепторы

[00198] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к активному при определенных условиях Т-клеточному рецептору. Т-клеточный рецептор в общем содержит множество субъединиц, включая субъединицы альфа, бета, дельта, гамма, эпсилон и дзета. Активный при определенных условиях Т-клеточный рецептор согласно настоящему изобретению содержит связывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент присоединяется к субъединице Т-клеточного рецептора, включая без ограничения субъединицу альфа, бета или их комбинацию.

[00199] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент способен маскировать связывание Т-клеточный рецептор с его мишенью. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент связывается с Т-клеточным рецептором. Согласно некоторым вариантам осуществления петля, не относящаяся к CDR, обеспечивает сайт связывания для связывания фрагмента с Т-

клеточным рецептором. Согласно некоторым вариантам осуществления петля, не относящаяся к CDR, обеспечивает сайт связывания, специфический для Т-клеточного рецептора альфа, Т-клеточного рецептора бета или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий фрагмент маскирует связывание Т-клеточного рецептора с его мишенью, *например*, посредством стерической окклюзии, посредством специфических межмолекулярных взаимодействий.

[00200] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к клетке (например, Т-клетке), сконструированной для экспрессии активного при определенных условиях Т-клеточного рецептора (TCR). Согласно одному аспекту клетка трансформирована активным при определенных условиях TCR, и активный при определенных условиях TCR экспрессируется на клеточной поверхности. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка (например, Т-клетка) трансдуцирована вирусным вектором, кодирующим активный при определенных условиях TCR. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусным вектором является ретровирусный вектор. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусным вектором является лентивирусный вектор. Согласно некоторым таким вариантам осуществления клетка может стабильно экспрессировать активный при определенных условиях TCR. Согласно другому варианту осуществления клетка (например, Т-клетка) трансфецирована нуклеиновой кислотой, *например*, мРНК, кДНК, ДНК, кодирующей активный при определенных условиях TCR. Согласно некоторым таким вариантам осуществления клетка может временно экспрессировать активный при определенных условиях TCR.

Клетки

[00201] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к клетке, содержащей химерный антигенный рецептор или активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор, активный при определенных условиях слитый белок Т-клеточного рецептора или активный при определенных условиях Т-клеточный рецептор согласно настоящему изобретению. Клеткой может быть клетка млекопитающего.

[00202] Подходящие клетки млекопитающих включают первичные клетки и immortalized клеточные линии. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают человеческие клеточные линии, клеточные линии приматов, отличных от человека, клеточные линии грызунов (например, мышей, крыс) и тому подобное. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают без ограничения клетки HeLa (например, Американская коллекция типовых культур (ATCC) NO CCL-2), клетки CHO

(например, ATCC № CRL9618, CCL61, CRL9096), клетки 293 (например, ATCC NO CRL-1573), клетки Vero, клетки NIH 3T3 (например, ATCC NO CRL-1658), клетки Huh-7, клетки ВНК (например, ATCC NO CCL10), клетки PC12 (ATCC NO CRL1721), клетки COS, клетки COS-7 (ATCC NO CRL1651), клетки RAT1, мышинные клетки L (ATCC NO CCL13), клетки почек эмбриона человека (НЕК) (ATCC NO CRL1573), клетки HLНерG2, клеточные линии HuT-78, Jurkat, HL-60, NK (например, NKL, NK92, и YTS), и тому подобное.

[00203] В некоторых случаях клетка не является иммортализованной клеточной линией, а является клеткой (например, первичной клеткой), полученной у индивидуума. Например, в некоторых случаях клетка представляет собой иммунную клетку, полученную у индивидуума. Например, клетка представляет собой Т-лимфоцит, полученный у индивидуума. В качестве другого примера клетка представляет собой цитотоксическую клетку, полученную у индивидуума. В качестве другого примера клетка представляет собой стволовую клетку или клетку-предшественник, полученную у индивидуума.

[00204] В недавних исследованиях для управления активностью естественных клеток-киллеров (NK) были использованы конструкции CAR, обзор приведен в Hermanson & Kaufman (2015, Front Immunol 6:195) and Carlsten & Childs (2015, Front Immunol 6:266). Подобно Т-клеткам, NK-клетки можно трансфицировать экспрессионными конструкциями CAR и использовать для индукции иммунного ответа. Поскольку NK-клетки не требуют соответствия HLA, их можно использовать в качестве аллогенных эффекторных клеток (Harmanson & Kaufman, 2015). Кроме того, NK-клетки периферической крови (PB-NK), используемые для терапии, могут быть выделены у доноров простым забором крови. Используемые конструкции CAR могут содержать элементы, аналогичные тем, которые используются для создания клеток CAR-T.

[00205] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к клетке, содержащей NK-клетку, содержащую химерный антигенный рецептор, активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор, активный при определенных условиях слитый белок Т-клеточного рецептора или активный при определенных условиях Т-клеточный рецептор согласно настоящему изобретению.

[00206] Как раскрыто выше в контексте активного при определенных условиях ЕpСAM-связывающего белка (например, ЕpСAM ProTriTAC), согласно некоторым вариантам осуществления активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор, как описано в настоящем документе, имеет улучшенный терапевтический индекс по сравнению с терапевтическим индексом химерного

антигенного рецептора, содержащего тот же ЕpСAM-связывающий домен, что и активный при определенных условиях вариант, но являющегося постоянно активным, а не активным при определенных условиях. Например, ЕpСAM ProCAR, согласно некоторым вариантам осуществления имеет увеличенный терапевтический индекс по сравнению с ЕpСAM CAR. Увеличение, согласно некоторым вариантам осуществления, составляет от по меньшей мере около в 2 раза до около в 1000 раз, как например от около в 4 раза до около в 800 раз, от около в 6 раз до около в 800 раз, от около в 6 раз до около в 600 раз, от около в 10 раз до около в 400 раз, от около в 20 раз до около в 200 раз, от около в 30 раз до около в 150 раз, от около в 50 раз до около в 100 раз. Увеличение терапевтического индекса, согласно некоторым вариантам осуществления, связывают с конъюгированием ЕpСAM-связывающего домена со связывающим фрагментом, как описано выше, с петлей, не относящейся к CDR, и расщепляемым линкером.

Способы получения клетки, содержащей активный при определенных условиях рецептор

[00207] Настоящее изобретение относится к способу получения клетки, содержащей активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор, слитый белок Т-клеточного рецептора или Т-клеточный рецептор. Способ в общем предусматривает генетическую модификацию клетки млекопитающего экспрессионным вектором или РНК (*например, in vitro* транскрибированная РНК), содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор, слитый белок Т-клеточного рецептора или Т-клеточный рецептор согласно настоящему изобретению. Генетическую модификацию можно проводить *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. Клеткой может быть, например, иммунная клетка (*например, Т-лимфоцит или НК-клетка*), стволовая клетка или клетка-предшественник.

[00208] В некоторых случаях генетическую модификацию проводят *ex vivo*. Например, Т-лимфоцит, стволовую клетку или НК-клетку получают у индивидуума, и клетку, полученную у индивидуума, генетически модифицируют для экспрессии активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора, слитого белка Т-клеточного рецептора или Т-клеточного рецептора согласно настоящему изобретению.

Источники Т-клеток

[00209] Согласно некоторым вариантам осуществления источник Т-клеток получают у субъекта. В контексте настоящего изобретения термин «субъект», предназначен для включения живых организмов, у которых может быть вызван иммунный

ответ (например, млекопитающих). Примеры субъектов включают людей, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные виды. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая без ограничения аллогенные Т-клетки (например, аллогенные Т-клетки донорского происхождения), естественные клетки-киллеры (например, естественные клетки-киллеры донорского происхождения), моноклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения можно использовать любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области техники. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения, Т-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта, с использованием любого ряда методик, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение FICOLL™. Согласно одному варианту осуществления клетки из циркулирующей крови индивидуума получают аферезом. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Согласно одному варианту осуществления клетки, собранные с помощью афереза, промывают для удаления фракции плазмы и помещают клетки в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. Согласно одному варианту осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). Согласно альтернативному варианту осуществления в промывочном растворе отсутствует кальций и может отсутствовать магний, или могут отсутствовать многие, если не все двухвалентные катионы. Начальные стадии активации в отсутствие кальция могут привести к усиленной активации. Специалистам в данной области техники очевидно, что стадию промывки можно выполнять способами, известными специалистам в данной области техники, например, с использованием полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, Cobe 2991 cell processor, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver) в соответствии с инструкциями производителя. После промывки клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, свободный от Ca, свободный от Mg PBS, PlasmaLyte A или другой буфер с физиологическим раствором или без него. В качестве альтернативы, нежелательные компоненты образца афереза могут быть удалены, а клетки непосредственно ресуспендированы в культуральной среде.

[00210] Согласно одному варианту осуществления Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, центрифугированием в градиенте PERCOLL™ или центрифугированием в противотоке. Конкретная субпопуляция Т-клеток, такая как Т-клетки CD3 +, CD28 +, CD4+,

CD8+, CD45RA+ и CD45RO+, может быть дополнительно выделена методами положительного или отрицательного отбора. Например, согласно одному варианту осуществления Т-клетки выделяют путем инкубации с анти-CD3/анти-CD28 (например, 3×28)-конъюгированными шариками, таких как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, в течение периода времени, достаточного для положительного отбора желаемых Т-клеток. Согласно одному варианту осуществления период времени составляет около 30 минут. Согласно еще одному другому варианту осуществления период времени находится в интервале от 30 минут до 36 часов или более, включая все целые значения между ними. Согласно еще одному другому варианту осуществления период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. Согласно еще одному варианту осуществления период времени составляет от 10 до 24 часов. Согласно одному варианту осуществления период времени инкубации составляет 24 часа. Более длительные периоды времени инкубации могут применяться для выделения Т-клеток при любой стимуляции, когда присутствует немного Т-клеток по сравнению с другими типами клеток, как при выделении инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у индивидуума с ослабленным иммунитетом. Кроме того, использование более продолжительного времени инкубации может повысить эффективность захвата Т-клеток CD8+. Таким образом, просто сокращая или увеличивая время, в течение которого Т-клетки получают возможность связываться с шариками CD3/CD28, и/или путем увеличения или уменьшения соотношения шариков и Т-клеток (как описано далее в настоящем документе), субпопуляции Т-клеток могут быть преимущественно отобраны положительно или отрицательно при инициации культивирования или в другие моменты времени в ходе способа. Кроме того, увеличивая или уменьшая соотношение анти-CD3 и/или анти-CD28 антител на шариках или другой поверхности, субпопуляции Т-клеток могут быть преимущественно отобраны положительно или отрицательно при инициации культивирования или в другие желаемые моменты времени. Также можно использовать множество раундов отбора в контексте согласно настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления может быть желательно выполнить процедуру отбора и использовать «неотобранные» клетки в процессе активации и размножения. «Неотобранные» клетки также могут быть подвергнуты дальнейшим раундам отбора.

[00211] Обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора может быть достигнуто с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отбираемых клеток. Одним из способов является сортировка клеток и/или отбор посредством отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, где используется коктейль моноклональных антител,

направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на отрицательно отбираемых клетках. Например, для обогащения клеток CD4⁺ путем отрицательного отбора коктейль моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Согласно определенным вариантам осуществления может быть желательно обогатить или положительно отобрать регуляторные Т-клетки, которые обычно экспрессируют CD4⁺, CD25⁺, CD62L^{hi}, GITR⁺ и FoxP3⁺. Альтернативно, согласно определенным вариантам осуществления Т-регуляторные клетки истощаются конъюгированными с анти-CD25 шариками или другим подобным способом отбора.

[00212] Согласно одному варианту осуществления может быть отобрана популяция Т-клеток, которая экспрессирует один или более из IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима В и перфорина, или другие подходящие молекулы, например, другие цитокины. Способы скрининга экспрессии клеток могут быть определены, например, способами, описанными в публикации РСТ № WO 2013/126712.

[00213] Для выделения желаемой популяции клеток путем положительного или отрицательного отбора можно варьировать концентрацию клеток и поверхности (например, частиц, таких как шарики). Согласно определенным вариантам осуществления может быть желательно значительно уменьшить объем, в котором шарики и клетки смешиваются вместе (например, увеличить концентрацию клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и шариков. Например, согласно одному варианту осуществления применяют концентрацию 2 миллиард клеток/мл. Согласно одному варианту осуществления применяют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. Согласно еще одному другому варианту осуществления применяют более 100 миллион клеток/мл. Согласно еще одному другому варианту осуществления применяют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллион клеток/мл. Согласно еще одному варианту осуществления применяют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллион клеток/мл. Согласно другим вариантам осуществления применяют концентрации 125 или 150 миллион клеток/мл. Использование высоких концентраций может привести к увеличению выхода клеток, их активации и размножения. Кроме того, использование высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватывать клетки, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или из образцов, где присутствует много опухолевых клеток (например, лейкомическая кровь, опухолевая ткань, и т.д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и их было бы желательно получить. Например, использование высокой концентрации клеток позволяет более эффективно отбирать Т-клетки CD8⁺, которые обычно имеют более слабую экспрессию CD28.

[00214] Согласно другому варианту осуществления может быть желательно использовать более низкие концентрации клеток. Посредством значительного разбавления смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как шарики), взаимодействия между частицами и клетками минимизируются. Благодаря этому отбирают клетки, которые экспрессируют высокие количества желаемых антигенов, связываемых с частицами. Например, Т-клетки CD4⁺ экспрессируют высокие уровни CD28 и более эффективно захватываются, чем Т-клетки CD8⁺ при разбавленных концентрациях. Согласно одному варианту осуществления концентрация клеток составляет 5×10^6 /мл. Согласно другим вариантам осуществления может применяться концентрация от около 1×10^5 /мл до 1×10^6 /мл, включая любое целое значение между ними.

[00215] Согласно другим вариантам осуществления клетки можно инкубировать на ротаторе в течение различных периодов времени с разной скоростью при 2-10 °C или при комнатной температуре.

[00216] Т-клетки для стимуляции также можно заморозить после стадии промывки. Не желая ограничиваться теорией, стадия замораживания и последующего оттаивания обеспечивает более однородный продукт посредством удаления гранулоцитов и, в некоторой степени, моноцитов в популяции клеток. После стадии промывки, которая удаляет плазму и тромбоциты, клетки можно суспендировать в растворе для замораживания. Хотя многие растворы для замораживания и параметры известны в данной области техники и полезны в контексте настоящего изобретения, один способ включает использование PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% человеческого сывороточного альбумина, или культуральную среду, содержащую 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20 человеческого сывороточного альбумина и 7,5% ДМСО, или 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% человеческого сывороточного альбумина и 7,5% ДМСО, или других подходящих сред для замораживания клеток, содержащих, например, Hespán и PlasmaLyte A, клетки затем замораживают до -80 °C со скоростью 1° в минуту и хранят в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота. Могут использоваться другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемого замораживания сразу при -20 °C или в жидком азоте.

[00217] Согласно определенным вариантам осуществления криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в настоящем документе, и оставляют на один час при комнатной температуре перед активацией с использованием способов согласно настоящему изобретению.

[00218] Также в контексте настоящего изобретения предполагается сбор образцов крови или продукта афереза у субъекта в период времени до того, когда могут

потребоваться размноженные клетки, как описано в настоящем документе. Таким образом, источник клеток, подлежащих размножению, можно собрать в любой необходимый момент времени, а желаемые клетки, такие как Т-клетки, выделить и заморозить для последующего использования в Т-клеточной терапии для любого ряда заболеваний или состояний, для которых благоприятна Т-клеточная терапия, как например, описанных в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления взятие образца крови или аферез проводят у в целом здорового субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления взятие образца крови или аферез проводят у в целом здорового субъекта, имеющего риск развития заболевания, но у которого еще не развилось заболевание, и представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для дальнейшего использования. Согласно определенным вариантам осуществления Т-клетки могут быть размножены, заморожены и использованы в более поздний момент времени. Согласно определенным вариантам осуществления образцы берут у пациента вскоре после постановки диагноза определенного заболевания, как описано в настоящем документе, но до начала лечения. Согласно еще одному другому варианту осуществления клетки выделяют из образца крови или посредством афереза у субъекта до проведения любого ряда подходящих способов лечения, включая без ограничения лечение такими агентами, как натализумаб, эфализумаб, противовирусные агенты, химиотерапию, облучение, иммунодепрессанты, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммуноаблативные агенты, такие как CAMPATH, анти-CD3-антитела, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и облучение.

[00219] Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения Т-клетки получают у пациента сразу после лечения, которое оставляет у субъекта функциональные Т-клетки. В связи с этим было замечено, что после определенных видов лечения рака, в частности лечения лекарственными средствами, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты обычно восстанавливаются после лечения, качество полученных Т-клеток может быть оптимальным или улучшенным в отношении их способности размножаться *ex vivo*. Подобным образом, после манипуляции *ex vivo* с использованием описанных в настоящем документе способов эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии в отношении усиленного приживания и размножения *in vivo*. Таким образом, в контексте настоящего изобретения предполагается сбор клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки гемопоэтического происхождения, в ходе этой фазы восстановления. Кроме того, согласно определенным вариантам осуществления режимы

мобилизации (например, мобилизации с помощью GM-CSF) и кондиционирования могут использоваться для создания состояния у субъекта, при котором репопуляция, рециркуляция, регенерация и/или размножение определенных типов клеток являются преимущественными, особенно в ходе определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

Активация и размножение Т-клеток

[00220] Т-клетки можно активировать и размножать, в общем, используя способы, описанные, например, в патентах США № 6352694, 6534055, 6905680, 6692964, 5858358, 6887466, 6905681, 7144575, 7067318, 7172869, 7232566, 7175843, 5883223, 6905874, 6797514, 6867041, и в публикации заявки на патент США № 20060121005.

[00221] В общем, Т-клетки согласно настоящему изобретению могут быть размножены путем контакта с поверхностью, к которой прикреплен агент, который стимулирует сигнал, связанный с комплексом CD3/TCR, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, можно стимулировать популяции Т-клеток, как описано в настоящем документе, например, посредством контакта с анти-CD3-антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, или анти-CD2 антителом, иммобилизованным на поверхности, или контакта с белком активатором киназы С (например, бриостатин) в конъюгации с ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяция Т-клеток может контактировать с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации либо Т-клеток CD4+, либо Т-клеток CD8+ используют анти-CD3 антитела и анти-CD28 антитела. Примеры анти-CD28 антитела включают 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besancon, France) можно использовать, также как и другие способы, широко известные в данной области техники (Berg *et al.*, *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998, Haanen *et al.*, *J. Exp. Med.* 190(9):1319-1328, 1999, Garland *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).

[00222] Согласно определенным вариантам осуществления первичный стимулирующий сигнал и костимулирующий сигнал для Т-клетки могут быть обеспечены согласно разным протоколам. Например, агенты, обеспечивающие каждый сигнал, могут быть в растворе или связаны с поверхностью. При связывании с поверхностью агенты могут быть связаны с одной и той же поверхностью (т.е. «цис» система) или с отдельными поверхностями (т.е. «транс» система). В качестве альтернативы один агент может быть

связан с поверхностью, а другой агент может находиться в растворе. Согласно одному варианту осуществления агент, обеспечивающий костимулирующий сигнал, связан с поверхностью клетки, а агент, обеспечивающий первичный сигнал активации, находится в растворе или связан с поверхностью. Согласно определенным вариантам осуществления оба агента могут находиться в растворе. Согласно одному варианту осуществления агенты могут быть в растворимой форме, а затем сшиты с поверхностью, такой как клетка, экспрессирующая рецепторы Fc, или антитело, или другой связывающий агент, который будет связываться с агентами. В этом отношении см., например, публикации заявок на патент США № 20040101519 и 20060034810 для искусственных антигенпрезентирующих клеток (aAPC), которые в контексте настоящего изобретения предполагается использовать для активации и размножения Т-клеток.

[00223] Согласно одному варианту осуществления два агента иммобилизованы на шариках, либо на одном и том же шарике, т.е. «цис», либо на отдельных шариках, т.е. «транс». В качестве примера агент, обеспечивающий первичный сигнал активации, представляет собой анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а агент, обеспечивающий костимулирующий сигнал, представляет собой анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и оба агента совместно иммобилизованы на одном и том же шарике в эквивалентных молекулярных количествах. Согласно одному варианту осуществления соотношение каждого антитела, связанного с шариками, равное 1:1, применяют для размножения Т-клеток CD4⁺ и роста Т-клеток. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения применяют такое соотношение анти-CD3:анти-CD28 антител, связанных с шариками, что наблюдают увеличение размножения Т-клеток по сравнению с размножением, наблюдаемым при соотношении 1:1. Согласно одному конкретному варианту осуществления увеличение составляет от в около 1 раз до в около 3 раза по сравнению с размножением, наблюдаемым при соотношении 1:1. Согласно одному варианту осуществления соотношение CD3:CD28 антител, связанных с шариками, составляет от 100:1 до 1:100, включая целые значения между ними. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения больше анти-CD28 антитела связано с частицами, чем анти-CD3 антитела, т.е. соотношение CD3:CD28 составляет менее одного. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения соотношение анти-CD28 антитела и анти-CD3 антитела, связанных с шариками, составляет более 2:1. Согласно одному конкретному варианту осуществления применяют соотношение CD3:CD28 антител, связанных с шариками, равное 1:100. Согласно одному варианту осуществления применяют соотношение CD3:CD28 антител, связанных с шариками, равное 1:75. Согласно еще одному другому варианту осуществления применяют соотношение CD3:CD28 антител,

связанных с шариками, равное 1:50. Согласно одному варианту осуществления применяют соотношение CD3:CD28 антител, связанных с шариками, равное 1:30. Согласно одному варианту осуществления применяют соотношение CD3:CD28 антител, связанных с шариками, равное 1:10. Согласно одному варианту осуществления применяют соотношение CD3:CD28 антител, связанных с шариками, равное 1:3. Согласно еще одному варианту осуществления применяют соотношение CD3:CD28 антител, связанных с шариками, равное 3:1.

[00224] Соотношения частиц и клеток от 1:500 до 500:1, включая любые целые значения между ними, можно использовать для стимуляции Т-клеток и других клеток-мишеней. Специалисту в данной области техники очевидно, что соотношение частиц и клеток может зависеть от размера частиц относительно клетки-мишени. Например, небольшие шарики могут связываться только с небольшим количеством клеток, тогда как более крупные шарики будут больше связываться. Согласно определенным вариантам осуществления соотношение клеток и частиц находится в интервале от 1:100 до 100:1, включая любые целые значения между ними, и согласно другим вариантам осуществления соотношение от 1:9 до 9:1, включая любые целые значения между ними, также может применяться для стимуляции Т-клеток. Соотношение анти-CD3- и анти-CD28-связанных частиц и Т-клеток, которые приводят к стимуляции Т-клеток, могут варьироваться. Как отмечено выше, однако, определенные значения включают 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 и 15:1, причем предпочтительным является соотношение частиц на Т-клетку по меньшей мере 1:1. Согласно одному варианту осуществления применяют соотношение частиц и клеток 1:1 или менее. Согласно одному конкретному варианту осуществления применяют соотношение частиц и клеток 1:5. Согласно другим вариантам осуществления соотношение частиц и клеток может варьироваться в зависимости от дня стимуляции. Например, согласно одному варианту осуществления соотношение частиц и клеток составляет от 1:1 до 10:1 на первый день, и дополнительные частицы добавляют к клеткам далее каждый день или через день в течение до 10 дней, при конечных соотношениях от 1:1 до 1:10 (на основе количества клеток на день добавления). Согласно одному конкретному варианту осуществления соотношение частиц и клеток составляет 1:1 на первый день стимуляции и достигает 1:5 на третий и пятый дни стимуляции. Согласно одному варианту осуществления частицы добавляют ежедневно или через день на основе конечного соотношения 1:1 на первый день и 1:5 на третий и пятый дни стимуляции. Согласно одному варианту осуществления соотношение частиц и клеток составляет 2:1 на первый день стимуляции и достигает 1:10 на третий и пятый дни стимуляции. Согласно одному варианту

осуществления частицы добавляют ежедневно или через день на основе конечного соотношения 1:1 на первый и день и соотношения 1:10 на третий и пятый дни стимуляции. Специалисту в данной области техники понятно, что множество других соотношений могут быть подходящими для использования в контексте настоящего изобретения. В частности, соотношения будут варьироваться в зависимости от размера частиц, а также от размера и типа клеток.

[00225] Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения клетки, такие как Т-клетки, объединяют с шариками, покрытыми агентом, затем шарики и клетки разделяют, а затем клетки культивируют. Согласно альтернативному варианту осуществления перед культивированием покрытые агентом шарики и клетки не разделяют, а культивируют вместе. Согласно еще одному другому варианту осуществления шарики и клетки сначала концентрируют путем приложения силы, такой как магнитная сила, что приводит к усилению лигирования маркеров клеточной поверхности, тем самым вызывая стимуляцию клеток.

[00226] В качестве примера, белки клеточной поверхности можно лигировать, позволяя парамагнитным шарикам, к которым прикреплены анти-CD3 и анти-CD28 (3×28 шариков), контактировать с Т-клетками. Согласно одному варианту осуществления клетки (например, от 10^4 до 10^9 Т-клеток) и шарики (например, парамагнитные шарики DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т при соотношении 1: 1) объединяют в буфере, например, PBS (без двухвалентных катионов, таких как кальций и магний). Специалистам в данной области техники также очевидно, что можно использовать любую концентрацию клеток. Например, клетка-мишень может очень редко встречаться в образце и составлять только 0,01% от образца, или весь образец (т.е. 100%) может содержать представляющую интерес клетку-мишень. Соответственно, настоящее изобретение охватывает любое количество клеток. Согласно определенным вариантам осуществления может быть желательно значительно уменьшить объем, в котором частицы и клетки смешиваются вместе (т.е. увеличить концентрацию клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и частиц. Например, согласно одному варианту осуществления применяют концентрацию около 2 миллиард клеток/мл. Согласно одному варианту осуществления более 100 миллион клеток/мл применяют. Согласно еще одному другому варианту осуществления используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллион клеток/мл применяют. Согласно еще одному варианту осуществления применяют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллион клеток/мл. Согласно другим вариантам осуществления можно применять концентрации 125 или 150 миллион клеток/мл. Использование высоких концентраций может привести к увеличению выхода клеток, их

активации и размножения. Кроме того, использование высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватить клетки, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, как например CD28-отрицательные Т-клетки. Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение и желательны для получения согласно определенным вариантам осуществления. Например, использование высокой концентрации клеток позволяет более эффективно отобрать Т-клетки CD8+, которые обычно имеют более слабую экспрессию CD28.

[00227] Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения смесь можно культивировать в течение от нескольких часов (около 3 часа) до около 14 дней, включая любые промежуточные целые значения времени. Согласно одному варианту осуществления смесь можно культивировать в течение 21 дня. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения шарики и Т-клетки культивируют вместе в течение около восьми дней. Согласно одному варианту осуществления шарики и Т-клетки культивируют вместе в течение 2-3 дней. Также может быть желательно использовать несколько циклов стимуляции, так что время культивирования Т-клеток может составлять 60 дней или более. Условия, подходящие для культивирования Т-клеток, включают подходящую среду (например, Minimal Essential Media или RPMI Media 1640 или X-vivo 15, (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, фетальная бычья сыворотка или сыворотка человека), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β и TNF- α , или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают без ограничения поверхностно-активное вещество, плазманат и восстанавливающие агенты, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда может включать RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, оптимизатор с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, без сыворотки или с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы) или определенного набора гормонов и/или количества цитокина (цитокинов), достаточного для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, а не в культуры клеток, которые подлежат введению субъекту. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержки роста, например, при соответствующей температуре (например, 37 °C) и атмосфере (например, воздух плюс 5% CO₂).

[00228] Т-клетки, которые подверглись воздействию различного времени стимуляции, могут проявлять разные характеристики. Например, типичная кровь или

продукты афереза мононуклеарных клеток периферической крови имеют популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4+), которая является более цитотоксической, или супрессорную популяцию Т-клеток (ТС, CD8+). Размножение *ex vivo* Т-клеток путем стимуляции рецепторов CD3 и CD28 дает популяцию Т-клеток, которая до около дней 8-9 состоит преимущественно из клеток ТН, а после около дней 8-9 популяция Т-клеток содержит постоянно возрастающую популяцию клеток ТС.

Модификации ЕрСАМ-связывающего белка

[00229] ЕрСАМ-связывающие белки, описанные в настоящем документе, включая ЕрСАМ-связывающие домены (например, ЕрСАМ-связывающие sdAb согласно настоящему изобретению) и ЕрСАМ-нацеленные мультиспецифические белки (например, ЕрСАМ-нацеленный триспецифический или протриспецифический белок, как описано в настоящем документе) охватывают производные или аналоги, в которых (i) аминокислота заменена аминокислотным остатком, который не кодируется генетическим кодом, (ii) зрелый полипептид слит с другим соединением, таким как полиэтиленгликоль, или (iii) дополнительные аминокислоты слиты с белком, как например, лидерная или секреторная последовательность или последовательность для очистки белка.

[00230] Типичные модификации включают без ограничения ацетилирование, ацилирование, ADP-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гем-фрагмента, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных сшивок, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование якоря GPI, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитическую обработку, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование.

[00231] Модификации проводят в любом месте описанных в настоящем документе ЕрСАМ-связывающих белков, включая пептидную основную цепь, боковые цепи аминокислот и amino- или карбоксильные концы. Определенные распространенные модификации пептидов, которые можно использовать для модификации ЕрСАМ-связывающих белков, включают гликозилирование, присоединение липида, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты,

гидроксилирование, блокировку amino- или карбоксильной группы в полипептиде или их обоих путем ковалентной модификации и АДФ-рибозилирование.

[00232] Согласно некоторым вариантам осуществления производные ЕрСАМ-связывающих белков, как описано в настоящем документе, содержат производные иммунореактивного модулятора и антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций.

[00233] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению являются одновалентными или мнововалентными (двухвалентными, трехвалентными и т.д.). В контексте настоящего изобретения термин «валентность» относится к числу потенциальных сайтов связывания мишени, ассоциированных с антителом. Каждый сайт связывания мишени специфически связывает одну молекулу-мишень или конкретное положение или локус на молекуле-мишени. Когда антитело является моновалентным, каждый сайт связывания молекулы будет специфически связываться с одним положением антигена или эпитопом. Когда антитело содержит более одного сайт связывания мишени (поливалентное), каждый сайт связывания мишени может специфически связывать одни и те же или разные молекулы (например, может связываться с разными лигандами или разными антигенами, или разными эпитопами, или положениями одного и того же антигена).

[00234] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки, как изложено выше, слиты с Fc-областью любого вида, включая без ограничения человеческий иммуноглобулин, такой как человеческий IgG1, человеческий IgG2, человеческий IgG3, человеческий IgG4, с образованием Fc-слитых ЕрСАМ-связывающих белков. Согласно некоторым вариантам осуществления Fc-слитый ЕрСАМ-связывающий белок согласно настоящему изобретению имеет более продолжительный период полувыведения по сравнению с идентичным в остальном ЕрСАМ-связывающим белком. Согласно некоторым вариантам осуществления Fc-слитые ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению содержат, среди прочего, одну или более дополнительных замен аминокислотных остатков, мутаций и/или модификаций, например, в области Fc, которые приводят к связывающему белку с предпочтительными характеристиками, включая без ограничения измененную фармакокинетику, увеличенный период полувыведения из сыворотки.

[00235] Согласно некоторым вариантам осуществления такие Fc-слитые ЕрСАМ-связывающие белки обеспечивают увеличенные периоды полувыведения у млекопитающих, как например у человека, более 5 дней, более 10 дней, более 15 дней, более 20 дней, более 25 дней, более 30 дней, более 35 дней, более 40 дней, более 45 дней, более 2

месяцев, более 3 месяцев, более 4 месяцев или более 5 месяцев. Увеличенный период полувыведения в некоторых случаях приводит к более высокому титру сыворотки, что, таким образом, снижает частоту введения ЕpСAМ-связывающих белков и/или снижает концентрацию вводимых антител. Связывание с человеческим FcRn *in vivo* и период полувыведения из сыворотке полипептидов, связывающих FcRn человека с высокой аффинностью, анализируют в некоторых примерах на трансгенных мышах или трансфицированных клеточных линиях человека, экспрессирующих человеческий FcRn, или на приматах, которым вводят полипептиды с вариантом Fc-области.

[00236] ЕpСAМ-связывающие белки, в некоторых случаях, модифицируют различными образами в ходе или после получения, например, путем гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с молекулой антитела или другим клеточным лигандом и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций проводят способами, включающими без ограничения специфическое химическое расщепление цианогенбромидом, трипсином, химотрипсином, папаином, протеазой V8, NaBH₄, ацетилирование, формилирование, окисление, восстановление, метаболический синтез в присутствии туникамицина и т.д.

[00237] Различные посттрансляционные модификации ЕpСAМ-связывающих белков, также охватываемые настоящим изобретением, включают, например, N-связанные или O-связанные углеводные цепи, обработку N- или C- концов, присоединение химических фрагментов к основной аминокислотной цепи, химические модификации N-связанных или O-связанных углеводных цепей, а также добавление или делецию N-концевого остатка метионина в результате экспрессии прокариотической клеткой-хозяином. Кроме того, ЕpСAМ-связывающие белки в некоторых случаях модифицированы поддающейся обнаружению меткой, такой как ферментативная, флуоресцентная, радиоизотопная или аффинная метка, что позволяет обнаруживать и выделять модулятор.

Полинуклеотиды, кодирующие ЕpСAМ-связывающие белки

[00238] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение также относится к молекулами полинуклеотидов, кодирующим ЕpСAМ-связывающие белки, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулы полинуклеотидов предоставляют в виде конструкции ДНК. Согласно другим вариантам осуществления молекулы полинуклеотидов предоставляют в виде транскрипта информационной РНК.

[00239] Молекулы полинуклеотидов конструируют известными методами, такими как комбинирование генов, кодирующих один домен ЕрСАМ-связывающего белка, или гена, кодирующего различные домены ЕрСАМ-связывающих белков, содержащих более одного домена. Согласно некоторым вариантам осуществления ген, кодирующий домены, либо отделен пептидными линкерами, либо, согласно другим вариантам осуществления, непосредственно связан пептидной связью в единую генетическую конструкцию, функционально связанную с подходящим промотором и необязательно подходящим терминатором транскрипции, экспрессирующую его в бактериях или другой подходящей системе экспрессии, такой как, например, клетки СНО. В зависимости от используемой векторной системы и хозяина можно использовать любое число подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая конститутивные и индуцибельные промоторы. Промотор выбирают таким образом, чтобы он управлял экспрессией полинуклеотида в соответствующей клетке-хозяине.

[00240] Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотид, кодирующий ЕрСАМ-связывающий белок, как описано в настоящем документе, вставлен в вектор, предпочтительно экспрессионный вектор, что представляет собой дополнительный вариант осуществления. Этот рекомбинантный вектор можно сконструировать известными способами. Представляющие интерес векторы включают плазмиды, фагмиды, производные фагов, вирусы (например, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, лентивирусы и тому подобное) и космиды.

[00241] Множество систем экспрессионного вектора/хозяина можно использовать для хранения и экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид описанного ЕрСАМ-связывающего белка. Примерами экспрессионных векторов для экспрессии в *E.coli* являются pSKK (Le Gall et al., J Immunol Methods. (2004) 285(1):111-27) или pcDNA5 (Invitrogen) для экспрессии в клетках млекопитающих.

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

Фармацевтические композиции

[00242] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим анти-ЕрСАМ-связывающий белок, описанный в настоящем документе, вектор, содержащий

полинуклеотид, кодирующий полипептид ЕрСАМ-связывающих белков, или клетку-хозяин, трансформированную этим вектором, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает без ограничения любой носитель, который не влияет на эффективность биологической активности ингредиентов и который не является токсичным для пациента, которому его вводят. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают физиологические растворы с фосфатным буфером, воду, эмульсии, такие как эмульсии типа масло-в-воде, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Такие носители могут быть составлены обычными способами и могут вводиться субъекту в подходящей дозе. Предпочтительно композиции являются стерильными. Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено включением различных антибактериальных и противогрибковых средств. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к одному или более описанным выше ЕрСАМ-связывающим белкам, упакованным в лиофилизированной форме, или упакованным в водной среде.

[00243] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтических композиций, ЕрСАМ-связывающие белки, описанные в настоящем документе, инкапсулированы в наночастицы. Согласно некоторым вариантам осуществления наночастицы представляют собой фуллерены, жидкие кристаллы, липосомы, квантовые точки, суперпарамагнитные наночастицы, дендримеры или наностержни. Согласно другим вариантам осуществления фармацевтических композиций ЕрСАМ-связывающий белок присоединен к липосомам. В некоторых случаях ЕрСАМ-связывающие белки конъюгированы с поверхностью липосом. В некоторых случаях ЕрСАМ-связывающие белки инкапсулированы в оболочку из липосом. В некоторых случаях липосома представляет собой катионную липосому.

[00244] ЕрСАМ-связывающие белки, описанные в настоящем документе, предназначены для использования в качестве лекарственного средства. Введение проводят разными способами, например, внутривенным, внутривенным, подкожным, внутримышечным, местным или внутрикожным введением. Согласно некоторым вариантам осуществления способ введения зависит от вида терапии и вида соединения, содержащегося в фармацевтической композиции. Режим дозирования будет определяться лечащим врачом и другими клиническими факторами. Дозы для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер тела пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол, конкретное вводимое соединение, время и способ введения, вид терапии, общее

состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимые одновременно. «Эффективная доза» относится к количествам активного ингредиента, которые достаточны для того, чтобы повлиять на течение и тяжесть заболевания, приводя к уменьшению или ремиссии такой патологии, и может быть определена с использованием известных способов.

[00245] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕpСAM-связывающие белки согласно настоящему изобретению вводят при дозе до 10 мг/кг при частоте один раз в неделю. В некоторых случаях доза находится в интервале от около 1 нг/кг до около 10 мг/кг, например, от около 1 нг/кг до около 70 нг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза находится в интервале от около 1 нг/кг до около 10 нг/кг, от около 5 нг/кг до около 15 нг/кг, от около 12 нг/кг до около 20 нг/кг, от около 18 нг/кг до около 30 нг/кг, от около 25 нг/кг до около 50 нг/кг, от около 35 нг/кг до около 60 нг/кг, от около 45 нг/кг до около 70 нг/кг, от около 65 нг/кг до около 85 нг/кг, от около 80 нг/кг до около 1 мкг/кг, от около 0,5 мкг/кг до около 5 мкг/кг, от около 2 мкг/кг до около 10 мкг/кг, от около 7 мкг/кг до около 15 мкг/кг, от около 12 мкг/кг до около 25 мкг/кг, от около 20 мкг/кг до около 50 мкг/кг, от около 35 мкг/кг до около 70 мкг/кг, от около 45 мкг/кг до около 80 мкг/кг, от около 65 мкг/кг до около 90 мкг/кг, от около 85 мкг/кг до около 0,1 мг/кг, от около 0,095 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых случаях доза составляет от около 0,1 мг/кг до около 0,2 мг/кг, от около 0,25 мг/кг до около 0,5 мг/кг, от около 0,45 мг/кг до около 1 мг/кг, от около 0,75 мг/кг до около 3 мг/кг, от около 2,5 мг/кг до около 4 мг/кг, от около 3,5 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 4,5 мг/кг до около 6 мг/кг, от около 5,5 мг/кг до около 7 мг/кг, от около 6,5 мг/кг до около 8 мг/кг, от около 7,5 мг/кг до около 9 мг/кг или от около 8,5 мг/кг до около 10 мг/кг. Частота введения, согласно некоторым вариантам осуществления составляет около меньше чем ежедневно, через день, реже одного раза в день, два раз в неделю, еженедельно, один раз в 7 дней, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели или один раз в месяц. В некоторых случаях частота введения является еженедельной. В некоторых случаях частота введения является еженедельной, и доза составляет до 10 мг/кг. В некоторых случаях продолжительность введения составляет от около 1 дня до около 4 недель или более.

Способы лечения и свойства снижения роста опухоли

[00246] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение также относится к способам лечения состояния, связанного со злокачественными клетками, экспрессирующими ЕpСAM, у субъекта, предусматривающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества

ЕрСАМ-связывающих доменов или мультиспецифических белков (включая активные при определенных условиях мультиспецифические белки), содержащих ЕрСАМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению, или CAR или ProCAR, содержащих ЕрСАМ-связывающий белок, как описано в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей их. Согласно некоторым вариантам осуществления состоянием является рак.

[00247] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста или прогрессирования опухоли у субъекта, у которого присутствуют злокачественные клетки, экспрессирующие ЕрСАМ, предусматривающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества ЕрСАМ-связывающих доменов или мультиспецифических белков, содержащих ЕрСАМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению, или CAR, содержащего ЕрСАМ-связывающий белок, как описано в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей их. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу ингибирования метастаз злокачественных клеток, экспрессирующих ЕрСАМ, у субъекта, предусматривающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества ЕрСАМ-связывающих доменов или мультиспецифических белков, содержащих ЕрСАМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению, или фармацевтической композиции, содержащей их. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу индукции регрессии опухоли у субъекта, у которого присутствуют злокачественные клетки, экспрессирующие ЕрСАМ, предусматривающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества ЕрСАМ-связывающих доменов или мультиспецифических белков, содержащих ЕрСАМ-связывающий домен согласно настоящему изобретению, или фармацевтической композиции, содержащей их. Согласно некоторым вариантам осуществления способы, как описано в настоящем документе, дополнительно предусматривают введение эффективного количества второго терапевтического агента. Согласно некоторым вариантам осуществления второй терапевтический агент представляет собой биотерапевтический агент, например, антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления вторым терапевтическим агентом является цитокин, TNF α (фактор некроза опухоли альфа), ингибитор PAP (фосфатаза фосфатидной кислоты), онколитический вирус, ингибитор киназы, ингибитор IDO (индолеамин-пиррол-2,3-диоксигеназа), ингибитор глутаминазы GLS1, CAR (химерный антигенный фактор)-Т-клетка или Т-клеточная терапия, агонист TLR (Toll-подобного рецептора) (например, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9) или противоопухолевая вакцина.

[00248] Согласно определенным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению снижают рост опухолевых клеток *in vivo* при введении субъекту, у которого присутствуют опухолевые клетки, которые экспрессируют ЕрСАМ. Измерение уменьшения роста опухолевых клеток может быть проведено множеством различных способов, хорошо известных в данной области техники. Неограничивающие примеры включают прямое измерение размера опухоли, измерение массы вырезанной опухоли и сравнение с контрольными субъектами, измерение с помощью методов визуализации (например, КТ или МРТ), в которых могут применяться или не применяться изотопы или люминесцентные молекулы (например, люцифераза) для расширенного анализа, и тому подобное. Согласно конкретным вариантам осуществления введение ЕрСАМ-связывающих белков согласно настоящему изобретению приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим агентом на по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%, где снижение роста опухоли на около 100% указывает на полный ответ и отсутствие опухоли. Согласно другим вариантам осуществления введение ЕрСАМ-связывающих белков согласно настоящему изобретению приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим агентом на около 50-100%, около 75-100% или около 90-100%. Согласно другим вариантам осуществления введение ЕрСАМ-связывающих белков согласно настоящему изобретению приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим агентом на около 50-60%, около 60-70%, около 70-80%, около 80-90% или около 90-100%.

[00249] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению вводят для лечения неопластического состояния. Неопластические состояния, согласно некоторым вариантам осуществления, представляют собой доброкачественные или злокачественные солидные опухоли или другие неопластические заболевания крови, и согласно некоторым вариантам осуществления выбраны из группы, включающей без ограничения опухоли надпочечника, СПИД-ассоциированный рак, альвеолярную саркому мягких тканей, астроцитарные опухоли, опухоли вегетативных ганглий, рак мочевого пузыря (плоскоклеточный рак и переходноклеточный рак), бластоцелевые нарушения, рак костей (адамантинома, аневризматическая костная киста, остеохондрома), рак головного и спинного мозга, метастатические опухоли головного мозга, рак молочной железы, включая тройной негативный рак молочной железы, опухоли каротидного тела, рак шейки матки, хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточный рак, рак ободочной

кишки, колоректальный рак, доброкачественную кожную фиброзную гистиоцитоксантому, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимомы, эпителиальные нарушения, саркомы Юнга, внескелетную миксоидную хондросаркому, несовершенный костный фиброгенез, фиброзную дисплазию костей, рак желчного пузыря и желчных протоков, рак желудка, желудочно-кишечного тракта, гестационную трофобластическую болезнь, геноцитомы, связанные с железами нарушения, рак головы и шеи, гипоталамический рак кишечника, инсулиному, саркому Капоши, рак почки (нефробластома, папиллярно-клеточная карцинома), лейкемии, липомы/доброкачественные липоматозные опухоли, липосаркому/злокачественные липоматозные опухоли, рак печени (гепатобластома, гепатоцеллюлярная карцинома), лимфомы, рак легких (мелкоклеточная карцинома, аденокарцинома, плоскоклеточная карцинома, крупноклеточная карцинома и т.п.), макрофагальные нарушения, медуллобластома, меланому, менингиомы, множественную эндокринную неоплазию, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластома, нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, опухоли парашитовидной железы, детский рак, опухоли оболочек периферических нервов, феохромоцитому, опухоли гипофиза, рак предстательной железы, позднюю увеальную меланому, редкие гематологические нарушения, почечный метастатический рак, рабдоидную опухоль, рабдомиосаркому, саркомы, рак кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак желудка, стромальные нарушения, синовиальную саркому, рак яичек, рак тимуса, тимому, метастатический рак щитовидной железы и рак матки (рак шейки матки, рак эндометрия и лейомиому).

[00250] Согласно определенным вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению используют в качестве терапии первой линии и назначают субъектам, которые ранее не получали лечение от ракового состояния. Согласно другим вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению используют для лечения субъектов, которые ранее получали лечение (ЕрСАМ-связывающим белком согласно настоящему изобретению или другим противораковым агентом) и у которых возник рецидив или было установлено, что они невосприимчивы к предыдущему лечению. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению используются для лечения субъектов с рецидивирующими опухолям.

[00251] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок, как описано в настоящем документе, включая мультиспецифический

белок, CAR или ProCAR, как описано в настоящем документе, вводят для лечения рака с широко распространенной экспрессией и распространенностью ЕрСАМ, включая без ограничения рак ободочной кишки, рак предстательной железы, нейроэндокринный рак, рак щитовидной железы, рак легкого (как мелкоклеточный, так и немелкоклеточный рак легкого), рак желудка, рак яичников, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, рак желчных протоков и желчного пузыря, рак пищевода, рак молочной железы и все аденокарциномы.

[00252] Согласно некоторым аспектам ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению вводят для лечения пролиферативного нарушения, включающего солидную опухоль, включая без ограничения опухоль надпочечников, печени, почки, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, яичников, шейки матки, матки, пищевода, колоректальную опухоль, опухоль предстательной железы, поджелудочной железы, легкого (как мелкоклеточный, так и немелкоклеточный рак легкого), щитовидной железы, карциномы, саркомы, глиобластомы и различные опухоли головы и шеи.

[00253] Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению вводят субъекту, страдающему меланомой. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению применяют для диагностики, контроля, лечения или профилактики меланомы. В контексте настоящего изобретения термин «меланома» включает все типы меланом, включая без ограничения первичную меланому, злокачественную меланому, меланому кожи, внекожную меланому, поверхностную распространяющуюся меланому, полипоидную меланому, меланокарциному, меланобластому, меланосаркомы, меланому in situ, узелковую злокачественную меланому, меланому типа злокачественного лентиго, лентигинозную меланому, лентигинозную злокачественную меланому, лентигинозную меланому слизистых оболочек, меланому слизистых оболочек, акральную лентигинозную меланому, меланому мягких тканей, меланому глаза, агрессивную меланому, синдром семейных атипичных родинок и меланомы (FAM-M), десмопластическую злокачественную меланому или увеальную меланому.

[00254] Согласно некоторым вариантам осуществления возможные показания для введения ЕрСАМ-связывающих белков согласно настоящему изобретению или фармацевтических композиций, содержащих их, представляют собой опухолевые заболевания, особенно эпителиальный рак/карциномы, такие как рак молочной железы, рак ободочной кишки, рак предстательной железы, рак головы и шеи, рак кожи, рак мочеполовых путей, например, рак яичников, рак эндометрия, рак шейки матки и рак почки,

рак легкого, рак желудка, рак тонкого кишечника, рак печени, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, рак желчного протока, рак пищевода, рак слюнных желез и рак щитовидной железы. Согласно некоторым вариантам осуществления введение ЕpСAM-связывающих белков согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей их, показано при минимальном остаточном заболевании, таком как ранняя солидная опухоль, запущенная солидная опухоль или метастатическая солидная опухоль, которая характеризуется локальным и нелокальным рецидивированием опухоли, вызванным выживанием единичных клеток.

[00255] Согласно выбранным аспектам ЕpСAM-связывающие белки согласно настоящему изобретению включают в химерные антигенные рецепторы (CAR), и ЕpСAM CAR вводят при терапии на основе CAR, эффективной для лечения рака, такого как эпителиальный рак/карциномы, как например, рак молочной железы, рак ободочной кишки, рак предстательной железы, рак головы и шеи, рак кожи, рак мочевого пузыря, например, рак яичников, рак эндометрия, рак шейки матки и рак почек, рак легкого, рак желудка, рак тонкого кишечника, рак печени, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, рак пищевода, рак слюнных желез и рак щитовидной железы, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (например, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого или плоскоклеточный мелкоклеточный рак легкого) и крупноклеточная нейроэндокринная карцинома (LCNEC).

[00256] Химерный антигенный рецептор, как правило, представляет собой искусственно сконструированный гибридный белок или полипептид, содержащий или включающий антигенсвязывающий домен антитела, связанный с сигнальным доменом (например, домены передачи сигналов Т-клеток или активации Т-клеток). Согласно некоторым вариантам осуществления CAR, содержащие ЕpСAM-связывающий белок согласно настоящему изобретению, обладают способностью перенаправлять специфичность и реактивность сенсibilизированных лимфоцитов (например, Т-клеток) на ЕpСAM-положительные клетки-мишени не ограниченным по МНС образом, путем использования антигенсвязывающих свойств антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Неограниченное по МНС распознавание антигена приводит к способности Т-клеток, экспрессирующих ЕpСAM CAR, распознавать канцерогенные ЕpСAM независимо от процессинга антигена, таким образом, обходя основной механизм ускользания опухоли. Более того, при экспрессии в Т-клетках, CAR преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR).

[00257] Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые ЕpСAM-связывающие белки вводят трудно поддающимся лечению пациентам (т.е. тем, у кого

болезнь рецидивирует в ходе или вскоре после завершения курса начальной терапии), чувствительным пациентам (т.е. тем, у кого рецидив продолжается более 2-3 месяцев после первичной терапии) или пациентам, проявляющим резистентность к агенту на основе платины (например, карбоплатину, цисплатину, оксалиплатину) и/или таксану (например, доцетакселу, паклитакселу, ларотакселу или кабазитакселу). Согласно другому варианту осуществления описанные терапии с ЕрСAМ CAR эффективны при лечении рака яичников, включая серозную карциному яичников и серозно-папиллярную карциному яичников.

[00258] Согласно другому варианту осуществления ЕрСAМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению, ЕрСAМ CAR или ЕрСAМ-сенситизированные лимфоциты или любую их комбинацию применяют в поддерживающей терапии для уменьшения или устранения вероятности рецидива опухоли после первоначального проявления болезни. В некоторых случаях заболевание было вылечено, и начальная масса опухоли была устранена, уменьшена или улучшена иным образом, поэтому у пациента нет симптомов или наступает ремиссия. В таком случае субъекту вводят фармацевтически эффективные количества описанных ЕрСAМ-связывающих белков согласно настоящему изобретению, ЕрСAМ CAR или ЕрСAМ-сенситизированных лимфоцитов или любую их комбинацию один или более раз, независимо от того, есть ли незначительные признаки заболевания или нет признаков заболевания, определенных с использованием стандартных диагностических процедур. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСAМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению, ЕрСAМ CAR или ЕрСAМ-сенситизированные лимфоциты или любую их комбинацию вводят согласно регулярной схеме в течение определенного периода времени, например, еженедельно, каждые две недели, ежемесячно, каждые шесть недель, каждые два месяца, каждые три месяца, каждые шесть месяцев или ежегодно, например, для уменьшения вероятности рецидива заболевания. Более того, такое лечение согласно некоторым вариантам осуществления продолжается в течение недель, месяцев, лет или даже бесконечно, в зависимости от реакции пациента и клинических и диагностических параметров.

[00259] Согласно еще другим вариантам осуществления ЕрСAМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению, ЕрСAМ CAR или ЕрСAМ-сенситизированные лимфоциты или любую их комбинацию применяют для профилактики или в качестве адъювантной терапии для предотвращения или уменьшения возможности метастазирования опухоли после процедуры удаления опухоли. В контексте настоящего изобретения «процедура удаления опухоли» означает любую процедуру, методику или способ, который устраняет, уменьшает, лечит или облегчает опухоль или пролиферацию опухоли. Примеры процедур удаления опухоли включают без ограничения

хирургическое вмешательство, лучевую терапию (т.е. направленное излучение), химиотерапию, иммунотерапию или резекцию. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающие белки согласно настоящему изобретению, ЕрСАМ CAR или ЕрСАМ-сенсibilизированные лимфоциты или любую их комбинацию вводят в подходящее время, как предполагается клиническими, диагностическими или лечебно-диагностическими процедурами, для уменьшения метастаз опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления режим дозирования сопровождается соответствующими методами диагностики или мониторинга, которые позволяют его модифицировать.

[00260] Согласно еще другим вариантам осуществления настоящее изобретение относится к введению ЕрСАМ-связывающего белка согласно настоящему изобретению, ЕрСАМ CAR или ЕрСАМ-сенсibilизированных лимфоцитов или любой их комбинации субъектам, у которых нет симптомов, но есть риск развития пролиферативного нарушения. То есть согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок согласно настоящему изобретению, ЕрСАМ CAR или ЕрСАМ-сенсibilизированные лимфоциты или любую их комбинацию используют в профилактических целях и назначаются пациентам, которые были обследованы или исследованы и имеют один или более отмеченных факторов риска (например, геномные признаки, семейный анамнез, результаты тестов *in vivo* или *in vitro* и т.д.), но неоплазия не развилась. В таких случаях специалисты в данной области техники смогут определить эффективный режим дозирования путем эмпирического наблюдения или общепринятой клинической практики.

[00261] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, описанных в настоящем документе, ЕрСАМ-связывающие белки или композиции, как описано в настоящем документе, вводят в комбинации с агентом для лечения конкретного заболевания, нарушения или состояния. Агенты включают без ограничения терапии, включающие антитела, небольшие молекулы (например, химиотерапевтические средства), гормоны (стероидные, пептидные и тому подобное), радиотерапии (γ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленная доставка радиоизотопов, микроволны, УФ-излучение и тому подобное), генные терапии (например, антисмысловая, ретровирусная терапия и тому подобное) и другие иммунотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок, как описано в настоящем документе, вводят в комбинации с противодиарейными агентами, противорвотными агентами, анальгетиками, опиоидами и/или нестероидными противовоспалительными агентами. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок, как описано в настоящем документе, вводят в комбинации с противораковыми агентами. Неограничивающие примеры противораковых агентов, которые можно применять согласно различным вариантам осуществления

настоящего изобретения, включая фармацевтические композиции и лекарственные формы, и наборы согласно настоящему изобретению, включают: активин, акларубин, акозадола гидрохлорид, акронин, адозелезин, альдеслейкин, алтретамин, амбомицин, аметантрона ацетат, аминоглутетимид, амсакрин, анастрозол, антрамицин, аспарагиназу, асперлин, азацитидин, азатепу, азотомидин, батимастат, бензодепу, бикалутамид, бисантрен гидрохлорид, биснафида димезилат, бизелезин, блеомицина сульфат, бреквинар натрия, бропиримин, бисульфат, сактиномицин, калустерон, карацемид, карбетимер, карбоплатин, кармустин, карубицина гидрохлорид, карзелезин, цедефингол, хлорамбуцил, циролемицин, цисплатин, кладрибин, криснатола мезилат, циклофосфамид, цитарабин, декарбазин, дактиномицин, даунорубин гидрохлорид, децитабин, дексормаплатин, дезагуанин, дезагуанина мезилат, диазиквон, доцетаксел, доксорубин, доксорубина гидрохлорид, дролоксифен, дролоксифена цитрат, дромостанолон пропионат, даузомицин, эдатрексат, эфлорнитина гидрохлорид, элсамитруцин, энлоплатин, энпромаст, эпипропидин, эпирубина гидрохлорид, эрбулозол, эзорубина гидрохлорид, эстрамустин, эстрамустина натрия фосфат, этанидозол, этопзид, этопзида фосфат, этоприн, фадрозола гидрохлорид, фазарабин, фенретинид, флоксуридин, флударабина фосфат, фторурацил, флуорцитабин, фосквидон, фостриecin натрия, гемцитабин, гемцитабина гидрохлорид, гидроксимочевину, идарубина гидрохлорид, ифосфамид, илмофозин, интерлейкин II (включая рекомбинантный интерлейкин II или $gIL2$), интерферон альфа-2a, интерферон альфа-2b, интерферон альфа-n1, интерферон альфа-n3, интерферон бета-I a, интерферон гамма-I b, ипроплатин, иринотекана гидрохлорид, ланреотида ацетат, лектрозол, леупролида ацетат, лиарозола гидрохлорид, лометаксол натрия, ломустин, лозоксантрона гидрохлорид, мазопрокол, майтанзин, мехлорэтамид гидрохлорид, магестрола ацетат, меленгестрола ацетат, мелфалан, меногарил, меркаптопурин, метотрексат, метотрексат натрия, метоприн, метуредепу, митиндомид, митокарцин, митокромин, митогиллин, митомалцин, митомицин, митоспер, митотан, митоксантрона гидрохлорид, микофеноловую кислоту, нокодазол, ногаламицин, ормаплатин, оксисуран, паклитаксел, пегаспаргазу, пелиомицин, пентамустин, пепломицина сульфат, перфосфамид, пипоброман, пипосульфат, пироксантрона гидрохлорид, пликамицин, пломестан, порфимер натрия, порфирамицин, преднемустин, прокарбазина гидрохлорид, пуромидин, пуромидина гидрохлорид, пиразофуридин, рибоприн, роглетимид, сафингол, сафингола гидрохлорид, семустин, симтразен, спарфосат натрия, спарсомицин, спирогермания гидрохлорид, спиромустин, спироплатин, стрептонигрин, стрептозоцин, сулофенур, тализомицин,

текогалан натрия, тегафур, телоксантрона гидрохлорид, темопорфин, тенипозид, тероксирон, тестолактон, тиамиприн, тиогуанин, тиотепу, тиазофурин, тирапазамин, торемифена цитрат, трестолона ацетат, трицирибина фосфат, триметрексат, триметрексата глюкуронат, трипторелин, тубулозола гидрохлорид, иприт урацила, уредепу, вапреотид, вертепорфин, винбластина сульфат, винкристина сульфат, виндезин, виндезина сульфат, винепидина сульфат, винглицината сульфат, винлеурозина сульфат, винорелбина тартрат, винзолидина сульфат, винзолидина сульфат, ворозол, зениплатин, зиностатин, зорубицина гидрохлорид. Другие примеры проитвораковых лекарственных средств включают без ограничения 20-эпи-1,25-дигидроксивитамин D3, 5-этинилурацил, абиратерон, акларубицин, ацилфулвен, адеципенол, адозелезин, альдеслейкин, антагонисты ALL-TK, алтретамин, амбамустин, амидокс, амифостин, аминоклевулиновую кислоту, амрубицин, амсакрин, анагрелид, анастрозол, андрографолид, ингибиторы ангиогенеза, антагонист D, антагонист G, антареликс, антидорсализирующий морфогенетический белок-1, антиандроген, средство против карциномы предстательной железы, антиэстроген, антинеопластон, антисмысловые олигонуклеотиды, афидиколина глицинат, модуляторы генов апоптоза, регуляторы апоптоза, апуриновую кислоту, ага-CDP-DL-РТВА, аргининдезаминазу, асулакрин, атаместан, атримустин, аксинастатин 1, аксинастатин 2, аксинастатин 3, азастерон, азатоксин, азатирозин, производные баккатина III, баланол, батимастат, антагонисты BCR/ABL, бензохлорин, бензоилстауроспорин, бета-лактамы производные, бета-алетин, бетакламицин В, бетулиновую кислоту, ингибитор bFGF, бикалутамид, бисантрен, бисазиридинилспермин, биснафид, бистратен А, бизелезин, брефлат, бропиримин, будотитан, бутионин сульфоксимин, кальципотриол, кальфостин С, производные камптотецина, канарипокс IL-2, капецитабин, карбоксамид-амино-триазол, карбоксиамидотриазол, CaRest M3, CARN 700, образованный из хряща ингибитор, карзелезин, ингибиторы казеинкиназы (ICOS), кастаноспермин, цекропин В, цетрореликс, хлорины, хлорхиноксалина сульфонамид, цикапрост, цис-порфирин, кладрибин, аналоги кломифена, клотримазол, коллисмидин А, коллисмидин В, комбретастатин А4, аналог комбретастатина, конагенин, крамбесцидин 816, криснатол, криптофицин 8, производные криптофицина А, курацин А, циклопентантрахиноны, циклоплатам, ципемидин, цитарабина оксфосфат, цитолитический фактор, цитостатин, дакликсимаб, децитабин, дегидродидемнин В, деслорелин, дексаметазон, дексифосфамид, дексразоксан, дексверапамил, диазиквон, дидемнин В, дидокс, диэтилнормспермин, дигидро-5-азациитидин, дигидротаксол, 9-,

диоксамицин, дифенилспиромустин, доцетаксел, доказанол, долазетрон, доксифлуридин, доксорубицин, дролоксифен, дронабинол, дуокармицин SA, эбселен, эномустин, эдельфозин, эдреколомаб, эфлорнитин, элемен, эмитефур, эпирубицин, эпистерид, аналог эстрамустина, агонисты эстрогена, антагонисты эстрогена, этанидазол, этопзида фосфат, экземестан, фадрозол, фазарабин, фенретинид, филграстим, финастерид, флавопиридол, флезеластин, флуастерон, флударабин, флуородаунорубицина гидрохлорид, форфенимекс, форместан, фостриecin, фотемустин, гадолиний тексафирин, нитрат галлия, галоцитабин, ганиреликс, ингибиторы желатиназы, гемцитабин, ингибиторы глутатиона, гепсульфам, херегулин, гексаметилен бисацетамид, гиперидин, ибандроновую кислоту, идарубицин, идоксифен, идрамантон, илмофозин, иломастат, имидазоакридоны, имиквимод, иммуностимулирующие пептиды, ингибитор рецептора для инсулиноподобного фактора роста-1, агонисты интерферона, интерфероны, интерлейкины, иобенгуан, йододоксорубицин, ипомеанол, 4-, ироплакт, ирсогладин, изобенгазол, изогомохаликондрин В, итасетрон, ясплакинолид, кагалалид F, ламелларин-N триацетат, ланреотид, леинамицин, ленограстим, лентинана сульфат, лептолстатин, лектрозол, ингибирующий лейкоз фактор, лейкоцитарный альфа-интерферон, леупролид + эстроген + прогестерон, леупрорелин, левамизол, лиарозол, линейный аналог полиамина, липофильный пептид с дисахаридом, липофильные соединения платины, лиссоклинамид 7, лобаплатин, ломбрицин, лометрексол, лонидамин, лозоксантрон, лингибитор редуктазы HMG-CoA (включая без ограничения ловастатин, правастатин, флувастатин, статин, симвастатин и аторвастатин), локсорибин, луртотекан, тексафирин лютеция, лизофиллин, литические пептиды, майтанзин, манностатин А, маримастат, мазопротект, маспин, ингибиторы матрилизина, ингибиторы матриксной металлопротеиназы, меногарил, мербарон, метерелин, метиониназу, метоклопрамид, ингибитор MIF, мифепристон, милтефозин, миримостим, ошибочно двухнитиевая РНК, митогуазон, митолактол, аналоги митомицина, митонафид, митотоксин фибробластный фактор роста-сапорин, митоксантрон, мофаротен, молграмостим, моноклональное антитело, хорионический гонадотропин человека, монофосфориллипид A+sk клеточной стенки микобактерий, мопидамол, ингибитор резистентности гена против множества лекарственных средств, терапия на основе мультиопухолевого супрессора 1, средство против злокачественной опухоли на основе иприта, микапероксид В, экстракт клеточной стенки микобактерий, мириапорон, N-ацетилдиналин, N-замещенные бензамиды, нафарелин, нагрестип, налоксон + пентазоцин, напавин, нафтерпин, нартограстим, недаплатин, неморубицин,

неридроновую кислоту, нилутамид, низамицин, модуляторы оксида азота, нитроксидный антиоксидант, нитруллин, O⁶-бензилгуанин, октреотид, окиценон, олигонуклеотиды, онапристон, ондансетрон, орацин, пероральный индуктор цитокинов, ормаплатин, осатерон, оксалиплатин, оксауномицин, паклитаксел, аналоги паклитаксела, производные паклитаксела, палауамин, пальмитоилризоксин, памидроновую кислоту, панакситриол, паномифен, парабактин, пазеллиптин, пегаспаргазу, пелдезин, пентосан полисульфат натрия, пентостатин, пентрозол, перфлуброн, перфосфамид, периллиловый спирт, феназиномицин, фенилацетат, ингибиторы фосфатазы, пицибанил, пилокарпина гидрохлорид, пирарубицин, пиритрексим, плацетин А, плацетин В, ингибитор активатора плазминоген, комплекс платины, соединения платины, комплекс платина-триамин, порфимер натрия, порфирамицин, преднизон, пропил бис-акридон, простагландин J2, ингибиторы протеасом, иммуномодуляторы на основе белка А, ингибитор протеинкиназы С, ингибиторы протеинкиназы С, микроалгал, ингибиторы протеинтирозинфосфатазы, ингибиторы пуриннуклеозидфосфорилазы, пурпурины, пиразолоакридин, конъюгат пиридоксильированного гемоглобина и полиоксиэтилена, антагонисты raf, ралтитрексед, рамосетрон, ингибиторы фарнезилпротеинтрансферазы ras, ингибиторы ras, ингибитор ras-GAP, демителированный ретеллиптин, рений Re 186 этидронат, ризоксин, рибозимы, RII ретинамид, рохитукин, ромуртид, роквинимекс, рубигинон B1, рубоксил, сафингол, саинтопин, SarCNU, саркофитол А, сарграмостим, миметики Sdi 1, семустин, образующийся при старении ингибитор 1, смысловые олигонуклеотиды, ингибиторы передачи сигнала, сизофиран, собузоксан, борокаптит натрия, фенилацетат натрия, солверол, соматомедин-связывающий белок, сонермин, спарфозовую кислоту, спирамицин D, спиромусцин, спленопентин, спонгистатин 1, скваламин, ингибитор стволовых клеток, ингибитор деления стволовых клеток, стрипиамид, ингибиторы стромелизина, сульфинозин, антагонист суперактивного вазоактивного кишечного пептида, сурадисту, сурамин, сваинсонин, таллимустин, тамоксифена метйодид, тауромустин, тазаротен, текогалан натрия, тегафур, теллурапирилий, ингибиторы телогеразы, темопорфин, тенипозид, тетрахлордекаоксид, тетразомин, талибластин, тиокоралин, тромбопоэтин, миметик тромбопоэтин, тималфазин, агонист рецептора для тимопоэтина, тимоотринан, тиреостимулирующий гормон, этилэтиопурпурин олова, тирапазамин, титаноцена бихлорид, топсентин, торемифен, фактор тотипотентных стволовых клеток, ингибиторы трансляции, третиноин, триацетилюридин, трицирибин, триметрексат, трипторелин, трописетрон, туростерид, ингибиторы тирозинкиназы, тирфостины,

ингибиторы UBC, убенимекс, происходящий из уrogenитального синуса ингибиторный фактор, антагонисты рецептора для урокиназы, вапреотид, вариолин В, векторная система, эритроцитная генная терапия, веларесол, верамин, вердины, вертепорфин, винорелбин, винксалтин, витаксин, ворозол, занотерон, зениплатин, зиласкорб и зиностатин стималамер. Дополнительными противораковыми лекарственными средствами являются 5-флуороурацил и лейковорин. Эти два агента являются особенно полезными при применении в способах, в которых применяется талидомид и ингибитор топоизомеразы. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с гемцитабином. Согласно некоторым вариантам осуществления ЕрСАМ-связывающий белок, как описано в настоящем документе, вводят до, в ходе или после хирургического вмешательства.

Способы обнаружения экспрессии ЕрСАМ и диагностики ЕрСАМ-ассоциированного рака

[00262] Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к наборам для обнаружения экспрессии ЕрСАМ *in vitro* или *in vivo*. Наборы включают вышеупомянутый ЕрСАМ-связывающий белок (например, ЕрСАМ-связывающий белок, содержащий меченное анти-ЕрСАМ однодоменное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты) и одно или более соединений для обнаружения метки. Согласно некоторым вариантам осуществления метка выбрана из группы, состоящей из флуоресцентной метки, ферментной метки, радиоактивной метки, активной метки ядерного магнитного резонанса, люминесцентной метки и хромофорной метки.

[00263] В некоторых случаях экспрессию ЕрСАМ обнаруживают в биологическом образце. Образец может быть любым образцом, включая без ограничения ткань из биопсийных, аутопсийных и патологических образцов. Биологические образцы также включают срезы тканей, например, замороженные срезы, взятые для гистологических целей. Биологические образцы также включают жидкости организма, такие как кровь, сыворотка, плазма, мокрота, спинномозговая жидкость или моча. Биологический образец обычно получают у млекопитающего, такого как человек или примат, не относящийся к человеку.

[00264] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу определения наличия у субъекта рака путем контактирования образца, взятого у субъекта, с анти-ЕрСАМ однодоменным антителом, как раскрыто в настоящем документе, и обнаружения связывания однодоменного антитела с образцом. Увеличение

связывания антитела с образцом по сравнению со связыванием антитела с контрольным образцом указывает на то, что субъект страдает раком.

[00265] Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу подтверждения диагноза рак у субъекта путем контактирования образца, взятого у субъекта, у которого диагностирован рак, с анти-ЕрСАМ однодоменным антителом, как описано в настоящем документе, и обнаружения связывания антитела с образцом. Увеличение связывания антитела с образцом по сравнению со связыванием антитела с контрольным образцом подтверждает диагноз рак у субъекта.

[00266] В некоторых примерах раскрытых способов ЕрСАМ однодоменное антитело непосредственно мечено. В некоторых примерах способы дополнительно предусматривают контактирование второго антитела, которое специфически связывает анти-ЕрСАМ однодоменное антитело, с образцом и обнаружение связывания второго антитела. Увеличение связывания второго антитела с образцом по сравнению со связыванием второго антитела с контрольным образцом обнаруживает рак у субъекта или подтверждает диагноз рак у субъекта. В некоторых случаях рак представляет собой нейроэндокринный рак, рак предстательной железы, рак легких, рак желудка, плоскоклеточную карциному, рак поджелудочной железы, холангиокарциному, тройной негативный рак молочной железы или рак яичников (например, эпителиальный рак яичников) или любой другой тип рака, который экспрессирует ЕрСАМ. В некоторых примерах контрольный образец представляет собой образец, взятый у субъекта, не страдающего раком. В конкретных примерах образец представляет собой образец крови или ткани.

[00267] В некоторых случаях антитело, которое связывает (например, специфически) ЕрСАМ, непосредственно мечено обнаруживаемой меткой. Согласно другому варианту осуществления антитело, которое связывается (например, специфически связывает) ЕрСАМ (первое антитело), немечено, а помечено второе антитело или другая молекула, которая может связывать антитело, которое специфически связывает ЕрСАМ. Второе антитело выбирают так, чтобы оно могло специфически связываться с конкретным видом и классом первого антитела. Например, если первое антитело представляет собой IgG ламы, то вторичное антитело может представлять собой анти-IgG ламы. Другие молекулы, которые могут связываться с антителами, включают без ограничения белок А и белок G, оба из которых коммерчески доступны. Подходящие метки для антитела или вторичного антитела описаны выше и включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, магнитные агенты и радиоактивные материалы. Неограничивающие примеры подходящих ферментов

включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу. Неограничивающие примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин. Неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин. Неограничивающим иллюстративным люминесцентным материалом является люминол, неограничивающим примером магнитного агента является гадолиний, и неограничивающие иллюстративные радиоактивные метки включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H .

[00268] Согласно альтернативному варианту осуществления ЕрСАМ можно анализировать в биологическом образце с помощью конкурентного иммуноанализа с использованием стандартов ЕрСАМ, меченных обнаруживаемым веществом, и немеченого антитела, которое специфически связывает ЕрСАМ. В этом анализе биологический образец, меченые стандарты ЕрСАМ и антитело, которое специфически связывается с ЕрСАМ, объединяют и определяют количество меченого стандарта ЕрСАМ, связанного с немеченым антителом. Количество ЕрСАМ в биологическом образце обратно пропорционально количеству меченого стандарта ЕрСАМ, связанного с антителом, которое специфически связывает ЕрСАМ.

[00269] Раскрытые в настоящем документе иммуноанализы и способ можно использовать для ряда целей. Согласно одному варианту осуществления антитело, которое специфически связывается с ЕрСАМ, можно использовать для обнаружения продукции ЕрСАМ в клетках в клеточной культуре. Согласно другому варианту осуществления антитело можно использовать для определения количества ЕрСАМ в биологическом образце, таком как образец ткани, или образец крови, или образец сыворотки. В некоторых примерах ЕрСАМ представляет собой ЕрСАМ клеточной поверхности. В других примерах ЕрСАМ представляет собой растворимый ЕрСАМ (например, ЕрСАМ в супернатанте клеточной культуры или растворимый ЕрСАМ в образце жидкости тела, таком как образец крови или сыворотки).

[00270] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к набору для обнаружения ЕрСАМ в биологическом образце, таком как образец крови или образец ткани. Например, для подтверждения диагноза рак у субъекта может быть проведена биопсия для получения образца ткани для гистологического исследования. В качестве альтернативы можно получить образец крови для обнаружения присутствия растворимого белка ЕрСАМ или его фрагмента. Наборы для обнаружения полипептида обычно содержат однодоменное антитело согласно настоящему изобретению, которое

специфически связывается с ЕpСAМ. Согласно некоторым вариантам осуществления в набор включен фрагмент антитела, такой как фрагмент scFv, домен VH или Fab. Согласно еще одному варианту осуществления антитело является меченым (например, флуоресцентной, радиоактивной или ферментативной меткой).

[00271] Согласно одному варианту осуществления набор включает инструкции, раскрывающие средства применения антитела, которое связывает ЕpСAМ. Инструкции могут быть в письменном виде, в электронной форме (например, на компьютерной дискете или компакт-диске), могут быть визуальными (например, видеофайлы) или предоставлены посредством электронной сети, например, посредством интернета, World Wide Web, интранета или другой сети. Наборы могут также включать дополнительные компоненты для облегчения конкретного применения, для которого разработан набор. Таким образом, например, набор может дополнительно содержать средства обнаружения метки (такие как ферментные субстраты для ферментативных меток, наборы фильтров для обнаружения флуоресцентных меток, соответствующие вторичные метки, такие как вторичные антитела, и т.п.). Наборы могут дополнительно включать буферы и другие реагенты, обычно используемые для осуществления на практике конкретного способа. Такие наборы и соответствующее содержимое хорошо известны специалистам в данной области техники.

[00272] Согласно одному варианту осуществления в диагностический набор входит иммуноанализ. Хотя детали иммуноанализов могут варьироваться в зависимости от конкретного используемого формата, способ обнаружения ЕpСAМ в биологическом образце обычно предусматривает стадии контактирования биологического образца с антителом, которое специфически реагирует в иммунологически реактивных условиях с полипептидом ЕpСAМ. Антитело специфически связывается в иммунологически реактивных условиях с образованием иммунного комплекса, и присутствие иммунного комплекса (связанного антитела) обнаруживают прямо или косвенно.

[00273] Способы определения наличия или отсутствия маркера клеточной поверхности хорошо известны в данной области техники. Например, антитела могут быть конъюгированы с другими соединениями, включая без ограничения ферменты, магнитные шарики, коллоидные магнитные шарики, гаптены, флуорохромы, соединения металлов, радиоактивные соединения или лекарственные средства. Антитела также можно использовать в иммуноанализах, таких как без ограничения радиоиммуноанализы (РИА), ELISA или иммуногистохимические анализы. Антитела также можно использовать для сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). FACS использует множество цветовых каналов, каналы обнаружения малоуглового и тупоугольного светорассеяния и

каналы импеданса, среди других более сложных уровней обнаружения, для разделения или сортировки клеток. См. патент США № 5061620). В этих анализах можно использовать любые однодоменные антитела, которые связывают ЕРСАМ, как раскрыто в настоящем документе. Таким образом, антитела можно использовать в обычном иммуноанализе, включая без ограничения, ELISA, RIA, FACS, тканевую иммуногистохимию, вестерн-блоттинг или иммунопреципитацию.

Примеры

Пример 1. Скрининг библиотеки фагового дисплея для идентификации ЕРСАМ-связывающих доменов

[00274] Лам иммунизировали очищенным белком ЕРСАМ, экспрессированным в клетках Expi293. Библиотеку фагового дисплея для экспрессии переменных доменов тяжелой цепи антитела конструировали из циркулирующих В-клеток. См. an der Linden , de Geus , Stok , Bos ,van Wassenaar, Verrips, and Frenken. 2000. J Immunol Methods 240:185–195. Фаговые клоны подвергали скринингу на связывание с ЕРСАМ путем экспрессии анти-ЕРСАМ белков в *E. coli*, получения периплазматических экстрактов, и белки подвергали скринингу на активность связывания с ЕРСАМ человека и яванских макак с использованием колориметрического анализа ELISA. Идентифицировали тридцать восемь уникальных последовательностей только тяжелых цепей (SEQ ID NO: 1 - 38), которые давали сигнал при скрининге ELISA относительно контроля с белками ЕРСАМ человека и/или яванских макак (как показано в **таблице 2**). Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 для этих переменных доменов тяжелых цепей представляют собой, соответственно, SEQ ID NO: 39–76, SEQ ID NO: 77–114 и SEQ ID NO: 115–152.

[00275] **Таблица 2. Связывание анти-ЕРСАМ человека однодоменных антител ламы, содержащих только тяжелую цепь, с ЕРСАМ человека и яванских макак, как определено посредством сигнала в анализе ELISA (показания поглощения в колориметрическом анализе ELISA), относительно контрольных однодоменных антител против только тяжелой цепи**

Название последовательности	ELISA ЕРСАМ человека	ELISA ЕРСАМ яванских макак	ELISA контроля	ЕРСАМ человека/ контроль	ЕРСАМ яванских макак/ контроль
EPL90	1,6	1,7	0,2	10	10

Название последова- тельности	ELISA ЕрСAM человека	ELISA ЕрСAM яванских макак	ELISA контроля	ЕрСAM человека/ контроль	ЕрСAM яванских макак/ контроль
EPL118	3,4	2,9	0,7	5	4
EPL138	3,1	2,7	0,9	3	3
EPL145	0,6	0,4	0,2	3	2
EPL164	0,6	2,8	0,1	7	34
EPL31	0,6	0,5	0,1	7	6
EPL55	0,4	0,6	0,1	5	7
EPL57	1,7	3,4	0,1	14	27
EPL136	0,9	1,3	0,1	9	13
EPL15	0,7	3,2	0,1	8	35
EPL34	0,9	3,1	0,1	10	36
EPL86	0,8	3,0	0,1	8	31
EPL153	3,1	2,2	0,1	31	21
EPL20	2,9	2,2	0,5	6	4
EPL70	3,2	2,2	0,1	24	16
EPL125	3,5	3,5	0,5	8	8
EPL13	2,9	4,0	0,2	17	23
EPL129	2,0	3,1	0,1	20	29
EPL159	0,4	0,2	0,1	3	2
EPL120	3,2	2,3	0,6	5	4
EPL126	3,4	2,8	0,7	5	4
EPL60	1,1	3,5	0,1	10	33
EPL156	3,6	4,0	0,2	16	17
EPL2	2,2	3,6	0,1	15	24
EPL43	1,8	3,8	0,1	13	27
EPL10	2,7	2,0	0,2	12	9
EPL49	1,1	0,6	0,1	8	4
EPL58	1,1	0,5	0,1	8	4
EPL74	1,4	0,7	0,1	10	5
EPL78	3,1	2,0	0,2	17	11
EPL82	0,9	1,1	0,2	4	5

Название последовательности	ELISA ЕрСAM человека	ELISA ЕрСAM яванских макак	ELISA контроля	ЕрСAM человека/ контроль	ЕрСAM яванских макак/ контроль
EPL83	2,0	1,1	0,6	3	2
EPL97	2,5	1,7	0,3	8	5
EPL109	0,4	0,1	0,1	5	2
EPL117	0,9	0,6	0,2	4	3
EPL127	0,4	0,9	0,1	5	11
EPL152	3,4	2,8	0,8	4	4
EPL189	1,3	0,9	0,1	12	8

Пример 2. Включение ЕрСAM-связывающих однодоменных антител, содержащих только тяжелую цепь, в слитые белки и анализ зависимой от Т-клеток клеточно-опосредованной цитотоксичности

[00276] Отобранные анти-ЕрСAM однодоменные антитела, содержащие только тяжелую цепь, из Примера 1 клонировали в конструкции ДНК для экспрессии рекомбинантных белков. Все эти экспрессионные конструкции кодировали сигнальный пептид. Один набор анти-ЕрСAM конструкций (SEQ ID NO 153-179) разрабатывали для экспрессии слитого белка с гуманизированным анти-CD3 scFv доменом на N-конце зрелого секретированного слитого белка, за которым следует анти-ЕрСAM домен ламы, с двумя доменами, связанными последовательностью GGGSGGGS, и с НННННН на С-конце. Второй набор анти-ЕрСAM (SEQ ID NO 180-206) разрабатывали для экспрессии слитого белка с анти-ЕрСAM доменом ламы на N-конце зрелого секретлируемого слитого белка, за которым следует гуманизированный анти-CD3-scFv домен, с двумя доменами, связанными последовательностью GGGSGGGS, и с НННННН на С-конце.

[00277] Эти конструкции анти-ЕрСAM/анти-CD3 (от N-конца к С-концу) или анти-CD3/анти-ЕрСAM (от N-конца к С-концу) слитых белков трансфицировали в клетки Ехр1293. Количество слитого белка анти-ЕрСAM/анти-CD3 в кондиционированной среде из трансфицированных клеток Ехр1293 определяли количественно с использованием устройства Octet со стрептавидином и загружали в качестве стандарта биотинилированным слитым белком CD3-Fc с использованием анти-CD3 слитого белка с подобной молекулярной массой по сравнению с анти-ЕРСAM/анти-CD3 белками.

[00278] Кондиционированные среды тестировали в анализе зависимой от Т-клеток клеточно-опосредованной цитотоксичности. См. Nazarian AA, Archibeque IL, Nguyen YH, Wang P, Sinclair AM, Powers DA. 2015. J Biomol Screen. 20:519-27. В этом анализе меченные люциферазой клетки NCI-H508, которые экспрессируют ЕpСAM, объединяли с очищенными человеческими Т-клетками и титровали анти-ЕpСAM/анти-CD3 или анти-CD3/анти-ЕpСAM слитый белок. Была выдвинута гипотеза, что если слитый белок направляет Т-клетки на уничтожение клеток NCI-H508, сигнал в анализе люциферазы, проводимом через 48 часов после начала эксперимента, должен уменьшаться. На **Фиг.1-4** приведены данные TDCC в графическом формате.

[00279] Значения EC_{50} из анализов TDCC перечислены в **Таблице 3** (перечислены данные EC_{50} для SEQ ID NO 153-179) и в **Таблице 4** (перечислены данные EC_{50} для SEQ ID NO 180-206). Наиболее эффективная молекула (EPL13) имела значение EC_{50} около 1,6 пМ. Некоторые из анти-ЕpСAM-связывающих белков были активны только тогда, когда присутствовали в анти-CD3/анти-ЕpСAM конфигурации. Одна анти-ЕpСAM последовательность, EPL34, была активна только в анти-ЕpСAM/анти-CD3 конфигурации. Отрицательным контролем для тестов TDCC был анти-GFP/анти-CD3 белок, и этот белок не направлял Т-клетки на уничтожение клеток NCI-H508 (данные не показаны).

[00280] **Таблица 3. Значения EC_{50} для Т-клеток, перенаправленных на уничтожение клеток NCI-H508 анти-CD3/анти-ЕpСAM белками, содержащими анти-ЕpСAM последовательности ламы (n/a= недостаточная активность для вычисления EC_{50} при использовании протестированных концентраций белков)**

Анти-ЕpСAM последовательность	EC_{50} (М) уничтожения клеток NCI-H508
EPL10	n/a
EPL109	2,2E-09
EPL117	n/a
EPL120	5,8e-010
EPL125	1,3E-09
EPL127	n/a
EPL13	1,6E-12

Анти- ЕрСАМ последова- тельность	ЕС₅₀ (М) уничтожения клеток NCI-H508
EPL136	6,1E-12
EPL138	7,9E-12
EPL145	n/a
EPL152	n/a
EPL153	1,4E-10
EPL156	n/a
EPL164	3,6E-10
EPL189	n/a
EPL2	n/a
EPL20	n/a
EPL34	n/a
EPL49	n/a
EPL58	n/a
EPL74	2,6E-09
EPL78	n/a
EPL82	n/a
EPL83	3,1E-10
EPL86	4,7E-10
EPL90	9,2E-12
EPL97	n/a

[00281] **Таблица 4. Значения ЕС₅₀ для Т-клеток, перенаправленных на уничтожение клеток NCI-H508, посредством анти-ЕрСАМ/анти-CD3 белков, содержащих анти-ЕрСАМ последовательности ламы (недостаточная активность для вычисления ЕС₅₀ при использовании протестированных концентраций белков)**

Анти- ЕрСАМ последова- тельность	EC₅₀ (M) уничтожения клеток NCI- H508
EPL10	n/a
EPL109	n/a
EPL117	n/a
EPL120	n/a
EPL125	n/a
EPL127	n/a
EPL13	1,6E-11
EPL136	1,3E-10
EPL138	n/a
EPL145	n/a
EPL152	n/a
EPL153	нет экспрессии
EPL156	n/a
EPL164	n/a
EPL189	n/a
EPL2	n/a
EPL20	n/a
EPL34	3,7E-10
EPL49	n/a
EPL58	n/a
EPL74	n/a
EPL78	n/a
EPL82	n/a
EPL83	2,1E-11
EPL86	2,7E-10
EPL90	n/a
EPL97	n/a

[00282] Используя кондиционированные среды с известными концентрациями анти-ЕрСАМ/анти-CD3 или анти-CD3/анти-ЕрСАМ слитых белков,

измеряли аффинности связывания слитых белков с белками ЕрсАМ человека и яванских макак. В устройство Octet со стрептавидиновыми наконечниками загружали биотинилированный белок ЕрсАМ человека или яванских макак, и значения K_D вычисляли путем измерения скорости ассоциации и диссоциации связывания анти-ЕрсАМ/анти-CD3 слитых белков или анти-CD3/анти-ЕрсАМ слитых белков с биотинилированными белками ЕрсАМ. Измерения K_D проводили с использованием одной концентрации 50 нМ слитых анти-ЕрсАМ/анти-CD3 или анти-CD3/анти-ЕрсАМ белков, что позволило упорядочить оценку эффективности. Измеренные относительные аффинности перечислены в **Таблице 5**. Все слитые белки связывались с ЕрсАМ яванских макак со значениями K_D в диапазоне от 1,6 до 56 нМ. Было измерено связывание большинства, но не всех слитых белков с ЕрсАМ человека со значениями K_D от 0,8 до 74 нМ.

[00283] Таблица 5. Аффинности связывания анти-ЕрсАМ/Анти-CD3 или анти-CD3/Анти-ЕрсАМ слитых белков, содержащих анти-ЕрсАМ последовательности ламы, для связывания с ЕрсАМ человека и яванских макак

	Анти-CD3 / Анти-ЕрсАМ		Анти-ЕрсАМ / Анти-CD3	
	hu KD (нМ)	cy KD (нМ)	hu KD (нМ)	cy KD (нМ)
Гуманизированное анти-ЕрсАМ связующее				
EPL13	29	13	14	7,6
EPL136	74	56	32	31
EPL138	2,2	2,2	0,8	1,3
EPL153	n/q	3,5	нет экспрессии	
EPL164	3,1	3,6	2,1	2,9
EPL34	n/q	14	n/q	6,4
EPL83	1,1	3	1,6	3
EPL86	n/q	8,3	n/q	7
EPL90	1,9	1,6	0,8	1,2

Пример 3. Гуманизация ЕрСAM-связывающих однодоменных антител, содержащих только тяжелую цепь, и анализ зависимой от Т-клеток клеточно-опосредованной цитотоксичности

[00284] Три последовательности анти-ЕрСAM антител ламы, идентифицированные в Примере 1, гуманизировали посредством прививания их последовательностей CDR на человеческие последовательности зародышевого типа, при этом сохраняя некоторые каркасные последовательности ламы для того, чтобы гарантировать отсутствие потери активности антител (SEQ ID NO 207 - 209).

[00285] Эти последовательности клонировали в экспрессионные конструкции для экспрессии анти-ЕрСAM/анти-CD3 слитых белков (SEQ ID NO 210 - 212) в клетках Ехр1293, как описано в **Примере 2**.

[00286] Количество анти-ЕрСAM/анти-CD3 слитых белков, присутствующих в кондиционированной среде, количественно определяли, как описано в **Примере 2**. Аффинности этих гуманизированных белков в отношении ЕрСAM человека, яванских макак и мышей измеряли как описано в **Примере 2**. Относительные значения K_D , вычисленные на основании этих измерений, перечислены в **Таблице 6**. Все три последовательности связывались с ЕрСAM человека и яванских макак с относительными значениями K_D в интервале от около 0,3 до около 18 нМ. Две из последовательностей также связывались с ЕрСAM мышей со значениями K_D в интервале от около 1,4 до около 1,8 нМ.

[00287] **Таблица 6. Аффинности связывания анти-ЕрСAM/Анти-CD3 слитых белков, содержащих последовательности анти-ЕрСAM ламы, для связывания с ЕрСAM человека, яванских макак и мышей (n/q= не подлежит количественному определению при используемых экспериментальных условиях)**

Гуманизованная анти-ЕрСAM последовательность	ЕрСAM человека (нМ)	ЕрСAM яванских макак (нМ)	ЕрСAM мышей (н)
H13	17	18	n/q
H90	0,3	1,3	1,4
H138	0,3	1,8	1,8

[00288] Эффективность уничтожения для Т-клеток под действием анти-ЕрСАМ/анти-CD3 слитых белков, присутствующих в кондиционированной среде, оценивали, как описано в Примере 2. Результаты приведены в **Таблице 7** и на **Фиг. 5**.

[00289] **Таблица 7. Значения EC_{50} для перенаправленных Т-клеток, уничтожающих клетки NCI-H508, под действием очищенных анти-CD3/анти-ЕрСАМ белков, содержащих гуманизированные анти-ЕрСАМ последовательности**

Гуманизированная анти-ЕрСАМ связывающая последовательность	EC_{50} (пМ)
H13	10
H90	10
H138	16

Пример 4. Ксенотрансплантатная модель опухоли

[00290] ЕрСАМ-нацеленный слитый белок согласно настоящему изобретению (например, слитый белок, который представляет собой триспецифический белок, содержащий анти-ЕрСАМ однодоменное антитело, содержащее только тяжелую цепь, анти-CD3 scFv и анти-альбумин домен) оценивали на ксенотрансплантатной модели. Для того, чтобы определить эффективность иллюстративного ЕрСАМ-нацеленного слитого белка *in vivo* использовали множество ксенотрансплантатных моделей опухоли. Примеры общих опухолевых клеточных линий для использования в исследовании на ксенотрансплантатной модели включают клетки A549 (немелкоклеточная карцинома легкого), клетки DU-145 (предстательная железа), клетки MCF-7 (молочная железа), клетки Colo 205 (ободочная кишка), клетки 3T3/JGF-IR (мышинные фибробластные), клетки NCI H441, клетки HEP G2 (гепатома), клетки MDA MB 231 (молочная железа), клетки HT-29 (ободочная кишка), клетки MDA-MB-435s (молочная железа), клетки U266, клетки SH-SY5Y, клетки Sk-Mel-2, клетки NCI-H929, RPM18226 и A431. Иммунодефицитных мышей NOD/SCID сублетально облучали (2 Гр) и подкожно инокулировали 1×10^6 опухолевых клеток (например, клеток NCI H441) в их правый задний бок. Когда опухоль достигала 100-200 мм³, животных разделяли на 3 группы лечения. Группам 2 и 3 внутрибрюшинно вводили $1,5 \times 10^7$ активированных Т-клеток человека. Через три дня животных из группы 3 далее обрабатывали иллюстративным ЕрСАМ-нацеленным триспецифическим

антигенсвязывающим белком. Группы 1 и 2 обрабатывали только средой. Массу тела и объем опухоли определяли в течение 30 дней, начиная по меньшей мере с дня 5 после лечения иллюстративным ЕрСАМ-нацеленным триспецифическим белком.

[00291] Как ожидается, животные, получавшие лечение иллюстративным ЕрСАМ-нацеленным триспецифическим белком, имеют статистически значимое замедление роста опухоли по сравнению с соответствующей контрольной группой, получавшей среду.

Пример 5. Протокол клинического исследования с целью предварительного исследования эффективности введения ЕрСАМ-нацеленного триспецифического антигенсвязывающего белка согласно Примеру 4 пациентам, страдающим раком яичников

[00292] Это исследование представляет собой клиническое исследование фазы I/II для исследования иллюстративного ЕрСАМ-нацеленного триспецифического антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению в качестве терапии эпителиального рака яичников.

[00293] Результаты исследования:

[00294] *Первичные:* Максимальная переносимая доза ЕрСАМ-нацеленного триспецифического белка.

[00295] *Вторичные:* Определяют связан ли *in vitro* ответ иллюстративного ЕрСАМ-нацеленного триспецифического белка с клиническим ответом.

[00296] **Фаза I**

[00297] Максимально переносимую дозу (MTD) определяют в разделе фазы I исследования.

1.1 Максимально переносимую дозу (MTD) определяют в разделе фазы I исследования.

1.2 Пациентов, которые соответствуют критериям отбора, включают в исследование ЕрСАМ-нацеленного триспецифического белка согласно предшествующим примерам.

1.3 Цель исследования состоит в определении самой высокой дозы ЕрСАМ-нацеленного триспецифического белка согласно предшествующим примерам, которую можно было бы безопасно вводить без серьезных или неуправляемых побочных эффектов у участников. Данная доза будет зависеть от количества участников, которые были включены в исследование ранее, и от того, насколько хорошо доза переносилась. Не все участники получают одинаковую дозу.

[00298] Фаза II

2.1 В последующем разделе фазы II проводят лечение с MTD с целью определения, приводит ли терапия иллюстративным ЕрСAM-нацеленным триспецифическим белком к по меньшей мере к 20%-ой частоте ответа.

Первичный результат для фазы II --- Определить, приводит ли терапия ЕрСAM-нацеленным триспецифическим белком к по меньшей мере к 20% пациентов, достигающих клинического ответа (взрывной ответ, незначительный ответ, частичный ответ или полный ответ).

[00299] Пригодность пациента к участию в исследовании:

- Гистологически или цитологически подтвержденный эпителиальный рак яичников. Может иметь место рецидивная эпителиальная карцинома яичников или прогрессирование заболевания после неэффективности химиотерапии первой линии на основе платины при не более чем одном предшествующем режиме лечения на основе платины;
- Адекватные лабораторные показатели исследования функции костного мозга, почек, печени и эхокардиограммы.

[00300] Фаза III

[00301] 3.1А Последующую часть фазы III проводят с образцом ЕрСAM-нацеленного триспецифического белка, где оценивают вторичные результаты, такие как частота ответа (RR), зарегистрированные пациентом результаты (PRO), выживаемость без прогрессирования (PFS), продолжительность выживаемости без прогрессирования, время до прогрессирования (TIP), общая выживаемость, оценка качества жизни, связанного со здоровьем, число участников с общей выживаемостью, продолжительность ответа, время до ответа, число участников с ответом, время до роста опухоли и т. д.

Пример 6. Конструирование и исследование иллюстративных мультивалентных нацеленных связывающих белков

Конструкции

[00302] Фиг. 6: были получены следующие конструкции ProCAR, в которых использовались ЕрСAM-связывающие последовательности, раскрытые в настоящем документе. Иллюстративная конструкция, включающая анти-человеческое ЕрСAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 485). Иллюстративная конструкция, включающая анти-человеческий сывороточный альбумин sdAb, анти-человеческий ЕрСAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен

CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 486). Иллюстративная конструкция, включающая анти-человеческий сывороточный альбумин sdAb, анти-человеческий EPCAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 487). Иллюстративная конструкция, включающая анти-человеческий сывороточный альбумин sdAb, анти-человеческий EPCAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 488). Иллюстративная конструкция, включающая анти-человеческий сывороточный альбумин sdAb, сайт расщепления протеазой 3, анти-человеческий EPCAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 489). Иллюстративная конструкция, включающая анти-человеческий сывороточный альбумин sdAb, сайт расщепления протеазой 3, анти-человеческий EPCAM sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 490). Иллюстративная конструкция, включающая анти-GFP sdAb, эпитоп FLAG, шарнирную область/трансмембранный домен CD8, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 491).

EPCAM Mask 1 блокирует EPCAM-связывающую активность ProCAR

[00303] 300 000 первичных человеческих Т клеток получали у здоровых доноров и инфицировали 1 мл супернатанта лентивируса, состоящего из конструкций, указанных на **Фиг. 6**, с получением анти- EPCAM CAR-Т клеток, которые затем окрашивали анти-FLAG антителами и EPCAM-Fc наряду с указанными вторичными антителами. Данные анализировали посредством проточной цитометрии. На **Фиг. 7** приведены гистограммы окрашивания EPCAM-Fc/ Alexa Fluor 647 клеток CAR-Т, которые были сгруппированы согласно низкой (**Фиг. 7А**), средней (**Фиг. 7В**) или высокой (**Фиг. 7С**) экспрессии CAR на основе анти-FLAG окрашивания.

[00304] Эти данные демонстрируют эффективность EPCAM mask 1 блокировать EPCAM-связывающую активность ProCAR.

EPCAM Mask 2 блокирует EPCAM-связывающую активность ProCAR

[00305] 300 000 первичных человеческих Т клеток получали у здоровых доноров и инфицировали 1 мл супернатанта лентивируса, состоящего из конструкций, указанных на **Фиг. 21**, с получением анти- EPCAM CAR-Т клеток, которые затем окрашивали анти-FLAG

антителами и ЕpСAM-Fc наряду с указанными вторичными антителами. Данные анализировали посредством проточной цитометрии.

[00306] На **Фиг. 8** приведены гистограммы окрашивания ЕpСAM-Fc/Alexa Fluor 647 клеток CAR-T, которые были сгруппированы согласно низкой (**Фиг. 8А**), средней (**Фиг. 8В**) или высокой (**Фиг. 8С**) экспрессии CAR на основе анти-FLAG окрашивания, что демонстрирует эффективность ЕpСAM mask 2 блокировать ЕpСAM-связывающую активность ProCAR.

Маскировка анти-ЕpСAM sdAb H90

[00307] 300 000 первичных человеческих Т клеток получали у здоровых доноров и инфицировали 1 мл супернатанта лентивируса, состоящего из конструкций, указанных на **Фиг. 6**, с получением анти-ЕpСAM CAR-T клеток, которые затем совместно культивировали при различных соотношениях (CAR-T:клетки-мишени) с ЕpСAM-экспрессирующими раковыми клетками, которые стабильно экспрессируют люциферазу. Данные по активности люциферазы получали через 72 часа в качестве предсказательного фактора жизнеспособности раковых клеток и нормализовывали относительно анти-GFP контрольных CAR-T клеток, C1081.

[00308] Данные, приведенные на **Фиг. 9**, демонстрируют маскировку анти-ЕpСAM sdAb H90. SEQ ID NO 485 представляет собой «голый» CAR, т.е. нет анти-ALB домена. Добавление анти-ALB домена (SEQ ID NO 486) оказывает небольшое влияние на активность уничтожения клеток. Добавление маскировки в СС' петлю анти-ALB домена оказывает значительное влияние на активность уничтожения клеток, благодаря специфической блокировки связывания ЕpСAM.

Стерическая блокировка анти-ЕpСAM sdAb H90 посредством HSA

[00309] 300 000 первичных человеческих Т клеток получали у здоровых доноров и инфицировали 1 мл супернатанта лентивируса, состоящего из конструкций, указанных на **Фиг. 6**, с получением анти-ЕpСAM CAR-T клеток, которые затем совместно культивировали при различных соотношениях (CAR-T:клетки-мишени) с ЕpСAM-экспрессирующими раковыми клетками, которые стабильно экспрессируют люциферазу в присутствии или отсутствии человеческого сывороточного альбумина (HSA). Данные по активности люциферазы получали через 72 часа в качестве предсказательного фактора жизнеспособности раковых клеток и нормализовывали относительно анти-GFP контрольных CAR-T клеток, C1081.

[00310] Данные, приведенные на **Фиг. 10**, демонстрируют стерическую блокировку анти-EpCAM sdAb H90 посредством HSA.

Пример 7. Уничтожение клеток, зависимое от сайта протеазы EpCAM ProCAR

[00311] Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор, (CAR Т-клетки) получали путем инфицирования выделенных CD4/CD8 положительных Т-клеток, полученных у здорового донора, лентивирусом, экспрессирующим указанные конструкции. На **Фиг. 6** приведена диаграмма с используемыми конструкциями. Клетки инкубировали с Fc-меченым EpCAM внеклеточным доменом (ECD). Клетки промывали для удаления несвязанного Fc-меченого EpCAM ECD. Клетки инкубировали с вторичным антителом, конъюгированным с DyLight 650, которое распознает человеческий Fc. Связывание вторичного антитела с клетками определяли посредством проточной цитометрии.

[00312] На **Фиг. 11** продемонстрирована зависимая от сайта протеазы активация активности уничтожения клеток EpCAM ProCAR mask 2.

Пример 8. Протеазная активация антигенсвязывающей активности EpCAM Mask 1 ProCAR

[00313] 300 000 первичных человеческих Т клеток, полученных у здоровых доноров, инфицировали 1 мл супернатанта лентивируса, состоящего из конструкций, указанных на **Фиг. 6**, с получением анти-EpCAM CAR-Т клеток, которые затем промывали в PBS, а затем обрабатывали в течение 1 ч при комнатной температуре с применением либо PBS, либо PBS, содержащего 400 нМ рекомбинантной протеазы uPA, и затем окрашивали анти-FLAG антителами и EpCAM-Fc наряду с анти-мышинными BV421 и анти-человеческий Fc Alexa Fluor 647 вторичными антителами и анализировали посредством проточной цитометрии.

[00314] Гистограммы окрашивания с EpCAM-Fc клеток CAR-Т сгруппированы согласно низкой (**Фиг. 12А**), средней (**Фиг. 12В**) или высокой (**Фиг. 12С**) экспрессии CAR на основе анти-FLAG окрашивания. Эти результаты демонстрируют активацию протеазой антигенсвязывающей активности EpCAM Mask 1 ProCAR.

Пример 9. Протеазная активация антигенсвязывающей активности EpCAM Mask 2 ProCAR

[00315] 300 000 первичных человеческих Т клеток, полученных у здоровых доноров, инфицировали 1 мл супернатанта лентивируса, состоящего из конструкций, указанных на **Фиг. 6**, с получением анти-EpCAM CAR-Т клеток, которые затем промывали

в PBS, а затем обрабатывали в течение 1 ч при комнатной температуре с применением либо PBS, либо PBS, содержащего 400 нМ рекомбинантной протеазы uPA, и затем окрашивали анти-FLAG антителами и EpCAM-Fc наряду с анти-мышинными BV421 и анти-человеческий Fc Alexa Fluor 647 вторичными антителами и анализировали посредством проточной цитометрии.

[00316] Гистограммы окрашивания с EpCAM-Fc клеток CAR-T сгруппированы согласно низкой (**Фиг. 13А**), средней (**Фиг. 13В**) или высокой (**Фиг. 13С**) экспрессии CAR на основе анти-FLAG окрашивания. Эти результаты демонстрируют активацию протеазой антигенсвязывающей активности EpCAM Mask 2 ProCAR.

Пример 10. Демонстрация улучшенной переносимости на мышах, обеспеченной иллюстративной EpCAM-нацеленной ProTriTAC молекулой

[00317] В этом примере оценивали переносимость иллюстративной EpCAM-нацеленной ProTriTAC молекулы. Самкам мышей NSG в возрасте семи недель, без опухолей, внутривенно инъецировали 2×10^7 размноженных человеческих Т-клеток в начале исследования, т.е. в день 0. На день 2 лечение начинали с разделения мышей на различные группы и введения им различных концентраций иллюстративной EpCAM-нацеленной ProTriTAC молекулы, содержащей последовательность линкера L040 (SEQ ID NO: 494), EpCAM-нацеленной TriTAC молекулы (SEQ ID NO: 492), EpCAM-нацеленной ProTriTAC молекулы, содержащей нерасщепляемый линкер (EpCAM ProTriTAC (NCLV) (SEQ ID NO: 495) и молекулы GFP TriTAC в качестве контроля (SEQ ID NO: 493). Молекулы вводили один раз в день в течение 10 дней при следующих дозах: 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг и 1 мг/кг. Начиная с дня 2, ежедневно регистрировали массу тела животных. Как показано на **Фиг. 14А-14С**, EpCAM-нацеленная ProTriTAC молекула, содержащая нерасщепляемый линкер (ProTriTAC (NCLV)), и GFP TriTAC (используемая в качестве отрицательного контроля) очень хорошо переносятся у мышей даже при максимальной дозе 1 мг/кг. EpCAM-нацеленная ProTriTAC молекула, содержащая линкерную последовательность L040, хорошо переносилась при дозе 1 мг/кг, тогда как EpCAM-нацеленная TriTAC хорошо переносилась при 0,1 мг/кг. Таким образом, было обнаружено, что EpCAM-нацеленная ProTriTAC, содержащая последовательность линкера L040, обеспечивает по меньшей мере в 10 раз улучшенную переносимость у мышей по сравнению с EpCAM-нацеленной TriTAC.

Пример 11. Аффинность EpCAM-нацеленных ProTriTAC белков в отношении EpCAM человека, яванских макаков или мышей

[00318] Аффинности различных иллюстративных ЕрСАМ-нацеленных ProTriTAC белков в отношении ЕрСАМ человека, яванских макак и мышей измеряли в оде анализа связывания, в ходе которого также изучали кинетику связывания для взаимодействия между исследуемыми ProTriTAC белками и ЕрСАМ человека. Кинетика связывания приведена на **Фиг. 15А, 15В и 15С**.

[00319] Данные по аффинности для ЕрСАМ-нацеленных ProTriTAC белков, содержащих иллюстративные ЕрСАМ-связывающие домены H13 (SEQ ID NO 207), H90 (SEQ ID NO 209) или H90.2 (SEQ ID NO 497), приведены в **Таблице 8**.

[00320] **Таблица 8. Данные по аффинности для ЕрСАМ-нацеленных ProTriTAC белков**

	H13 (SEQ ID NO 576) (нМ)	(H90) (SEQ ID NO 577) (нМ)	H90.2 (SEQ ID NO 578) (нМ)	
huЕрСАМ:Fc (SEQ ID NO 579)	115	0,23	0,10	
cyЕрСАМ:Fc (SEQ ID NO 580)	137	0,42	0,21	
muЕрСАМ (биотинилированный вариант мышинового ЕрСАМ антигена)	нет связывания	0,26	0,15	

Пример 12. Способность вовлекать Т-клетки и специфичность иллюстративных ЕрСАМ-нацеленных белков в форме TriTAC, форме нерасщепляемого пролекарства или форме активного лекарственного средства

[00321] Три иллюстративных гуманизированных ЕрСАМ-нацеленных ProTriTAC белка, содержащих иллюстративный ЕрСАМ-связывающий домен, как описано в настоящем документе, H13 (SEQ ID NO 207), H138.2 (SEQ ID NO 496) или H90.2 (SEQ ID NO 497), тестировали в анализе зависимой от Т-клеток клеточно-опосредованной цитотоксичности (TDCC) (см. Nazarian AA, Archibeque IL, Nguyen YH, Wang P, Sinclair AM, Powers DA. 2015. J Biomol Screen. 20:519-27), используя клетки ЕрСАМ-экспрессирующего

рака ободочной кишки НСТ116. Последовательности Н90.2 и Н138.2 ЕрСАМ-связывающего домена были в основном подобны последовательностям ЕрСАМ-связывающего домена Н90 и Н138, соответственно, однако, первая аминокислота каркаса 4 была модифицирована (см. SEQ ID NO 582). В частности, последовательности Н90 и Н138 ЕрСАМ-связывающего домена содержали сайты дезамидирования Asn (NG), которые были изменены на WG для удаления дезамидирования Asn, и предполагали улучшение с точки зрения стабильности белка (что, в свою очередь, вероятно, было бы выгодно для улучшения возможности производства лекарственного средства).

[00322] Результаты приведены на **Фиг. 16А (Н13), 16В (Н90.2) и 16С (Н138.2)**. Исследованные ЕрСАМ-связывающие белки содержали ЕрСАМ-связывающий домен (Н13, Н90.2 или Н138.2), домен, связывающий альбумин (анти-ALB), и CD3-связывающий домен (анти-CD3), где анти-ALB домен дополнительно включал нерасщепляемый линкер (NCLV) (форму нерасщепляемого пролекарства), или расщепляемый линкер плюс маскирующий домен (АСТ). Активированные ЕрСАМ-связывающие белки (СТ) (форма активного лекарственного средства) содержали ЕрСАМ-связывающий домен (Н13, Н90.2 или Н138.2) и CD3-связывающий домен (анти-CD3).

[00323] В этом анализе меченные люциферазой клетки НСТ116 объединяли с очищенными человеческими Т-клетками и подвергали титрованию иллюстративных ЕрСАМ-связывающих белков, как описано выше (NCLV, СТ, АСТ). Выдвигали гипотезу, что если ЕрСАМ-связывающий белок направляет Т-клетки на уничтожение ЕрСАМ-экспрессирующих клеток НСТ116, то жизнеспособность этих клеток, определяемая с помощью анализа люциферазы через 48 часов после начала эксперимента, должна снизиться. Аналогичный анализ также проводили с использованием ЕрСАМ-отрицательных миеломных клеток NCI-H929, и, как показано на **Фиг. 17А, 17В и 17С**, ни один из протестированных белков не был способен вовлечь Т-клетки в уничтожение клеток NCI-H929.

[00324] На **Фиг. 16А, 16В и 16С** приведены репрезентативные данные TDCC анализа с использованием клеток НСТ116. Значения EC_{50} анализа TDCC приведены в **Таблице 9**. Как видно на графиках и обозначено значениями EC_{50} , связывающие белки, содержащие любой из трех ЕрСАМ-связывающих доменов (Н13, Н90.2 или Н138.2), функционировали как рекрутеры Т-клеток в ЕрСАМ-экспрессирующие клетки НСТ116 рака ободочной кишки. Кроме того, для связывающих белков с расщепляемым линкером и маскирующим доменом (АСТ) значения EC_{50} были в около 7-10 раз (Н13 и Н138.2) ниже, чем у связывающих белков с нерасщепляемым линкером (NCLV) (форма нерасщепляемого пролекарства), тогда как для активного лекарственного средства (СТ) значения EC_{50} были

в около 350 раз (H138.2) ниже, чем у NCLV. EC₅₀ активного лекарственного средства, содержащего EpCAM-связывающий домен H13, составляет около 37 пМ, для связывающего домена H90.2 составляет около 11 пМ, а для связывающего домена H138.2 составляет около 107 пМ.

[00325] Таблица 9. Значения EC₅₀ для анализа TDCC с использованием EpCAM ProTriTAC белков на клетках HCT116

	<u>EC₅₀ (M)</u>	<u>Кратность</u> <u>относительно</u> <u>NCLV</u>
EpCAM H13 ProTriTAC (NCLV) (SEQ ID NO 569)	6,87E-09	
EpCAM H13 ProTriTAC (CT) (SEQ ID NO 210)	3,67E-11	187
EpCAM H13 ProTriTAC (ACT) (SEQ ID NO 570)	7,07E-10	10
EpCAM H90.2 ProTriTAC (NCLV) (SEQ ID NO 502)		
EpCAM H90.2 ProTriTAC (CT) (SEQ ID NO 571)	1,07E-11	
EpCAM H90.2 ProTriTAC (ACT) (SEQ ID NO 572)	2,67E-09	
EpCAM H138.2 ProTriTAC (NCLV) (SEQ ID NO 573)	3,73E-08	
EpCAM H138.2 ProTriTAC (CT) (SEQ ID NO 574)	1,07E-10	349
EpCAM H138.2 ProTriTAC (ACT) (SEQ ID NO 575)	5,01E-09	7

[00326] Для дальнейшей оценки потенциала EpCAM-специфического уничтожения клеток иллюстративных EpCAM-связывающих белков проводили анализ TDCC, как описано выше, с клетками HCT116 рак ободочной кишки, которые экспрессируют EpCAM (дикого типа), или клетками HCT116 (EpCAM-КО), которые не экспрессируют EpCAM. EpCAM TriTAC белки, содержащие EpCAM-связывающие домены

H13 или H90.2, исследовали в этом анализе, и в качестве контрольных белков применяли GFP TriTAC белок и EGFR TriTAC белок. Результаты этого анализа показаны на **Фиг. 18А** и **18В**, и значения EC_{50} перечислены в **Таблице 10**.

[00327] ЕpСAM-связывающие белки проявляли дифференциальное уничтожение клеток на основе экспрессии ЕpСAM. Специфичность связывания также подтверждали посредством проточной цитометрии, как показано на **Фиг. 19**. Для анализа проточной цитометрии клетки окрашивали с 300 нМ H13 или H90.2 в форме СТ (активное лекарственное средство) и обнаруживали с помощью 11D3-AF650 антитела.

[00328] **Таблица 10. Значения EC_{50} для анализов TDCC с применением ЕpСAM TriTAC белков на клетках HCT116 и клетках HCT116 (ЕpСAM-KO)**

	<u>HCT116</u> <u>EC_{50} (M)</u>	<u>HCT116(ЕpСAM-KO)</u> <u>EC_{50} (M)</u>
ЕpСAM (H90.2) TriTAC	3,8E-10	3,3E-09
ЕpСAM (H13) TriTAC	2,3E-10	3,5E-06
EGFR TriTAC	5,6E-12	5,3E-12
GFP TriTAC	4,0E-09	5,8E-07

[00329] В дальнейших анализах TDCC с использованием других различных клеточных линий, сравнивали потенциал уничтожения клеток двух ЕpСAM-связывающих белков в форме СТ (активное лекарственное средство, содержащее ЕpСAM-связывающий домен либо H13, либо H90.2, и анти-CD3 домен) или форме нерасщепляемого пролекарства (содержащего либо H13, либо H90.2, и анти-CD3, и анти-HSA с нерасщепляемым линкером, NCLV). Результаты приведены в **Таблице 11**, и на график на **Фиг. 20** соответствует анализу TDCC с применением SKBR3 (клеток рака молочной железы человека).

[00330] Наблюдали, что активное лекарственное средство, содержащее ЕpСAM-связывающий домен H13, было около 3 раза более эффективным, чем активное лекарственное средство, содержащее ЕpСAM-связывающий домен H90.2, в ходе анализа TDCC *in vitro*. Белки, при сравнении их формы активного лекарственного средства и формы нерасщепляемых пролекарств (СТ по сравнению с NCLV), показали подобную 400-600х маскировку, в ходе анализов TDCC с множеством ЕpСAM-экспрессирующих клеток. Репрезентативные графики, демонстрирующие маскирующий эффект, достигаемый формой нерасщепляемого пролекарства, показан на **Фиг. 21А и 21В**.

[00331] **Таблица 11. Значения EC₅₀ для анализов TDCC с использованием активных ЕрСАМ-нацеленных активных лекарственных средств (форма СТ), протестированных с различными клеточными линиями**

TDCC EC ₅₀ (nM)		Эффективность активного лекарственного средства (nM)		H90.2/H13 соотношение
		H13	H90.2	
CAPAN2	поджелудочная железа	4	11	2,6
SKBR3	молочная железа	5	20	4,0
TT	пищевод	8	13	1,7
HEPG2	печень	13	44	3,3
HCT116	ободочная кишка	14	19	1,4
SW780	мочевой пузырь	16	56	3,6
DMS53	легкое	18	60	3,4
OVCAR8	яичник	57	160	2,8
HELA	шейка матки	62	280	4,4
MDAPCA2b	предстательная железа	98	380	3,8
PECAPJ41	голова и шея	120	100	0,8
Среднее		34	90	2,9х

[00332] Дополнительные анализы TDCC проводили с клеточными линиями (включая CAPAN2, DMS53, HepG2, KMRC3, MDAPCA2b и SKBR3) для сравнения содержащего H13 ЕрСАМ-связывающего белка NCLV (нерасщепляемое пролекарство), ProTriTAC (с расщепляемым линкером L040) и активного лекарственного средства СТ. Значения EC₅₀ приведены в **Таблице 12**, и репрезентативные графики показаны на **Фиг. 22А, 22В, 22С, 22D, 22Е, 22F, 22G и 22H**.

[00333] Таблица 12. Значения EC₅₀ для анализов TDCC с использованием активных ЕрСАМ-нацеленных активных лекарственных средств (форма СТ), исследованных с различными клеточными линиями

Клеточная линия	ЕрСАМ- связывающий домен	Форма	EC₅₀ (M)
CAPAN2 (поджелудочная железа)	H90.2	NCLV	6,31E-09
		L040	1,53E-09
		CT	1,06E-11
	H13	NCLV	2,49E-09
		L040	2,23E-10
		CT	4,06E-12
DMS53 (легкое)	H90.2	NCLV	3,26E-08
		L040	1,42E-08
		CT	6,04E-11
	H13	NCLV	1,01E-08
		L040	4,11E-09
		CT	1,76E-11
HepG2 (печень)	H90.2	NCLV	1,18E-08
		L040	1,08E-08
		CT	4,37E-11
	H13	NCLV	8,63E-09
		L040	2,79E-09
		CT	1,32E-11
OVCAR8 (яичник)	H90.2	NCLV	5,14E-08
		L040	3,53E-08
		CT	1,61E-10
	H13	NCLV	3,49E-08
		L040	1,83E-08
		CT	5,66E-11

Клеточная линия	ЕpСAM- связывающий домен	Форма	EC ₅₀ (M)
РЕСАPJ41 (голова и шея)	H90.2	NCLV	6,48E-08
		L040	3,17E-08
		CT	1,01E-10
	H13	NCLV	7,57E-08
		L040	4,53E-08
		CT	1,24E-10
SKBR3 (молочная железа)	H90.2	NCLV	9,53E-09
		L040	7,52E-09
		CT	2,02E-11
	H13	NCLV	2,95E-09
		L040	8,76E-10
		CT	4,98E-12
KMRC3	H90.2	NCLV	
		L040	
		CT	
	H13	NCLV	
		L040	
		CT	1,60E-11
MDAPCA2b	H90.2	NCLV	
		L040	6,74E-08
		CT	3,77E-10
	H13	NCLV	5,34E-08
		L040	3,07E-08
		CT	9,81E-11

Пример 13. Противоопухолевая переносимость и эффективность ЕpСAM-нацеленного ProTriTAC по сравнению с ЕpСAM-нацеленным TriTAC

[00334] Эффективность *in vivo* ЕpСAM ProTriTAC, содержащего ЕpСAM-связывающий домен H13, оценивали на установленной модели колоректальной опухоли

НТ29, и сравнивали с эффективностью ЕрСАМ TriTAC, содержащего ЕрСАМ-связывающий домен Н13.

[00335] На день 5, после имплантации опухоли, мышам вводили инъекцию либо исследуемого ЕрСАМ Н13 ProTriTAC при 0,3 мг/кг или 0,1 мг/кг, либо исследуемого ЕрСАМ Н13 TriTAC при 0,3 мг/кг, либо контрольного TriTAC при сопоставимых дозах, и объемы опухоли измеряли в течение периода времени около 20 дней. Как показано на **Фиг. 23А** и **23В**, ЕрСАМ Н13 ProTriTAC был более эффективным, чем ЕрСАМ Н13 TriTAC на мышинной модели опухоли.

[00336] В другом исследовании яванским макакам вводили инъекцию сопоставимых доз (30 мкг/кг) ЕрСАМ Н13 ProTriTAC или ЕрСАМ Н13 TriTAC и измеряли уровни цитокинов (IFN-гамма, IL-2, IL-6 и IL-10). Результаты показаны на **Фиг. 24А, 24В, 24С, и 24D**, где указано, что ЕрСАМ Н13 ProTriTAC проявляет заметно пониженную продукцию цитокинов по сравнению с ЕрСАМ Н13 TriTAC, в исследовании на яванских макаках с одной дозой 30 мкг/кг.

Пример 14. Фармакокинетические свойства иллюстративных ЕрСАМ-связывающих белков на яванских макаках

[00337] Связывающие белки, содержащие ЕрСАМ-связывающий домен Н13 или Н90.2 (в форме TriTAC, форме ProTriTAC NCLV и форме ProTriTAC с расщепляемым линкером L040) вводили яванским макакам, и оценивали их фармакокинетические свойства. **Фиг. 25А** и **25В** показывают концентрацию в плазме яванских макак исследуемых белков с течением времени. Кроме того, в **Таблице 13** приведены фармакокинетические параметры.

[00338] **Таблица 13. Параметры РК для ЕрСАМ-связывающих триспецифических белков у яванских макак**

		C_{max} (нМ)	AUC_{0-inf} (час* нМ)	Период полувыведения (день)
Н13	ProTriTAC (NCLV)	77	4586	9,7
	ProTriTAC (L040)	47	3643	5,8

		C_{max} (нМ)	AUC_{0-inf} (час* нМ)	Период полувыведения (день)
	TriTAC	38	1588	2,5
H90.2	ProTriTAC (NCLV)	44	5603	10,5
	ProTriTAC (L040)	47	6387	7,7
	TriTAC	25	1126	2,6

**Пример 15. Оценка терапевтического индекса (эффективности и токсичности)
ErCAM-нацеленных ProTriTAC/TriTAC белков**

[00339] В этом исследовании различные дозы ErCAM-нацеленного TriTAC белка или ErCAM-нацеленного ProTriTAC белка, содержащего ErCAM-связывающий домен H90, или контрольного TriTAC белка, вводили посредством инъекции мышам, несущим модель опухоли LoVo (модель рака ободочной кишки). Результаты показаны на **Фиг. 29А-29К**. Безопасность и переносимость вариантов ProTriTAC и TriTAC также исследовали, и результаты приведены на **Фиг. 30А-30Е**. Выживание в процентах показано на **Фиг. 30А-30В**, и клинические химические параметры (ALT, AST и общий билирубин) показаны на **Фиг. 30С, 30Д и 30Е**. Результаты в общем демонстрируют, что форма ProTriTAC в около 30 раз более переносима, чем форма TriTAC у одной и той же мыши, несущей опухоль LoVo. Это наблюдение дополнительно подтверждено гистопатологическими исследованиями и суммарно приведено на **Фиг. 31** и в **Таблице 14**.

[00340] Таким образом, это исследование демонстрирует увеличение терапевтического индекса в около 10 раз для формы ProTriTAC, на основе безопасности и эффективности лекарственного средства у одного и того же животного.

[00341] **Таблица 14. Сравнительный терапевтический индекс форм TriTAC и ProTriTAC**

	Минимальная эффективная доза	Максимальная переносимая доза	Терапевтический индекс (ТИ)
ЕрСAМ TriTAC	0,03 мг/кг	0,03 мг/кг	1
ЕрСAМ ProTriTAC	0,1 мг/кг	1 мг/кг	10
ProTriTAC предпочтительный	0,3х	30х	10х

[00342] Несмотря на то, что в настоящем документе показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области техники очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены очевидны специалистам в данной области без отклонения от сущности настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практической реализации настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и охватывает способы и структуры в рамках этой формулы изобретения и их эквиваленты.

Последовательности

SEQ ID NO:	Название анти-ЕрСAМ последова- тельности	Аминокислотная последовательность
1	EPL90	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNY ADSVKARFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGHHTINGQGTQVTVS S
2	EPL118	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASMGWFRQSPGNERELVATVSSGDFTNY ADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCGATFVRSDGHHTIYGQGTQVTVS S
3	EPL138	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASMDWYRQFPGNERESIATISSGGFTNY ADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGHHTINGQGTQVTVS S

4	EPL145	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASMGWFRQSPGNERELVATVSSGGFTNY ADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYFCGATFVRSDGHHTIYGQGTQVTVS S
5	EPL164	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASMDWYRQSPGTQPELVATISSTGFTNY ANSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGQHSIYGQGTQVTVS S
6	EPL31	QVQLQESGGGLVHTGGSRLRLSCAASGDTFLRYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGNTD YAGSLKGRFTISRDN TKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAADLTFGLASSHYQYDYWGQGT QVTVSS
7	EPL55	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGDTFLRYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGNTD YAGSLKGRFTISRDN TKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAADLTFGLASSHYQYDYWGQGT QVTVSS
8	EPL57	QVQLQESGGGLVHTGGSRLRLSCAFSGDTFLRYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGNTD YADSLKGRFTISRDN TKNTVY LQMNSLRPEDTAVYYCAADLTFGLASSHYQYDYWGQGT QVTVSS
9	EPL136	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDTFLRYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGNTD YAGSLKGRFTISRDN TKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAADLTFGLASSHYQYDYWGQGT QVTVSS
10	EPL15	QVQLQESGGGSVLAGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIHYTGDTWN YADSVKGRFTISRDN AKNELYLEMN NLKPEDTAVYYCARGSDKGQGTQVTVSS
11	EPL34	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIHYTGDTWN YADSVKGRFTISRDN AKNELYLEMN NLKPEDTAVYYCARGSDKGQGTQVTVSS
12	EPL86	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDWAMSWVRQAPGKGLEWVSGIHYGDHTTH YADFVKGRFTISRDDAKNTLY LQMNSLKPEDTAVYYCARGSTKGQGTQVTVSS
13	EPL153	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDWAMSWVRQAPGKGLEWVSSIHYGDHTTH YADFVKGRFTISRDDAKNTLY LQMNSLKPEDTAVYYCEKGTTRGQGTQVTVSS
14	EPL20	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCAASGNVFRAATMAWYRQAPEKQREMVATIASGGTTNY AD FVKGRFTISRDN AKNTVY LQMNTLKPEDTAVYYCNAGYLTS LGPKNYWGQGTQVTVS S
15	EPL70	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNVFRAATMAWYRQAPEKXREMVATIASGGTTNY AD FVKGRFTISRDN AKNTVY LQMNTLKPEDTAVYYCNAGYLTS LGPKNYWGQGTQVTVS S
16	EPL125	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNVFRAATMAWYRQVPEKQREMVATIASGGTTNY AD FVKGRFTISRDN AKNTVY LQMNTLKPEDTAVYYCNALYLTSLGPKSYWGQGTQVTVS S
17	EPL13	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGNHWMYWYRQAPGRGRELVASISSGGSTNY VDSVKGRFTISRDN ARNTVY LQMYSLKPEDTAVYYCGTSDNWGQGTQVTVSS
18	EPL129	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFAFGNHWMYWYRQAPGRGRELVASISSGGSTNY VDSVKGRFTISRDN ARNTVY LQMYSLRPEDTAVYYCGTSDNWGQGTQVTVSS
19	EPL159	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFAFGNHWMYWYRQAPGRGRELVASISSGGSTNY VDSVKGRFTISRDN ARNTVY LQMYSLKPEDTAVYYCGTSDNWGQGTQVTVSS

20	EPL120	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASISWYRQSPGNERELVATINSGGFTNY ADSVLGRFTISRDNAKNTGYLQMNSLKPEDTAVYFCAATFLRSDGQPPIWGQGTQVTVS S
21	EPL126	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASMGWYRQSPGNERELVATINSGGFTNY ADSVKGRFTISRDNAKNTGYLQMNSLKPEDTAVYFCAATFLRSDGQPPIWGQGTQVTVS S
22	EPL60	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEYILSMYRMAWYRQAPGKVRELVADMSSGGTTNY ADFKVGRFTISRDNDRNTVYQLQMNRLQPEDTAAYYCNVAGRTGPPSYDAFNNWGQGTQV TVSS
23	EPL156	QVQLQESGGGLVQPGASLRVSCAASEYILSMYRMAWYRQAPGKVRELVADMSSGGTTNY ADFKVGRFTISRDNDRNTVYQLQMNRLQPEDTAAYYCNVAGRTGPPSYDAFNNWGQGTQV TVSS
24	EPL2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASESISFFIavgwyrQAPGKERELVAGINRSGFTYY TDSVKGRFSISRDNAKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNAGGLYFSNAYTQGDYWGQGTQV TVSS
25	EPL43	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASESISFFIavgwyrQAPGKERELVAGINRSGFTYY TDSVKGRFSISRDNAKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNAGGLYFSNAYTQGDYWGQGTQV TVSS
26	EPL10	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSVFRANVMGWYRQAPGKQHELVARIDPGGTTTY ADPVKGRFTISRDNAKKTVYQLQMNSLKPDDTAVYYCNAIILLSGGPKDYWGQGTQVTVS S
27	EPL49	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAPSGRTSSIFGMGWFRQAPGKEREFFVASINWSSGGSTS YADSVKGRFTISRDNAKNEMYLQMNSLKFEDTAVYVCAAVALTNKPSWNFWGQGTQVTV SS
28	EPL58	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGPIFSDTIRTMGWYRQAGKQRELVATIASFP SR TNYVDSVKGRFTISRDIKNTVYQLQMDSLKPEDTAVYYCNVDLASIPTKTYWGQGTQVT VSS
29	EPL74	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFGINAMGWYRQAPGKQRESVAFITIGGNTNY LDSVKGRFTISRDNAKNTVYQLQMNGLKPEDTAVYYCNTNPPLILTAGGLYWGQGTQVTV SS
30	EPL78	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSANRFNINVMGWYRQAPGQRELVATINIGGSTDY ADSVKGRFTISRDNAKNTVYQLQLSDLKPEDTAVYYCNVKLRVSGPTGPNVYWGQGTQVT VSS
31	EPL82	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCTASGTILSTMAWYRQAPGKQRELVATISRGTTNYSD SVKGRFAISRSTKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCNTPLTDYGMGYNWGQGTQVTVSS
32	EPL83	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSIFSLNTLAWYRQAPGRQRLIARITGGGTTVY ADSVKGRFTISRDNAKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCNLMVRHPSGSTYEYWGQGTQVTV SS
33	EPL97	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIIIFRGTTMGWFRQAPGKQRESVASISPLGTTSY SGSVEGRFTVSRDNAKNTLFLQMNSLKSEDTAVYYCNAIQVTNVGPRVYWGQGTQVTVS S

34	EPL109	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCASSGFTLDDYTIGWFRQAPGKEREVSCISRRDDSTY YADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMISLRPEDTAVYYCAATPRSYTLRCLGKFDFQGQGT QVTVSS
35	EPL117	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNIVRMTNMAWYRQAPGKQREFVATISAGGSTTY VDSVKDRFTISRDNKTNTVYLQMNLYLKPEDTAVYYCATGSILTNRGAIPGSWGHGTQVT VSS
36	EPL127	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAPGFAFNDHAILWFRQAPGKEREVSEICRDGTTY TDSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNYSVKTDVTAVYYCAVDRRRYYCSGNRAFSSDYWWG QGTQVTVSS
37	EPL152	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVHSGSIFRASTMAWYRQAPGKQRELVAQIMSGGGTNY AGSVKGRFTISRDNANNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNAAQITSWGPKVYWGQGTQVTVS S
38	EPL189	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRINSINTMGWYRQAPGNQRELVAEITRGGTTNY ADSVQGRYAI SRDNAKNLVYLQMNLSLKPEDTDVYYCNAQTFTFSRPTGLDYWGQGTQV TVSS
SEQ ID NO:	CDR1 анти- ЕрСАМ последова- тельности	Аминокислотная последовательность
39	EPL90	GFIFRAASMA
40	EPL118	GFIFRAASMG
41	EPL138	GFIFRAASMD
42	EPL145	GFIFRAASMG
43	EPL164	GFIFRAASMD
44	EPL31	GDTFLRYAMG
45	EPL55	GDTFLRYAMG
46	EPL57	GDTFLRYAMG
47	EPL136	GDTFLRYAMG
48	EPL15	GTTFSSYYMS
49	EPL34	GTTFSSYYMS
50	EPL86	GTTFSDWAMS
51	EPL153	GTTFSDWAMS
52	EPL20	GNVFRAATMA
53	EPL70	GNVFRAATMA
54	EPL125	GNVFRAATMA
55	EPL13	GFAFGNHWMY
56	EPL129	GFAFGNHWMY
57	EPL159	GFAFGNHWMY
58	EPL120	GFIFRAASIS
59	EPL126	GFIFRAASMG

60	EPL60	EYILSMYRMA
61	EPL156	EYILSMYRMA
62	EPL2	ESISSFIAVG
63	EPL43	ESISSFIAVG
64	EPL10	GSVFRANVMG
65	EPL49	GRTSSIFGMG
66	EPL58	GPIFSDTIRTMG
67	EPL74	GSIFGINAMG
68	EPL78	ANRFNINVMG
69	EPL82	GTILSTMA
70	EPL83	GSIFSLNTLA
71	EPL97	GIIFRGTTMG
72	EPL109	GFTLDDYTIG
73	EPL117	GNIVRMTNMA
74	EPL127	GFAFNDHAIL
75	EPL152	GSIFRASTMA
76	EPL189	GRINSINTMG
SEQ ID NO:	CDR2 анти- ЕрСAМ последова- тельности	Аминокислотная последовательность
77	EPL90	SISSGAFTNYADSVKA
78	EPL118	TVSSGDFTNYADSVKG
79	EPL138	TISSGGFTNYADSVKG
80	EPL145	TVSSGGFTNYADSVKG
81	EPL164	TISSTGFTNYANSVKG
82	EPL31	AITWNGGNTDYAGSLKG
83	EPL55	AITWNGGNTDYAGSLKG
84	EPL57	AITWNGGNTDYADSLKG
85	EPL136	AITWNGGNTDYAGSLKG
86	EPL15	GIHYTGDWTNYADSVKG
87	EPL34	GIHYTGDWTNYADSVKG
88	EPL86	GIHYGDHTTHYADFVKG
89	EPL153	SIHYGDHTTHYADFVKG
90	EPL20	TIASGGTTNYADFVKG
91	EPL70	TIASGGTTNYADFVKG
92	EPL125	TIASGGTTNYADFVKG
93	EPL13	SISSGGSTNYVDSVKG
94	EPL129	SISSGGSTNYVDSVKG

95	EPL159	SISSGGSTNYVDSVKG
96	EPL120	TINSGGFTNYADSVLG
97	EPL126	TINSGGFTNYADSVKG
98	EPL60	DMSSGGTTNYADSVKG
99	EPL156	DMSSGGTTNYADSVKG
100	EPL2	GINRSGFTYYTDSVKG
101	EPL43	GINRSGFTYYTDSVKG
102	EPL10	RIDPGGTTTYADPVKG
103	EPL49	SINWSGGSTSYADSVKG
104	EPL58	TIASFPSRTNYVDSVKG
105	EPL74	FITIGGNTNYLDSVKG
106	EPL78	TINIGGSTDYADSVKG
107	EPL82	TISRGGTTNYSDSVKG
108	EPL83	RITGGGTTVYADSVKG
109	EPL97	SISPLGTTSYSGSVEG
110	EPL109	CISRRDDSTYYADSVKG
111	EPL117	TISAGGSTTYVDSVKD
112	EPL127	EICRDGTTYYTDSVKG
113	EPL152	QIMSGGGTNYAGSVKG
114	EPL189	EITRGGTTNYADSVQG
SEQ ID NO:	CDR3 анти-ЕрСАМ последовательности	Аминокислотная последовательность
115	EPL90	TFLRSDGHHTI
116	EPL118	TFVRSDGHHTI
117	EPL138	TFLRSDGHHTI
118	EPL145	TFVRSDGHHTI
119	EPL164	TFLRSDGQHSI
120	EPL31	DLTFGLASSHYQYDY
121	EPL55	DLTFGLASSHYQYDY
122	EPL57	DLTFGLASSHYQYDY
123	EPL136	DLTFGLASSHYQYDY
124	EPL15	GSD
125	EPL34	GSD
126	EPL86	GST
127	EPL153	GTT
128	EPL20	GYLTSLGPKNY
129	EPL70	GYLTSLGPKNY

130	EPL125	LYLTSLGPKSY
131	EPL13	SDN
132	EPL129	SDN
133	EPL159	SDN
134	EPL120	TFLRSDGQPPI
135	EPL126	TFLRSDGQPPI
136	EPL60	AGRTGPPSYDAFNN
137	EPL156	AGRTGPPSYDAFNN
138	EPL2	GGLYFSNAYTQGDY
139	EPL43	GGLYFSNAYTQGDY
140	EPL10	IILLSGGPKDY
141	EPL49	AVLTNKPSWNF
142	EPL58	DLASIPTKTY
143	EPL74	NPPLILTAGGLY
144	EPL78	KLRVSGPTGPNVY
145	EPL82	PLTDYGMGYN
146	EPL83	MVRHPSGSTYFY
147	EPL97	IQVTNVGPRVY
148	EPL109	TPRSYTLRCLGKFDF
149	EPL117	GSILTNRGAIPGS
150	EPL127	DRRRYYCSGNRAFSSDYFY
151	EPL152	AQITSWGPKVY
152	EPL189	QTFPTFSRPTGLDY
SEQ ID NO:	Название анти-CD3/ анти-ЕpCAM последовательности	Аминокислотная последовательность
153	EPL10	VVGGGGTQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSQLVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSVFR ANVMGWYRQAPGKQHELVARIDPGGTTTYADPVKGRFTISRDNAAKTVYLMNSLKPDD TAVYYCNAIILLSGGPKDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
154	EPL109	VVGGGGTQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSQLVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCASSGFTLD

		DYTI GWFRQAPGKEREGVSCISRRDDSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMISLRPE DTAVYYCAATPRSYTLRCLGKFDFQGGGTQVTVSSHHHHHH*
155	EPL117	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNIVR MTNMAWYRQAPGKQREFVATISAGGSTTYVDSVKDRFTISRDNKTNTVYLQMNLYLKPED TAVYYCATGSILTNRGAI PGSWGHTQVTVSSHHHHHH*
156	EPL120	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFR AASISWYRQSPGNERELVATINSGGFTNYADSVLGRFTISRDNAKNTGYLQMNLSLKPED TAVYFCAATFLRSDGQPPIWGQGTQVTVSSHHHHHH*
157	EPL125	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNVFR AATMAWYRQVPEKQREMVATIASGGTTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLTSLKPED TAVYYCNALYLTSLGPKSYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
158	EPL127	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAPGFAN DHAILWFRQAPGKEREGVSEICRDGTTYTDSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSVKTDD TAVYYCAVDRRRYYCSGNRAFSSDYWWGQGTQVTVSSHHHHHH*
159	EPL13	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAGF NHWMYWRQAPGRGRELVASISSGGSTNYVDSVKGRFTISRDNARNTVYLQMYSLKPED TAVYYCGTSDNWGQGTQVTVSSHHHHHH*
160	EPL136	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG

		NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDTFL RYAMGWFRQAPGKEREFAAITWNGGNTDYAGSLKGRFTISRDNKTNTVYLQMNLSLKPE DTAVYYCAADLTFGLASSHYQYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
161	EPL138	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFR AASMDWYRQFPGNERESIATISSGGFTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPED TAVYFCGATFLRSDGHHTINGQGTQVTVSSHHHHHH*
162	EPL145	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFR AASMDWYRQSPGNERELVATVSSGGFTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPED TAVYFCGATFVRSDGHHTIYGQGTQVTVSSHHHHHH*
163	EPL152	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVHSGSIFR ASTMAWYRQAPGKQRELVAQIMSGGGTNYAGSVKGRFTISRDNANNTVYLQMNLSLKPED TAVYYCNAAQITSWGPKVYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
164	EPL153	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DWAMSWVRQAPGKGLEWVSSIHYGDHTTHYADFVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNLSLKPE DTAVYYCEKGTTRGQGTQVTVSSHHHHHH*
165	EPL156	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPGASLRVSCAASEYILS MYRMAWYRQAPGKVRELVADMSSGGT'TNYADFVKGRFTISRDNDRNTVYLQMNRLQPED TAAYYCNVAGRTGPPSYDAFNWQGTQVTVSSHHHHHH*
166	EPL164	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE

		WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNLTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI AASMDWYRQSPGTQPELVATISSTGFTNYANSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSKPED TAVYFCGATFLRSDGQHSIYGQGTQVTVSSHHHHHH*
167	EPL189	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNLTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRINS INTMGWYRQAPGNQRELVAEITRGGTTNYADSVQGRYAIIRDNAKNLVYLQMNLSKPED TDVYYCNAQTFTPTFSRPTGLDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
168	EPL2	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNLTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASESIS FIAVGWYRQAPGKERELVAGINRSGFTYYTDSVKGRFSIIRDNAKNLTVLLQMTSLKPED TAVYYCNAGGLYFSNAYTQGDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
169	EPL20	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNLTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCAASGNVFR AATMAWYRQAPEKQREMVATIASGGTTNYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLTLPED TAVYYCNAGYLTSLGPKNYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
170	EPL34	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNLTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFTFS SYMSWVRQAPGKGLEWVSGIHYTGDTNYADSVKGRFTISRDNANKNELYLEMNNLKPE DTAVYYCARGSDKGQGTQVTVSSHHHHHH*
171	EPL49	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNLTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAPSGRTSS IFGMGWFRQAPGKEREFVASINWSSGSTSYADSVKGRFTISRDNANKNEMYLQMNLSKFE DTAVYVCAAVALTNKPSWNFWGQGTQVTVSSHHHHHH*
172	EPL58	VVGGGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG

		GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGPIFS DTIRTMGWYRQAAGKQRELVATIASFPSTNYVDSVKGRFTISRDIKNTVYLQMDSLK PEDTAVYYCNVDLASIPKTYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
173	EPL74	VVGGGGTQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFG INAMGWYRQAPGKQRESVAFITIGGNTNYLDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNGLKPED TAVYYCNTNPPLILTAGGLYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
174	EPL78	VVGGGGTQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSANRFN INVMGWYRQAPGQRELVATINIGGSTDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQLSDLKPED TAVYYCNVKL RVSGPTGPNVYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
175	EPL82	VVGGGGTQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCTASGTILS TMAWYRQAPGKQRELVATISRGTTNYSDSVKGRFAISRSTKNTVYLQMNSLKPEDTA VYYCNTPLTDYGMGYNWGQGTQVTVSSHHHHHH*
176	EPL83	VVGGGGTQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSIFS LNTLAWYRQAPGRQRDLIARITGGGTTVYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPED TAVYYCNLMVRHPSGSTYEWGQGTQVTVSSHHHHHH*
177	EPL86	VVGGGGTQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DWAMSWVRQAPGKGLEWVSGIHYGDHTTHYADFVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNSLKPE DTAVYYCARGSTKGQGTQVTVSSHHHHHH*

178	EPL90	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGGSGVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIIFR AASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDNANTVYLQMNLSLKPED TAVYFCGATFLRSDGHHTINGQGTQVTVSSHHHHHH*
179	EPL97	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGGSGVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIIFR GTTMGWFRQAPGKQRESVASISPLGTTSSYSGSVEGRFTVSRDNANTLFLQMNLSLKSED TAVYYCNAIQVTNVGPRVYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
SEQ ID NO:	Название анти-ЕpCAM /анти-CD3 последова- тельности	Аминокислотная последовательность
180	EPL10	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSVFRANVMGWYRQAPGKQHELVARIDPGG TTTYADPVKGRFTISRDNAKKTVYLMNLSLKPDDTAVYYCNAIILLSGGPKDYWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA SSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
181	EPL109	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCASSGFTLDDYTIGWFRQAPGKEREGVSCISRRD DSTYYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMI SLRPEDTAVYYCAATPRSYTLRCLGKFDQ GQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHFANFGNSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCASSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
182	EPL117	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNIVRMTNMAWYRQAPGKQREFVATISAGG STTYVDSVKDRFTISRDNKNTVYLMNLYLKPEDTAVYYCATGSILTNRGAIPGSWGHG TQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHA NFGNSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*

183	EPL120	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASISWYRQSPGNERELVATINSGG FTNYADSVLGRFTISRDNANKNTGYLQMNSLKPEDTAVYFCAATFLRSDGQPPIWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARIIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
184	EPL125	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNVFRAATMAWYRQVPEKQREMVATIASGG TTNYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNTLKPEDTAVYYCNALYLTSLGPKSYWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARIIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
185	EPL127	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAPGFANDHAILWFRQAPGKEREGVSEICRDG TTYTDSVKGRFTISSDNANKNTVYLQMNSVKTDDETAVYYCAVDRRRYYCSGNRAFSSDY YYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWV RQAPGKGLEWVARIIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCASTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
186	EPL13	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGNHWMYWRQAPGRGRELVASISSGG STNYVDSVKGRFTISRDNARNTVYLQMYSLKPEDTAVYYCGTSDNWGQGTQVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIIR KYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISY AYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC TLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
187	EPL136	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDTFLRYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNG GNTDYAGSLKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTFGGLASSHYQYDW GQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQA PGKGLEWVARIIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCASTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
188	EPL138	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASMDWYRQFPGNERESIATISSGG FTNYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGHHTINGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARIIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA

		SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
189	EPL145	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASMGWFRQSPGNERELVATVSSGG FTNYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCGATFVRSDGHHTIYGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARI RSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
190	EPL152	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVHSGSIFRASTMAWYRQAPGKQRELVAQIMSGG GTNYAGSVKGRFTISRDNANNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNAAQITSWGPKVYWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARI RSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
191	EPL153	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDWAMSWVRQAPGKGLEWVSSIHYGD HTTHYADFVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCEKGTTRGQGTQVTVSSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISY WAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVT SGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
192	EPL156	GGGSQVQLQESGGGLVQPGASLRVSCAASEYILSMYRMAWYRQAPGKVRELVADMSSGG TTNYADFVKGRFTISRDNDRNTVYLQMNNRLQPEDTAAYYCNVAGRTGPPSYDAFNWVGQ GTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH ANFGNSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
193	EPL164	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFI FRAASMDWYRQSPGTQPELVATISSTG FTNYANSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGQHSIYGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARI RSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
194	EPL189	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRINSINTMGWYRQAPGNQRELVAEITRGG TTNYADSVQGRYAI SRDNANKNLVYLQMNSLKPEDTDVYYCNAQTFTPTFSRPTGLDYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH

		ANFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCASSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
195	EPL2	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASESISFIAVGWYRQAPGKERELVAGINRSG FTYYTDSVKGRFISIRDNAKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNAGGLYFSNAYTQGDYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH ANFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCASSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
196	EPL20	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCAASGNVFRAATMAWYRQAPEKQREMVATIASGG TTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLTLPEDTAVYYCNAGYLTSLGPKNYWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA SSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
197	EPL34	GGGSQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKLEWVSGIHYTG DWTNYADSVKGRFTISRDNAKNEYLEMNNLKPEDTAVYYCARGSDKGQGTQVTVSSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKLEWVARIR SKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISY WAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTTCASSTGAVT SGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
198	EPL49	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAPSGRTSSIFGMGWFRQAPGKEREFFVASINWSG GSTSYADSVKGRFTISRDNAKNEMYLQMNLSLKFEDTAVYVCAAVALTNKPSWNFWGQGT QVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN FGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA ASSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
199	EPL58	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGPIFSDTIRTMGWYRQAAGKQRELVIATIAS FPSRTNYVDSVKGRFTISRDIKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCNVDLASIPTKTYWGQG TQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHA NFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
200	EPL74	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFGINAMGWYRQAPGKQRESVAFITIGG NTNYLDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLKPEDTAVYYCNTNPPLILTAGGLYWGQGT QVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKG

		LEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC ASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
201	EPL78	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSANRFNINVMGWYRQAPGQQREL VATINIGG STDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQLSDLKPEDTAVYYC NVKLRVSGPTGPNVYWQGG TQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHA NFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
202	EPL82	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCTASGTILSTMAWYRQAPGKQREL VATISRGGTT NYSDSVKGRFAISRDKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNTPLTDYGMGYNWGQGTQVTV SSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNS YISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
203	EPL83	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSIFSLNTLAWYRQAPGRQRD LIARITGGG TTVYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNLMVRHPSGSTYEYWGQGT QVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC ASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
204	EPL86	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDWAMSWVRQAPGKGLEWVSGIHYGD HTTHYADFVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCARGSTKGQGTQVTVSSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISY WAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVT SGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
205	EPL90	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGA FTNYADSVKARFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGHHTINGQGTQ VTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
206	EPL97	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIIFRGTTMGWFRQAPGKQRESVASISPLG TTSYSGSVEGRFTVSRDNAKNTLFLQMNLSLKSEDTAVYYCNAIQVTNVGPRVYWQGTQ

		VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARIIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCA SSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
SEQ NO:	ID	Название гуманизированной анти-ЕрСМ последовательности Аминокислотная последовательность
207	H13	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFAFGNHWMYWRQAPGRGRELVASISSGGSTNY VDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCGTSDNWGQGTTLTVSS
208	H138	EVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFI FRAASMDWYRQFPGNERESIATISSGGFTNY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTTLTVSS
209	H90	EVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFI FRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNY ADSVKARFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTTLTVSS
SEQ NO:	ID	Название гуманизированной анти-CD3/ анти-ЕрСМ последовательности Аминокислотная последовательность
210	H13	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFAFG NHWMYWRQAPGRGRELVASISSGGSTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAED TAVYYCGTSDNWGQGTTLTVSSSHHHHHH*
211	H138	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFI FR AASMDWYRQFPGNERESIATISSGGFTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAED TAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTTLTVSSSHHHHHH*

212	H90	VVGGGGTQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFR AASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTTLTVTVSSHHHHHHH*
Назва- ние анти- ЕрСАМ после- дова- тельно- сти	SEQ ID NO	Последовательность каркаса 1
213	EPL90	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
214	EPL118	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
215	EPL138	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
216	EPL145	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
217	EPL164	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
218	EPL31	QVQLQESGGGLVHTGGSLRLSCAAS
219	EPL55	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
220	EPL57	QVQLQESGGGLVHTGGSLRLSCAFS
221	EPL136	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
222	EPL15	QVQLQESGGGSVLGGSLRLSCAAS
223	EPL34	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS
224	EPL86	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
225	EPL153	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
226	EPL20	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCAAS
227	EPL70	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
228	EPL125	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
229	EPL13	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
230	EPL129	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
231	EPL159	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
232	EPL120	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
233	EPL126	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
234	EPL60	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
235	EPL156	QVQLQESGGGLVQPGASLRVSCAAS
236	EPL2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
237	EPL43	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAAS

238	EPL10	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
239	EPL49	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAPS
240	EPL58	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
241	EPL74	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
242	EPL78	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATS
243	EPL82	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCTAS
244	EPL83	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVS
245	EPL97	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
246	EPL109	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCASS
247	EPL117	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
248	EPL127	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAP
249	EPL152	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVHS
250	EPL189	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
Назва- ние анти- ЕрСАМ после- дова- тельно -сти	SEQ ID NO	Последовательность каркаса 2
EPL90	251	WYRQSPGNERELVA
EPL118	252	WFRQSPGNERELVA
EPL138	253	WYRQFPGNERESIA
EPL145	254	WFRQSPGNERELVA
EPL164	255	WYRQSPGTQPELVA
EPL31	256	WFRQAPGKEREVFA
EPL55	257	WFRQAPGKEREVFA
EPL57	258	WFRQAPGKEREVFA
EPL136	259	WFRQAPGKEREVFA
EPL15	260	WVRQAPGKGLEWVS
EPL34	261	WVRQAPGKGLEWVS
EPL86	262	WVRQAPGKGLEWVS
EPL153	263	WVRQAPGKGLEWVS
EPL20	264	WYRQAPEKQREMVA
EPL70	265	WYRQAPEKXREMVA
EPL125	266	WYRQVPEKQREMVA
EPL13	267	WYRQAPGRGRELVA
EPL129	268	WYRQAPGRGRELVA
EPL159	269	WYRQAPGRGRELVA

EPL120	270	WYRQSPGNERELVA
EPL126	271	WYRQSPGNERELVA
EPL60	272	WYRQAPGKVRELVA
EPL156	273	WYRQAPGKVRELVA
EPL2	274	WYRQAPGKERELVA
EPL43	275	WYRQAPGKERELVA
EPL10	276	WYRQAPGKQHELVA
EPL49	277	WFRQAPGKEREFVA
EPL58	278	WYRQAAGKQRELVA
EPL74	279	WYRQAPGKQRESVA
EPL78	280	WYRQAPGQQRELVA
EPL82	281	WYRQAPGKQRELVA
EPL83	282	WYRQAPGRQDLIA
EPL97	283	WFRQAPGKQRESVA
EPL109	284	WFRQAPGKEREGVS
EPL117	285	WYRQAPGKQREFVA
EPL127	286	WFRQAPGKEREGVS
EPL152	287	WYRQAPGKQRELVA
EPL189	288	WYRQAPGNQRELVA
Назва- ние анти- ЕрСАМ после- дова- тельно -сти	SEQ ID NO	Последовательность каркаса 3
EPL90	289	RFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCGA
EPL118	290	RFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCGA
EPL138	291	RFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCGA
EPL145	292	RFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCGA
EPL164	293	RFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCGA
EPL31	294	RFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA
EPL55	295	RFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA
EPL57	296	RFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAA
EPL136	297	RFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA
EPL15	298	RFTISRDNKNELYLEMNNLKPEDTAVYYCAR
EPL34	299	RFTISRDNKNELYLEMNNLKPEDTAVYYCAR
EPL86	300	RFTISRDDAKNTLYLMNSLKPEDTAVYYCAR
EPL153	301	RFTISRDDAKNTLYLMNSLKPEDTAVYYCEK

EPL20	302	RFTISRDNAKNTVYLMQNTLKPEDTAVYYCNA
EPL70	303	RFTISRDNAKNTVYLMQNTLKPEDTAVYYCNA
EPL125	304	RFTISRDNAKNTVYLMQNTLKPEDTAVYYCNA
EPL13	305	RFTISRDNARNTVYLMYSLKPEDTAVYYCGT
EPL129	306	RFTISRDNARNTVYLMYSLRPEDTAVYYCGT
EPL159	307	RFTISRDNARNTVYLMYSLKPEDTAVYYCGT
EPL120	308	RFTISRDNAKNTGYLMNSLKPEDTAVYFCAA
EPL126	309	RFTISRDNAKNTGYLMNSLKPEDTAVYFCAA
EPL60	310	RFTISRDNDRNTVYLMNRLQPEDTAAYYCNV
EPL156	311	RFTISRDNDRNTVYLMNRLQPEDTAAYYCNV
EPL2	312	RFSISRDNAKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNA
EPL43	313	RFSISRDNAKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNA
EPL10	314	RFTISRDNAKKTVYLMNSLKPDDTAVYYCNA
EPL49	315	RFTISRDNAKNEMYLMNSLKFEDTAVYVCAA
EPL58	316	RFTISRDIKNTVYLMDSLKPEDTAVYYCNV
EPL74	317	RFTISRDNAKNTVYLMNGLKPEDTAVYYCNT
EPL78	318	RFTISRDNAKNTVYMLQLSDLPEDTAVYYCNV
EPL82	319	RFAISRDKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNT
EPL83	320	RFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNL
EPL97	321	RFTVSRDNAKNTLFLQMSLKS EDTAVYYCNA
EPL109	322	RFTISRDNAKNTVDLQMISLRPEDTAVYYCAA
EPL117	323	RFTISRDNKNTVYLMNYLKPEDTAVYYCAT
EPL127	324	RFTISSDNAKNTVYLMNSVKTDDTAVYYCAV
EPL152	325	RFTISRDNANNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNA
EPL189	326	RYAISRDNAKNLVYLMNSLKPEDTDVYYCNA
Назва- ние анти- ЕрСАМ после- дова- тельно -сти	SEQ ID NO	Последовательность каркаса 4
EPL90	327	NGQGTQVTVSS
EPL118	328	YGQGTQVTVSS
EPL138	329	NGQGTQVTVSS
EPL145	330	YGQGTQVTVSS
EPL164	331	YGQGTQVTVSS
EPL31	332	WGQGTQVTVSS
EPL55	333	WGQGTQVTVSS

EPL57	334	WGQGTQVTVSS
EPL136	335	WGQGTQVTVSS
EPL15	336	KGQGTQVTVSS
EPL34	337	KGQGTQVTVSS
EPL86	338	KGQGTQVTVSS
EPL153	339	RGQGTQVTVSS
EPL20	340	WGQGTQVTVSS
EPL70	341	WGQGTQVTVSS
EPL125	342	WGQGTQVTVSS
EPL13	343	WGQGTQVTVSS
EPL129	344	WGQGTQVTVSS
EPL159	345	WGQGTQVTVSS
EPL120	346	WGQGTQVTVSS
EPL126	347	WGQGTQVTVSS
EPL60	348	WGQGTQVTVSS
EPL156	349	WGQGTQVTVSS
EPL2	350	WGQGTQVTVSS
EPL43	351	WGQGTQVTVSS
EPL10	352	WGQGTQVTVSS
EPL49	353	WGQGTQVTVSS
EPL58	354	WGQGTQVTVSS
EPL74	355	WGQGTQVTVSS
EPL78	356	WGQGTQVTVSS
EPL82	357	WGQGTQVTVSS
EPL83	358	WGQGTQVTVSS
EPL97	359	WGQGTQVTVSS
EPL109	360	QGQGTQVTVSS
EPL117	361	WGHGTQVTVSS
EPL127	362	WGQGTQVTVSS
EPL152	363	WGQGTQVTVSS
EPL189	364	WGQGTQVTVSS
SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
365	Линкер	(GS) n
366	Линкер	(GGS) n
367	Линкер	(GGGS) n

368	Линкер	(GGSG) n
369	Линкер	(GGSGG) n
370	Линкер	(GGGGS) n
371	Линкер	(GGGGG) n
372	Линкер	(GGG) n
373	Линкер	GGGSGGGSGGGSGGGGS
374	Линкер	GGGSGGGSGGGGS
375	Линкер	GGGSGGGGS
376	Сортаза	LPETG
377	Гистидино- вая метка	HHHHHH
378	Анти-HSA sdAb клон 10G	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIISGSGRDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLTVSS
379	Анти-CD3, клон 2B2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA TYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQG TLVTVSSGGGSGGGSGGGSGQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNW VQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSN RWVFGGGTKLTVL
380	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGGGLDGNEEPGG
381	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	APGKG
382	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGQDGNEEMGGG
383	Иллюстра- тивная маскирующая	GGQDGNEEGG

	последова- тельность	
384	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGGQDGNEEMGGGGG
385	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	APFGSEM
386	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	AWNGPYE
387	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	AQDNGDTKTG
388	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	AEAKETQG
389	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	ATRREQVEG
390	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	AQAPSQP
391	Иллюстра- тивная маскирующая	ATRSRTRNDG

	последова- тельность	
392	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	ADVDAPDGLG
393	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	AADISDPGG
394	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	ALSVDPSG
395	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	ARLSVDPG
396	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	AVEAADRG
397	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGPDGNEEMGGG
398	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGFDGNEEMGGG
399	Иллюстра- тивная маскирующая	GGGDGNEEMGGG

	последова- тельность	
400	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGEMDGEGQNGG
401	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGGGPDGNEEPGG
402	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGGS LDGNEEPGG
403	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGGALDGNEEPGG
404	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGGGLDGNEEPGG
405	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGALDGNEEPGG
406	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGGGPDGNEEPGGG
407	Иллюстра- тивная маскирующая	GGSGALDGNEEPGG

	последова- тельность	
408	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGSGSLDGNEEPGG
409	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGSGGPDGNEEPGG
410	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGVRDGPDGNEEPGG
411	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGSGGPDGNEEPGGGG
412	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGRGPDGNEEPGG
413	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGSGGLDGNEEPGG
414	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGVGPDGNEEPGG
415	Иллюстра- тивная маскирующая	GGGEGPDGNEEPGG

	последова- тельность	
416	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGVALDGNEEPGG
417	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGRALDGNEEPGG
418	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGYAGLDGNEEPGG
419	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGAGGPDGNEEPGG
420	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGRGGPDGNEEPGG
421	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGGPDGNEEPGGGG
422	Иллюстра- тивная маскирующая последова- тельность	GGGEALDGNEEPGG
423	Иллюстра- тивная маскирующая	GGDASLDGNEEPGG

	последовательность	
424	Иллюстративная маскирующая последовательность	GGRDAPDGNEEGG
425	Иллюстративная последовательность расщепляемого линкера	KRALGLPG
426	Иллюстративная последовательность расщепляемого линкера	(DE) 8RPLALWRS (DR) 8
427	Иллюстративная последовательность расщепляемого линкера	PR (S/T) (L/I) (S/T)
428	Иллюстративная последовательность расщепляемого линкера	LEATA
429	Иллюстративная последовательность расщепляе-	GGAANLVRGG

	мого линкера	
430	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	SGRIGFLRTA
431	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	PLGLAG
432	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	PLGLAX
433	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	PLGC (me) AG
434	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	ESPAYYTA
435	Иллюстра- тивная последова- тельность	RLQLKL

	расщепляе- мого линкера	
436	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	RLQLKAC
437	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	EP (Cit) G (Hof) YL
438	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	SGRSA
439	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	DAFK
440	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	GGRR
441	Иллюстра- тивная последова-	GFLG

	тельность расщепляе- мого линкера	
442	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	ALAL
443	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	FK
444	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	NLL
445	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	PIC (Et) FF
446	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	GGPRGLPG
447	Иллюстра- тивная	HSSKLQ

	последова- тельность расщепляе- мого линкера	
448	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	HSSKLQL
449	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	HSSKLQEDA
450	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	LVLASSSFGY
451	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	GVSQNYPIVG
452	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	GVVQASCRLA

453	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	F(Pip)RS
454	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	DPRSFL
455	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	PPRSFL
456	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	DEVDP
457	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	DEVDP
458	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе-	KGSGDVEG

	мого линкера	
459	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	GWEHDG
460	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	EDDDDKA
461	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	KQEQNPGST
462	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	GKAFRR
463	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	DAFK
464	Иллюстра- тивная последова- тельность	DVLK

	расщепляе- мого линкера	
465	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	DAFK
466	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	ALLLALL
467	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	KPLGLQARVV
468	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	PQASTGRSGG
469	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	PQGSTGRAAG
470	Иллюстра- тивная последова-	PPASSGRAGG

	тельность расщепляе- мого линкера	
471	Иллюстра- тивная последова- тельность расщепляе- мого линкера	PIPVQGRAH
472	Иллюстра- тивная анти- альбумин (HSA) последова- тельность с маскирующим фрагментом (выделено жирным шрифтом и курсивом)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQ GGGGGLDGNEEPGG LEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSS
473	Иллюстра- тивная анти- альбумин (HSA) последова- тельность с маскирующим фрагментом (выделено жирным шрифтом и курсивом) и расщепляе- мым линкером (выделено жирным	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQ GGGGGLDGNEEPGG LEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSGGGG <u>KPLGLQARVV</u> GGGGT

	шрифтом и подчеркиванием)	
474	Иллюстративный анти-CD3 scFv молекулы proTriTAC, содержащей анти-EpCAM-связывающий домен согласно настоящему изобретению	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYW AYWGQGTILVTVSS
475	Человеческая EpCAM	>tr B5MCA4 B5MCA4_HUMAN Молекула адгезии эпителиальных клеток OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPCAM PE=1 SV=1 METKHLGRGGAGRAGPHLWRGPRPNC SAGAGGGEPHSPNSRAVTHQRAPAARECV CEN YKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQN NDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVN TAGVRRTDKDTEITCSEVRRTYWI IELK HKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDL VQNSSQKTQNDVD IADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAG VIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKKRMAKYEKA EIKEMGEMHRELNA
476	EpCAM яванских макак	OS=Macaca fascicularis OX=9541 GN=EPCAM PE=4 SV=1 CVCENYKLAVNCF LNDNGQCQCTSIGAQNTVLC SKLAAKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPE GALQNNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVN TAGVRRTDKDTEITCSEVRRTYWI I IELKHKAREKPYDVQSLRTALEEAIKTRYQLDPKFITN ILYEDNVITIDL VQNSSQKT QNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLRVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQ GLKAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKKRMAKYEKA EIKEMGEIHRELNA
477	Мышиная EpCAM	>sp Q99JW5 EPCAM_MOUSE Молекула адгезии эпителиальных клеток OS=Mus musculus OX=10090 GN=Epcam PE=1 SV=1 MAGPQALAFGLLLAVVTATLAAAQRDCVCDNYKLATSCSLNEYGECQCTSYGTQNTVIC SKLASKCLAMKAEMTHSKSGRRIKPEGAIQNNNDGLYDPDCDEQGLFKAKQCNGTATCWC VNTAGVRRTDKDTEITCSEVRRTYWI I IELKHKERE SPYDHQSLQTALQEAFSTRYKLN QKFIKNIMYENNVITIDLMQNSSQKTQDDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKSMDLRV NGEPLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLTAGIIAVIVVVS LAVIAGIVVLVISTRKKS AKYEKA EIKEMGEIHRELNA

478	Человеческая ЕpCAM	>sp P16422 EPCAM_HUMAN Молекула адгезии эпителиальных клеток OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPCAM PE=1 SV=2 MAPPQVLAFGLLLAAATATFAAAQEEVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVIC SKLAAKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWC VNTAGVRRTDKDTEITCSEVRITYWIIIEELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLD PKFITSILYENNVITIDLQVNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLTVN GEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVISRKKRMA KYEKAEIKEMGEMHRELNA
479	Последовательность внеклеточного домена ЕpCAM человека	QEEVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGSKLGRR KPEGALQNNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSEVRT YWIIIEELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDLQVNSS QKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEF SMQGLK
480	Последовательность внеклеточного домена ЕpCAM яванских макак	QKEVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGSKLGRR KPEGALQNNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSEVRT YWIIIEELKHKAREKPYDVQSLRTALEEAIKTRYQLDPKFITNILEYEDNVITIDLQVNSS QKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLRVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEF SMQGLK
481	Последовательность мышинового внеклеточного домена ЕpCAM	QRDCVCDNYKLATSCSLNEYGECQCTSYGTQNTVICSKLASKCLAMKAEMTHSKSGRRI KPEGAIQNNNDGLYDPDCDEQGLFKAKQCNGTATCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSEVRT YWIIIEELKHKERESPYDHQSLQTLQEAFTSRYKLNQKFIKNIMYENNVITIDLMQNSS QKTQDDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLRVNGEPLDLDPGQTLIYYVDEKAPE FSMQGLT
482	10G sdAb H90 Mask 1	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFGMSWVRQRQSTFMAMDMPILEWSSIS GSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LTVSS
483	10G sdAb H90 Mask 2	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFGMSWVRQQAYWWGNSRDLEWSSISGS GRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LTVTVSS
484	H90 sdAb	EVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNY ADSVKARFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGT LTVTS
485	Иллюстративная конструкция	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYR QSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGA TFLRSDGHHTINGQGT LTVTVSS TSDYKDDDDKTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYKGRGK KLLYIFKQPFMRP

		VQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
486	Иллюстра- тивная конструкция	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSVSSQGTTLTVSSGSGGSGGGGSGGGGSGEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAA SGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTTLTVSSSTSDYKDDDDKTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
487	Иллюстра- тивная конструкция	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVR QRQSTFMAMDMPILEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLTVSSGSGGSGGGGSGGGGSGEVQLLES GGGLVQPGGS LTLSCAASGFI FRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTTLTVSSSTSDYKDDDDKTTTPAP RPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
488	Иллюстра- тивная конструкция	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVR QQAYWWGNSRDLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSVSSQGTTLTVSSGSGGSGGGGSGGGGSGEVQLLES GGGLVQPGGSLT LSCAASGFI FRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTTLTVSSSTSDYKDDDDKTTTPAPRP PTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
489	Иллюстра- тивная конструкция	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVR QRQSTFMAMDMPILEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLTVSSGGGGPQGSTGRAAGGGGGTEVQLLES GGGLVQPG GSLTLSCAASGFI FRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTTLTVSSSTSDYKDDDDKTTTP APRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

490	Иллюстра- тивная конструкция	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QQAYWWGNSRDLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSVSSQGTTLTVSSGGGGPQGSTGRAAGGGGGTEVQLLESGGGLVQPGGS LTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTTLTVSSSTSDYKDDDDKTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
491	Иллюстра- тивная конструкция	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFVNRYSMRWYR QAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCN VNVGFYWGQGTQVTVSSSTSDYKDDDDKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR
492	EpCAM TriTAC	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLTVSSGGG GSGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRA ASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTTLTVSSHHHHH
493	GFP TriTAC	QVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSS YEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLTV VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASS TGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHH
494	EpCAM ProTriTAC L040 (CT)	QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCASTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISY WAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWY RQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCG ATFLRSDGHHTINGQGTTLTVSSHHHHH

495	ЕрСАМ ProTriTAC нерасщепля- емый	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGVVGGGGTQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLV QPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGT LVTVSSHHHHHH
SEQ ID NO:	Название последовательности Анти-ЕрСАМ	Аминокислотная последовательность
496	H138.2	EVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMDWYRQFPGNERESIATISSGGFTNY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGT LVTVS S
497	H90.2	EVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNY ADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGT LVTVS S
SEQ ID NO:	Последовательность ЕрСАМ ProTriTAC (Анти-Alb: Анти-CD3: Анти-ЕрСАМ)	Аминокислотная последовательность
498	Иллюстра- тивный ЕрСАМ ProTriTAC (L040) (H90. 2)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSGGGGPQASTGRSGGGGGTQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLV QPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGT LVTVSSHHHHHH
499	Иллюстра- тивный ЕрСАМ ProTriTAC	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSGGGGPQGSTGRAAGGGGGTQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT

	(L041) (H90.2)	FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKN TAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLTLSCAASGFI FRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGLVTVSSSHHHHHH
500	Иллюстра- тивный ЕрCAM ProTriTAC (L043) (H90.2)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LTVTVSSGGGGPQGSTARSAAGGGGGTQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKN TAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLVTVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLTLSCAASGFI FRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGLVTVSSSHHHHHH*
501	Иллюстра- тивный ЕрCAM ProTriTAC (L001) (H90.2)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LTVTVSSGGGGKPLGLQARVVG GGTQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKN TAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLVTVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLTLSCAASGFI FRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGLVTVSSSHHHHHH
502	Иллюстра- тивное ЕрCAM нерасщепля- емое пролекарст- во (NCLV) (H90.2)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LTVTVSSGGGGSGGGSGGGVGGGGTQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKN TAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLVTVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLTLSCAASGFI FRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGLVTVSSSHHHHHH
SEQ ID NO:	Линкер	Аминокислотная последовательность
503	Иллюстра- тивная линкерная последова- тельность (L040)	GGGGPQASTGRSGGGGGG
504	Иллюстра- тивная	GGGGPQGSGTGRAAGGGGG

	линкерная последова- тельность (L041)	
505	Иллюстра- тивная линкерная последова- тельность (L043)	GGGGPQGSTARSAGGGGG
506	Иллюстра- тивная линкерная последова- тельность (L001)	GGGGKPLGLQARVVGGGG
507	Иллюстра- тивная линкерная последова- тельность (NCLV)	GGGGSGGGSGGVVGGGG
SEQ ID NO:	Последовате- льность ЕрСAM- связывающе- го белка	Аминокислотная последовательность
569	H13 нерасщепля- емое пролекарст- во (NCLV)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGVVGGGGTQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLTLSCAASGFAFGNHWYWRQAPGRGRELVASISSGGSTNYVDSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGTSDNWGQGTTLVTVSSHSHHHH*
570	ЕрСAM-H13 TriTAC (ACT)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGRDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLVTVSSGGG SGGGGQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKLEW

		VARIISKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFAFGN HWMYWRQAPGRGRELVASISSGGSTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCGTSDNWGQGTTLTVSSHHHHHH*
571	EpCAM-H90.2 (CT)	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIISKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFR AASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGTTLTVSSHHHHHH*
572	EpCAM TriTAC- H90.2 (ACT)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTL YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLTVSSGGG GSGGGSTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGG GSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEW VARIISKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRA ASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGTTLTVSSHHHHHH*
573	EpCAM- H138.2 ProTriTAC (NCLV)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LTVTVSSGGGGSGGGSGGVVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIISKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLV QPGGSLTLSCAASGFIFRAASMDWYRQFPGNERESIATISSGGFTNYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGTTLTVSSHHHHHH*
574	EpCAM ProTriTAC- H138.2 (CT)	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLE WVARIISKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFR AASMDWYRQFPGNERESIATISSGGFTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGTTLTVSSHHHHHH*
575	EpCAM H138.2 TriTAC DG/WG	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTL YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLTVSSGGG GSGGGSTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGG GSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEW

		VARIIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRA ASMDWYRQFPGNERESIATISSGGFTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGT LVT VSSHHHHHH*
576	EpCAM H13 Mask27 L040	EVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVT VSSGGGGPQASTGRSGGGGGGSQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLTLSCAASGFAFGNHWMYWRQAPGRGRELVASISSGGSTNYVDSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGTSDNWGQGT LVT VSSHHHHHH*
577	EpCAM H90 Mask27 L040	EVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVT VSSGGGGPQASTGRSGGGGGGTQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGT LVT VSSHHHHHH*
578	EpCAM H90.2 Mask27 L040	EVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSS ISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVT VSSGGGGPQASTGRSGGGGGGSQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGT LVT VSSHHHHHH*
SEQ ID NO:		Аминокислотная последовательность
579	1.7 Bn huEpCAM aa22-265 FLAG huIgG1 Fc (биотин- huEpCAM-Fc)	QEECV CENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGSKLGRRA KPEGALQNNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSEVRT YWIIIE LKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDL VQNSS QKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSHKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEF SMQGLKDYKDDDDKGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA

		VEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
580	1.9-Bn cyEрCAM aa24-265 FLAG huIgG1 Fc (биотин- cyEрCAM-Fc)	QKECVCENYKLAVNCFNLNDNGQCQCTSIGAQNTVLC SKLA AKCLVMKAEMNGSKLGRR A KPEGALQNN DGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVN TAGVRRTDKDTEITC SERVRT YWIIIE LKHKAREKPYDVQSLRTALEEAIKTRYQLDPKFITN ILYEDNVITIDL VQNSS QKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFH SKMDLRVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEF SMQGLKDYKDDDDKGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
581	Линкер	GGGGT
582	Каркас 4 для H90.2 и H138.2	WGQGT LVT VSS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. ЕpCAM-связывающий домен, содержащий определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152.

2. ЕpCAM-связывающий домен по п. 1, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152.

3. ЕpCAM-связывающий домен по п.1 или 2, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497.

4. ЕpCAM-связывающий домен по любому из пп. 1-3, где ЕpCAM-связывающий домен является частью мультиспецифического белка.

5. ЕpCAM-связывающий домен по п. 4, где мультиспецифический белок дополнительно содержит CD3-связывающий домен.

6. ЕpCAM-связывающий домен по п. 5, где мультиспецифический белок содержит форму активного лекарственного средства.

7. ЕpCAM-связывающий домен по п. 4 или 5, где мультиспецифический белок дополнительно содержит домен, связывающий основной сывороточный белок.

8. ЕpCAM-связывающий домен по п. 7, где основной сывороточный белок содержит сывороточный белок альбумин.

9. ЕpCAM-связывающий домен по п. 8, где сывороточный белок альбумин содержит человеческий сывороточный белок альбумин.

10. ЕpCAM-связывающий домен по любому из пп. 7-9, где домен, связывающий основной сывороточный белок, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 378.

11. ЕрСАМ-связывающий домен по любому из пп. 4-9, где CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 379.

12. ЕрСАМ-связывающий домен по любому из пп. 4-9, где мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 492.

13. ЕрСАМ-связывающий домен по любому из пп. 7-9, где домен, связывающий основной сывороточный белок, представляет собой связывающий фрагмент, содержащий линкер и маскирующий фрагмент, где маскирующий фрагмент способен маскировать связывание ЕрСАМ-связывающего домена или CD3-связывающего домена с их соответствующими мишенями.

14. ЕрСАМ-связывающий домен по любому из пп. 7-9 и 13, где мультиспецифический белок содержит форму нерасщепляемого пролекарства.

15. ЕрСАМ-связывающий домен по п. 13 или 14, где маскирующий фрагмент содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 380-424, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 380-424.

16. ЕрСАМ-связывающий домен по любому из пп. 13-15, где линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-507 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-507 и 581.

17. ЕрСАМ-связывающий домен по любому из пп. 13-16, где домен, связывающий основной сывороточный белок, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483.

18. ЕрСАМ-связывающий домен по любому из пп. 5-9 и 13-17, где CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 474.

19. ЕрСАМ-связывающий домен по любому из пп. 7-9 и 13-18, где мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 495, 498-502, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578.

20. ЕрСАМ-связывающий домен по любому из пп. 7-9 и 13-19, где мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере

75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 495 и 502.

21. EpCAM-связывающий домен по любому из пп. 7-9 и 13-20, где мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578.

22. EpCAM-связывающий домен по п. 6, где активное лекарственное средство содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 153-179, 180-206, 210-212, 494, 571 и 574.

23. EpCAM-связывающий домен по любому из пп. 1-3, где EpCAM-связывающий домен является частью химерного антигенного рецептора (CAR) или активируемого при определенных условиях химерного антигенного рецептора (ProCAR), где CAR дополнительно содержит по меньшей мере один из трансмембранного домена, костимулирующего домена и внутриклеточного сигнального домена.

24. EpCAM-связывающий домен по п. 23, где EpCAM-связывающий домен является частью ProCAR, и ProCAR дополнительно содержит (а) связывающий фрагмент, содержащий петлю, не относящуюся к CDR, и расщепляемый линкер, (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, где связывающий фрагмент способен маскировать связывание EpCAM-связывающего домена с его мишенью.

25. EpCAM-связывающий домен по п. 24, где связывающий фрагмент дополнительно содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR).

26. EpCAM-связывающий домен по п. 25, где петля CDR обеспечивает сайт связывания, специфический для основного сывороточного белка.

27. EpCAM-связывающий домен по п. 26, где основной сывороточный белок содержит по меньшей мере один из сывороточного альбумина, трансферрина, IgG1, IgG2, IgG4, IgG3, мономера IgA, фактора XIII, фибриногена, пентамерного IgM.

28. EpCAM-связывающий домен по п. 27, где основной сывороточный белок содержит сывороточный альбумин.

29. EpCAM-связывающий домен по п. 28, где сывороточный альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин.

30. EpCAM-связывающий домен по любому из пп. 23-29, где ProCAR дополнительно содержит костимулирующий домен, где костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен белка, выбранный из группы, состоящей из OX40,

CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

31. ЕрСAМ-связывающий домен по п. 30, где по меньшей мере одна, но не более 20 модификаций содержат модификацию аминокислоты, которая опосредует клеточную передачу сигнала, или модификацию аминокислоты, которая фосфорилируется в ответ на связывание лиганда с кодируемым слитым белком Т-клеточного рецептора.

32. ЕрСAМ-связывающий домен по любому из пп. 23-31, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, выбранный из группы, состоящей из альфа-цепи ТСR, бета-цепи ТСR, дзета-цепи ТСR, субъединицы CD3 эпислон ТСR, субъединицы CD3 гамма ТСR, субъединицы CD3 дельта ТСR, CD45, CD4, CDS, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

33. ЕрСAМ-связывающий домен по любому из пп. 23-32, где внутриклеточный сигнальный домен происходит из CD3 эпислон, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 альфа, CD3 бета или их комбинации.

34. ЕрСAМ-связывающий домен по любому из пп. 23-33, где ЕрСAМ-связывающий домен является частью ProCAR, и где ProCAR содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 485-491.

35. Способ лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение ЕрСAМ-связывающего домена по любому из пп. 1-34 или фармацевтической композиции, содержащей его, субъекту, нуждающемуся в этом.

36. Способ по п. 35, причем субъектом является человек.

37. Активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор (ProCAR), который содержит одну полипептидную цепь, содержащую

(а) связывающий фрагмент, содержащий петлю, не относящуюся к CDR, и расщепляемый линкер,

(б) ЕрСAМ-связывающий домен, где ЕрСAМ-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114 или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152,

(с) трансмембранный домен, и

(d) внутриклеточный сигнальный домен,

где связывающий фрагмент способен маскировать связывание ЕpCAM-связывающего домена с его мишенью.

38. Активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор по п. 37, где ЕpCAM-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497.

39. Активный при определенных условиях ЕpCAM-связывающий белок, содержащий связывающий фрагмент (M), который содержит петлю, не относящуюся к CDR, расщепляемый линкер (L), домен, связывающий первый антиген-мишень, (T1) и домен, связывающий второй антиген-мишень, (T2), где по меньшей мере один из домена, связывающего первый антиген-мишень, (T1) и домена, связывающего второй антиген-мишень, (T2) содержит ЕpCAM-связывающий домен, где ЕpCAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, где петля, не относящаяся к CDR, способна связываться с ЕpCAM-связывающим доменом или доменом, связывающим второй антиген-мишень, и где связывающий фрагмент способен маскировать связывание ЕpCAM-связывающего домена или домена, связывающего второй антиген-мишень, с их мишенями.

40. Активный при определенных условиях ЕpCAM-связывающий белок по п. 39, где связывающий фрагмент содержит маскирующий фрагмент, и где маскирующий фрагмент содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 380-424,

или последовательность, содержащую одну или более замен относительно последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 380-424.

41. Активный при определенных условиях ЕpСAM-связывающий белок по п. 39 или 40, где линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен относительно последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581.

42. Активный при определенных условиях ЕpСAM-связывающий белок по любому из пп. 39-41, где связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483.

43. Активный при определенных условиях ЕpСAM-связывающий белок по любому из пп. 39-42, где домен, связывающий второй антиген-мишень, (Т2) содержит CD3-связывающий домен.

44. Активный при определенных условиях ЕpСAM-связывающий белок по п. 43, где CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 474.

45. Способ лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора по п. 37 или 38 или фармацевтической композиции, содержащей его, субъекту, нуждающемуся в этом.

46. Способ по п. 45, причем субъектом является человек.

47. Способ лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение активного при определенных условиях ЕpСAM-связывающего белка по любому из пп. 39-44 или фармацевтической композиции, содержащей его, субъекту, нуждающемуся в этом.

48. Способ по п. 47, причем субъектом является человек.

49. ЕpСAM-связывающий домен по любому из пп. 1-3, где связывающий домен представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

50. ЕpСAM-связывающий домен по любому из пп. 1-3 и 49, где связывающий домен представляет собой однодоменное антитело, домен VHH, scFv, домен VH, домен VL, Fab, Fab', не относящийся к Ig домен, лиганд, ноттин или низкомолекулярную единицу.

51. ЕpСAM-связывающий домен по п. 50, где связывающий домен содержит однодоменное антитело.

52. ЕpСAM-связывающий домен по любому из пп. 1-3 и 49-51, где связывающий домен связывается с ЕpСAM с аффинностью связывания (K_d) от около 0,001 нМ до около 500 нМ.

53. ЕpСAM-связывающий домен по любому из пп. 1-3 и 49-52, где связывающий домен связывается с человеческим ЕpСAM, мышинным ЕpСAM, ЕpСAM яванских макаков или их комбинацией.

54. Мультиспецифический белок, содержащий ЕpСAM-связывающий домен, где ЕpСAM-связывающий домен представляет собой ЕpСAM-связывающий домен по любому из пп. 1-3 и 49-53.

55. Мультиспецифический белок по п. 54, содержащий ЕpСAM-связывающий домен по любому из пп. 1-3 и 49-53 (анти-ЕpСAM домен) и CD3-связывающий домен (анти-CD3 домен).

56. Мультиспецифический белок по п. 55, где анти-ЕpСAM домен и анти-CD3 домен расположены в анти-ЕpСAM:анти-CD3 ориентации.

57. Мультиспецифический белок по п. 55, где анти-ЕpСAM домен и анти-CD3 домен расположены в анти-CD3: анти-ЕpСAM ориентации.

58. Мультиспецифический белок по любому из пп. 54-56, содержащий ЕpСAM-связывающий домен по любому из пп. 1-3 и 49-53 (анти-ЕpСAM домен), CD3-связывающий домен (анти-CD3 домен) и домен, связывающий альбумин (анти-ALB домен).

59. Мультиспецифический белок по любому из пп. 54-58, где анти-CD3 домен содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO 379 или SEQ ID NO 474.

60. Мультиспецифический белок по любому из пп. 58-59, где анти-ALB домен содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO 375, SEQ ID NO 472, SEQ ID NO 473, SEQ ID NO 482 или SEQ ID NO 483.

61. Мультиспецифический белок по любому из пп. 58-60, где анти-ЕpСAM домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-CD3: анти-ALB: анти-ЕpСAM ориентации.

62. Мультиспецифический белок по любому из пп. 58-60, где анти-ЕpСAM домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ЕpСAM: анти-ALB: анти-CD3 ориентации.

63. Мультиспецифический белок по любому из пп. 58-60, где анти-ЕpСAM домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ALB: анти-ЕpСAM: анти-CD3 ориентации.

64. Мультиспецифический белок по любому из пп. 58-60, где анти-ЕрСAМ домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-CD3: анти-ЕрСAМ: анти-ALB ориентации.

65. Мультиспецифический белок по любому из пп. 58-60, где анти-ЕрСAМ домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ALB: анти-CD3: анти-ЕрСAМ ориентации.

66. Мультиспецифический белок по любому из пп. 58-60, где анти-ЕрСAМ домен, анти-CD3 домен и анти-ALB домен расположены в анти-ЕрСAМ: анти-CD3: анти-ALB ориентации.

67. Мультивалентный белок, содержащий последовательность согласно любому из SEQ ID NO 495, 498-502, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578.

68. Активное лекарственное средство, содержащее последовательность согласно любому из SEQ ID NO 494, 571 и 574.

69. Мультивалентный белок, содержащий последовательность согласно любому из SEQ ID NO 485-491.

70. Фармацевтическая композиция, содержащая (i)(a) ЕрСAМ-связывающий домен по любому из пп. 1-34 и 49-53, (i)(b) активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор по любому из пп. 37-38, (i)(c) активный при определенных условиях ЕрСAМ-связывающий белок по любому из пп. 39-44, (i)(d) мультиспецифический белок по любому из пп. 54-66, (i)(e) мультивалентный белок по п. 67 или 69 или (i)(f) активное лекарственное средство по п. 68 и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

71. Способ получения ЕрСAМ-связывающего домена по любому из пп. 1-3 и 49-53, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЕрСAМ-связывающий домен по любому из пп. 1-3 и 49-53, в условиях, обеспечивающих экспрессию ЕрСAМ-связывающего домена, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры.

72. Способ получения мультиспецифического белка по любому из пп. 54-66, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены мультиспецифического ЕрСAМ-связывающего белка по любому из пп. 54-66 в условиях, обеспечивающих экспрессию мультиспецифического белка, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры.

73. Способ лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение ЕрСАМ-связывающего домена по любому из пп. 1-34 и 49-53 или фармацевтической композиции по п. 70 субъекту, нуждающемуся в этом.

74. Способ лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение мультиспецифического белка по любому из пп. 54-66, мультивалентного белка по п. 67 или 69, активного лекарственного средства по п. 68 или фармацевтической композиции по п. 70 субъекту, нуждающемуся в этом.

75. Способ по п. 73 или 74, причем субъектом является человек.

76. Способ по п. 75, причем способ дополнительно предусматривает введение агента в комбинации с ЕрСАМ-связывающим доменом по любому из пп. 1-34 и 49-53, мультиспецифическим белком по любому из пп. 54-66, мультивалентным белком по п. 67 или 69, активным лекарственным средством по п. 68 или фармацевтической композицией по п. 70.

77. Способ по любому из пп. 73-76, причем ЕрСАМ-связывающий домен селективно связывается с опухолевыми клетками, экспрессирующими ЕрСАМ.

78. Способ по любому из пп. 73-77, причем опухолевое заболевание содержит заболевание, связанное с солидной опухолью.

79. Способ по п. 78, причем заболевание, связанное с солидной опухолью, является метастатическим.

80. Способ по любому из пп. 73-79, причем опухолевое заболевание содержит по меньшей мере одно из колоректального рака, рака предстательной железы, нейроэндокринного рака, рака щитовидной железы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака эндометрия, рака поджелудочной железы, рака желчных протоков, рака желчного пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, аденокарциномы.

81. Способ по любому из пп. 45-48, причем способ дополнительно предусматривает введение агента в комбинации с активным при определенных условиях химерным антигенным рецептором по п. 37 или 38, активным при определенных условиях ЕрСАМ-связывающим белком по любому из пп. 39-44 или фармацевтической композицией, содержащей их.

82. Способ по п. 81, причем ЕрСАМ-связывающий домен селективно связывается с опухолевыми клетками, экспрессирующими ЕрСАМ.

83. Способ по п. 81 или 82, причем опухолевое заболевание содержит заболевание, связанное с солидной опухолью.

84. Способ по п. 83, причем заболевание, связанное с солидной опухолью, является метастатическим.

85. Способ по любому из пп. 81-84, причем опухолевое заболевание представляет собой по меньшей мере одно из колоректального рака, рака предстательной железы, нейроэндокринного рака, рака щитовидной железы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака эндометрия, рака поджелудочной железы, рака желчных протоков, рака желчного пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, аденокарциномы.

86. Способ получения активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора по любому из пп. 37-38, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор по любому из пп. 37-38, в условиях, обеспечивающих экспрессию активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры.

87. Способ получения активного при определенных условиях ЕрСAM-связывающего белка по любому из пп. 39-44, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены активного при определенных условиях ЕрСAM-связывающего белка по любому из пп. 39-44, в условиях, обеспечивающих экспрессию активного при определенных условиях ЕрСAM-связывающего белка, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры.

88. Способ получения мультивалентного белка по п. 67 или 69, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены мультивалентного белка по п. 67 или 69, в условиях, обеспечивающих экспрессию мультивалентного белка, и выделение, и очистку продуцированного белка из культуры.

89. Способ получения активного лекарственного средства по п. 68, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены активного лекарственного средства по п. 68, в условиях, обеспечивающих экспрессию активного лекарственного средства, и выделение, и очистку полученного лекарственного средства из культуры.

90. Клетка, содержащая CAR по любому из пп. 23 и 30-33.
91. Клетка, содержащая ProCAR по любому из пп. 23-33 и 37-38.
92. Клетка по п. 90 или 91, где клетка представляет собой Т-клетку или NK-клетку.
93. Способ, предусматривающий трансфекцию клетки по любому из пп. 90-92 вектором или РНК, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR или ProCAR.
94. Активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор по п. 37 или 38, где активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор имеет более высокий терапевтический индекс по сравнению с химерным антигенным рецептором (CAR), который не содержит (а) связывающий фрагмент, но в остальном идентичен активному при определенных условиях химерному антигенному рецептору.
95. Активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор по п. 94, где активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор имеет терапевтический индекс, который в по меньшей мере от около 5 раз до около 100 раз выше, чем терапевтический индекс химерного антигенного рецептора (CAR), который не содержит (а) связывающий фрагмент, но в остальном идентичен активному при определенных условиях химерному антигенному рецептору.
96. Активный при определенных условиях EpCAM-связывающий белок по любому из пп. 39-44, где белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578.
97. Активный при определенных условиях EpCAM-связывающий белок по п. 96, где белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности согласно SEQ ID NO 576.
98. Активный при определенных условиях EpCAM-связывающий белок по п. 97, где белок содержит последовательность согласно SEQ ID NO 576.
99. Активный при определенных условиях EpCAM-связывающий белок по любому из пп. 39-44 и 96-98, где активный при определенных условиях EpCAM-связывающий белок имеет более высокий терапевтический индекс по сравнению с EpCAM-связывающим белком, который не содержит связывающий фрагмент (M) или расщепляемый линкер (L), но в остальном идентичен активному при определенных условиях EpCAM-связывающему белку.
100. Активный при определенных условиях EpCAM-связывающий белок по п. 99, где активный при определенных условиях EpCAM-связывающий белок имеет терапевтический индекс, который в по меньшей мере от около 5 раз до около 100 раз выше,

чем терапевтический индекс ЕрСАМ-связывающего белка, который не содержит связывающий фрагмент (М) или расщепляемый линкер (L), но в остальном идентичен активному при определенных условиях ЕрСАМ-связывающему белку.

101. Фармацевтическая композиция, содержащая: (i)(a) активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор по п. 94 или 95 или (i)(b) активный при определенных условиях ЕрСАМ-связывающий белок по п. 99 или 100, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

102. Способ лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора по п. 94 или 95, или фармацевтической композиции по п. 101 субъекту, нуждающемуся в этом.

103. Способ лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение активного при определенных условиях ЕрСАМ-связывающего белка по п. 99 или 100, или фармацевтической композиции по п. 101 субъекту, нуждающемуся в этом.

104. Способ по п. 102 или 103, причем субъектом является человек.

105. Способ по любому из пп. 102-104, причем опухолевое заболевание содержит по меньшей мере одно из колоректального рака, рака предстательной железы, нейроэндокринного рака, рака щитовидной железы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака эндометрия, рака поджелудочной железы, рака желчных протоков, рака желчного пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, аденокарциномы.

106. Способ повышения терапевтического индекса ЕрСАМ-связывающего домена, причем способ предусматривает конъюгирование ЕрСАМ-связывающего домена со связывающим фрагментом, содержащим расщепляемый линкер и петлю, не относящуюся к CDR,

- где петля, не относящаяся к CDR, содержит сайт связывания, специфический для ЕрСАМ-связывающего домена,

- где ЕрСАМ-связывающий домен замаскирован от связывания с его мишенью связывающим фрагментом,

- где ЕрСАМ-связывающий домен способен связываться с его мишенью при расщеплении расщепляемого линкера.

107. Способ по п. 106, причем ЕрСАМ-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или

последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152.

108. Способ по п. 106 или 107, причем EpCAM-связывающий домен, конъюгированный со связывающим фрагментом, является частью активного при определенных условиях мультиспецифического белка, где мультиспецифический белок дополнительно содержит CD3-связывающий домен.

109. Способ по любому из пп. 106-108, причем связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483.

110. Способ по п. 108 или 109, причем CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 379 и 474.

111. Способ по любому из пп. 106-110, причем расщепляемый линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-507 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581.

112. Способ по любому из пп. 106-111, причем EpCAM-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497.

113. Способ по любому из пп. 106-112, причем активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578.

114. Способ по любому из пп. 106-113, причем активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична SEQ ID NO 576.

115. Способ по любому из пп. 106-114, причем активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность согласно SEQ ID NO 576.

116. Способ по п. 106, причем ЕpСAМ-связывающий домен, конъюгированный со связывающим фрагментом, является частью активного при определенных условиях химерного антигенного рецептора, где активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор дополнительно содержит по меньшей мере один из трансмембранного домена, внутриклеточного сигнального домена и костимулирующего домена.

117. Способ по п. 116, причем ЕpСAМ-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152.

118. Способ по п. 116 или 117, причем связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483.

119. Способ по любому из пп. 116-118, причем ЕpСAМ-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497.

120. Способ по любому из пп. 116-119, причем активный при определенных условиях химерный антигенный рецептор содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 485-491.

121. Способ повышения терапевтического индекса ЕpСAМ-связывающего белка, содержащего домен, связывающий первый антиген-мишень, и домен, связывающий второй антиген-мишень, где по меньшей мере один из домена, связывающего первый антиген-мишень, и домена, связывающего второй антиген-мишень, содержит ЕpСAМ-связывающий домен, причем способ предусматривает конъюгирование домена, связывающего первый антиген-мишень, или домена, связывающего второй антиген-мишень, со связывающим фрагментом, содержащим расщепляемый линкер и петлю, не относящуюся к CDR,

- где петля, не относящаяся к CDR, содержит сайт связывания, специфический для домена, связывающего первый антиген-мишень, или домена, связывающего второй антиген-мишень,

- где по меньшей мере один из домена, связывающего первый антиген-мишень, или домена, связывающего второй антиген-мишень, замаскирован от связывания с его мишенью посредством связывающего фрагмента, и

- где домен, связывающий первый антиген-мишень, или домен, связывающий второй антиген-мишень, который замаскирован, способен связываться с его мишенью при расщеплении расщепляемого линкера.

122. Способ по п. 121, причем EpCAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152.

123. Способ по п. 121 или 122, причем петля, не относящаяся к CDR, содержит сайт связывания, специфический для EpCAM-связывающего домена.

124. Способ по п. 121 или 122, причем по меньшей мере один из домена, связывающего первый антиген-мишень, или домена, связывающего второй антиген-мишень, содержит CD3-связывающий домен.

125. Способ по п. 124, причем петля, не относящаяся к CDR, содержит сайт связывания, специфический для CD3-связывающего домена.

126. Способ по п. 125, причем CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична SEQ ID NO 474.

127. Способ по любому из пп. 121-126, причем связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483.

128. Способ по любому из пп. 121-127, причем EpCAM-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497.

129. Способ по любому из пп. 121-128, причем расщепляемый линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581.

130. Способ по любому из пп. 121-129, причем активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578.

131. Способ по любому из пп. 121-130, причем активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична SEQ ID NO 576.

132. Способ по любому из пп. 121-131, причем активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность согласно SEQ ID NO 576.

133. Способ повышения терапевтического индекса ЕpСAM-связывающего белка, содержащего ЕpСAM-связывающий домен и CD3-связывающий домен, причем способ предусматривает конъюгирование CD3-связывающего домена со связывающим фрагментом, содержащим расщепляемый линкер и петлю, не относящуюся к CDR, где петля, не относящаяся к CDR, содержит сайт связывания, специфический для CD3-связывающего домена.

134. Способ по п. 133, причем ЕpСAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152.

135. Способ по п. 133 или 134, причем CD3-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична SEQ ID NO 474.

136. Способ по любому из пп. 133-135, причем связывающий фрагмент содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483.

137. Способ по любому из пп. 133-136, причем EpCAM-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497.

138. Способ по любому из пп. 133-137, причем расщепляемый линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581.

139. Способ по любому из пп. 133-138, причем активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578.

140. Способ по любому из пп. 133-139, причем активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична SEQ ID NO 576.

141. Способ по любому из пп. 133-140, причем активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность согласно SEQ ID NO 576.

142. EpCAM-нацеленный активный при определенных условиях мультиспецифический белок, содержащий EpCAM-связывающий домен, CD3-связывающий домен, домен, связывающий альбумин, где домен, связывающий альбумин, содержит петлю, не относящуюся к CDR, которая содержит сайт связывания, специфический для CD3-связывающего домена, и расщепляемый линкер, где EpCAM-связывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 39-76, CDR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 77-114, и CDR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 115-152.

143. EpCAM-нацеленный активный при определенных условиях мультиспецифический белок по п. 142, где домен, связывающий альбумин, содержит

последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 472-473 и 482-483.

144. ЕрСAМ-нацеленный активный при определенных условиях мультиспецифический белок по п. 142 или 143, где ЕрСAМ-связывающий домен содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 1-38, 207-209 и 496-497.

145. ЕрСAМ-нацеленный активный при определенных условиях мультиспецифический белок по любому из пп. 142-144, где расщепляемый линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581, или последовательность, содержащую одну или более замен в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 425-471, 503-506 и 581.

146. ЕрСAМ-нацеленный активный при определенных условиях мультиспецифический белок по любому из пп. 142-145, где активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 498-501, 569-570, 572, 573, 575, 576, 577 и 578.

147. ЕрСAМ-нацеленный активный при определенных условиях мультиспецифический белок по любому из пп. 142-146, где активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична SEQ ID NO 576.

148. ЕрСAМ-нацеленный активный при определенных условиях мультиспецифический белок по любому из пп. 142-147, где активный при определенных условиях мультиспецифический белок содержит последовательность согласно SEQ ID NO 576.

149. Фармацевтическая композиция, содержащая ЕрСAМ-нацеленный активный при определенных условиях мультиспецифический белок по любому из пп. 142-148.

150. Фармацевтическая композиция по п. 149, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

151. Способ получения ЕрСAМ-нацеленного активного при определенных условиях мультиспецифического белка по любому из пп. 142-148, причем указанный способ предусматривает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены ЕрСAМ-нацеленного активного при определенных условиях мультиспецифического белка по любому из пп. 142-148, в

условиях, обеспечивающих экспрессию ЕрСАМ-нацеленного активного при определенных условиях мультиспецифического белка, и выделение и очистку продуцированного белка из культуры.

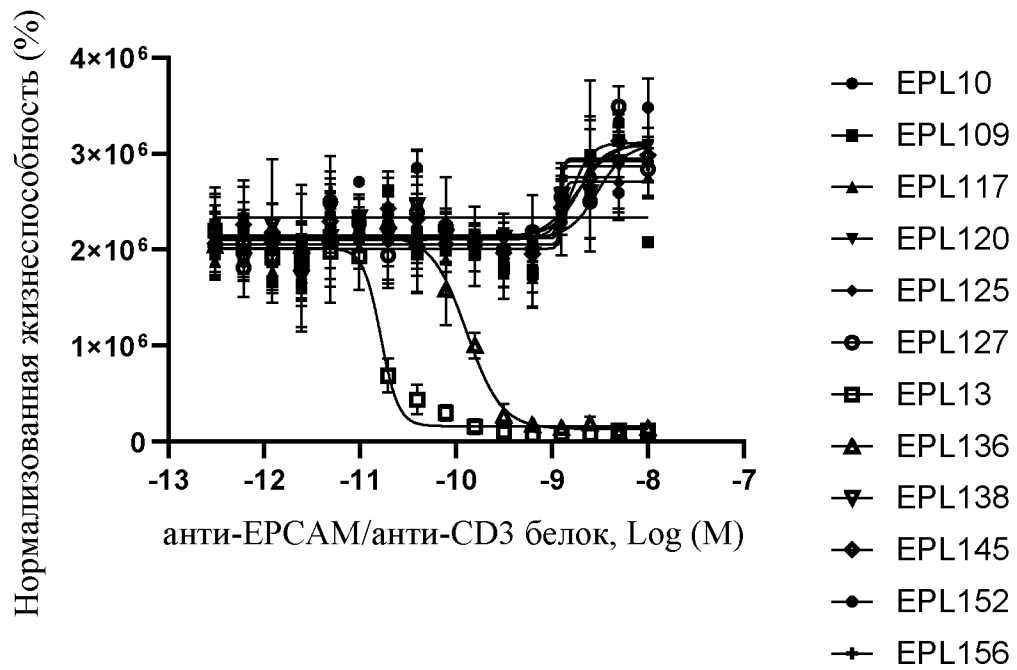
152. Способ лечения или облегчения пролиферативного заболевания или опухолевого заболевания, предусматривающий введение ЕрСАМ-нацеленного активного при определенных условиях мультиспецифического белка по любому из пп. 142-148 или фармацевтической композиции по п. 149 или 150 субъекту, нуждающемуся в этом.

153. Способ по п. 152, причем опухолевое заболевание содержит заболевание, связанное с солидной опухолью.

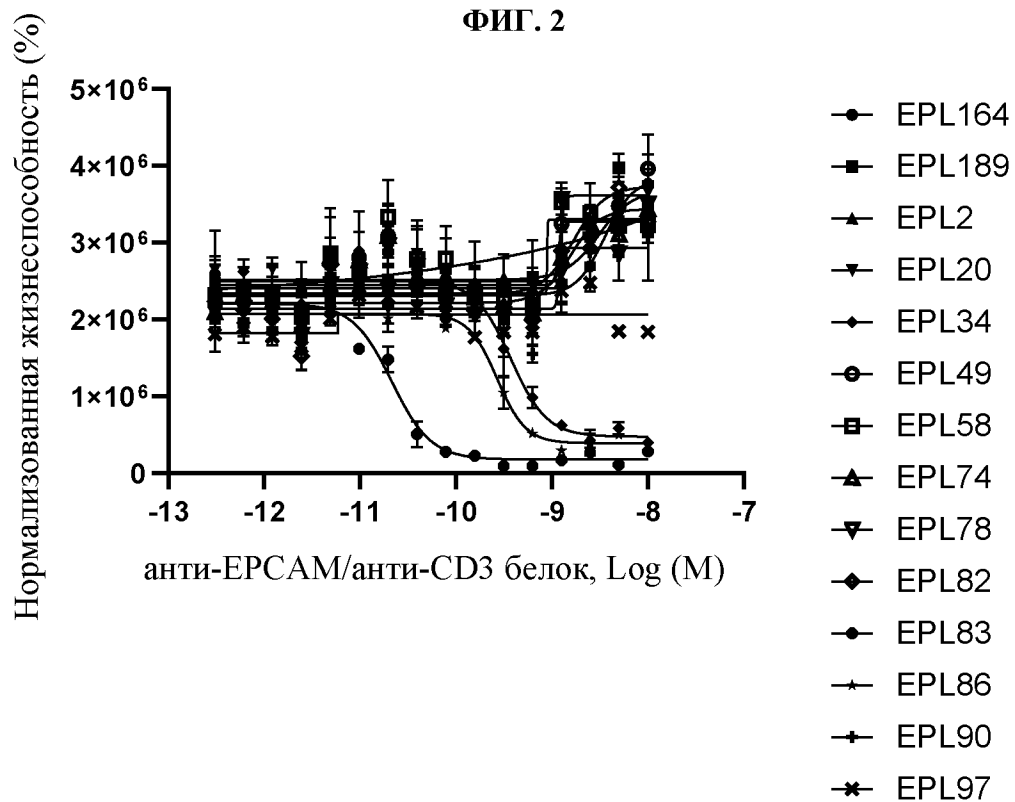
154. Способ по п. 153, причем заболевание, связанное с солидной опухолью, является метастатическим.

155. Способ по любому из пп. 152-154, причем опухолевое заболевание содержит по меньшей мере одно из колоректального рака, рака предстательной железы, нейроэндокринного рака, рака щитовидной железы, мелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака эндометрия, рака поджелудочной железы, рака желчных протоков, рака желчного пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, аденокарциномы.

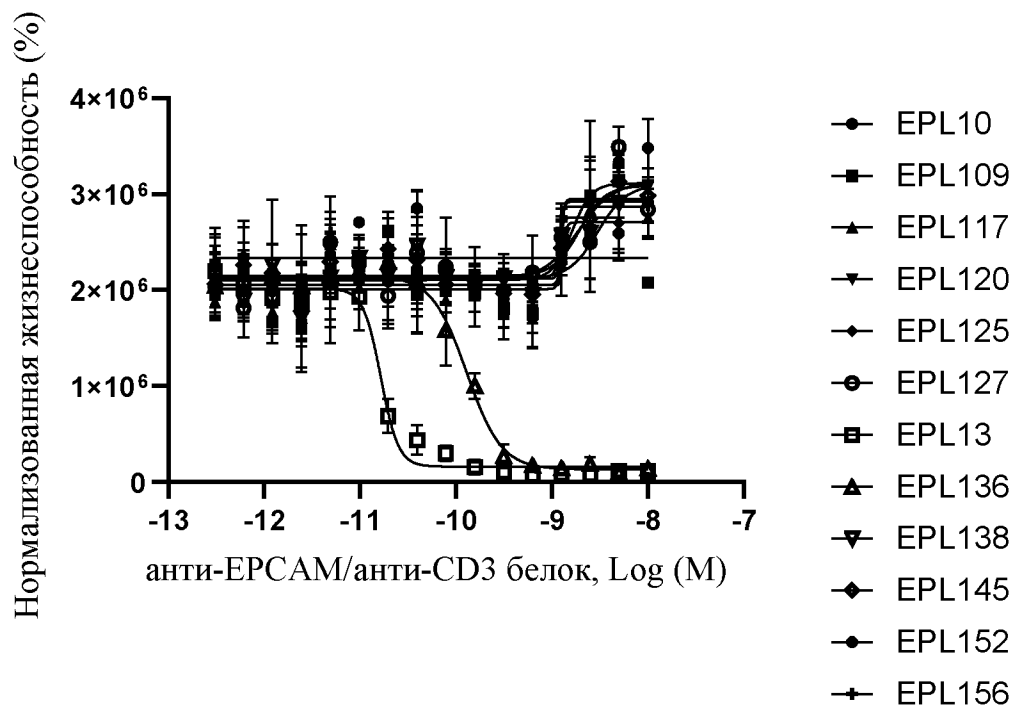
ФИГ. 1



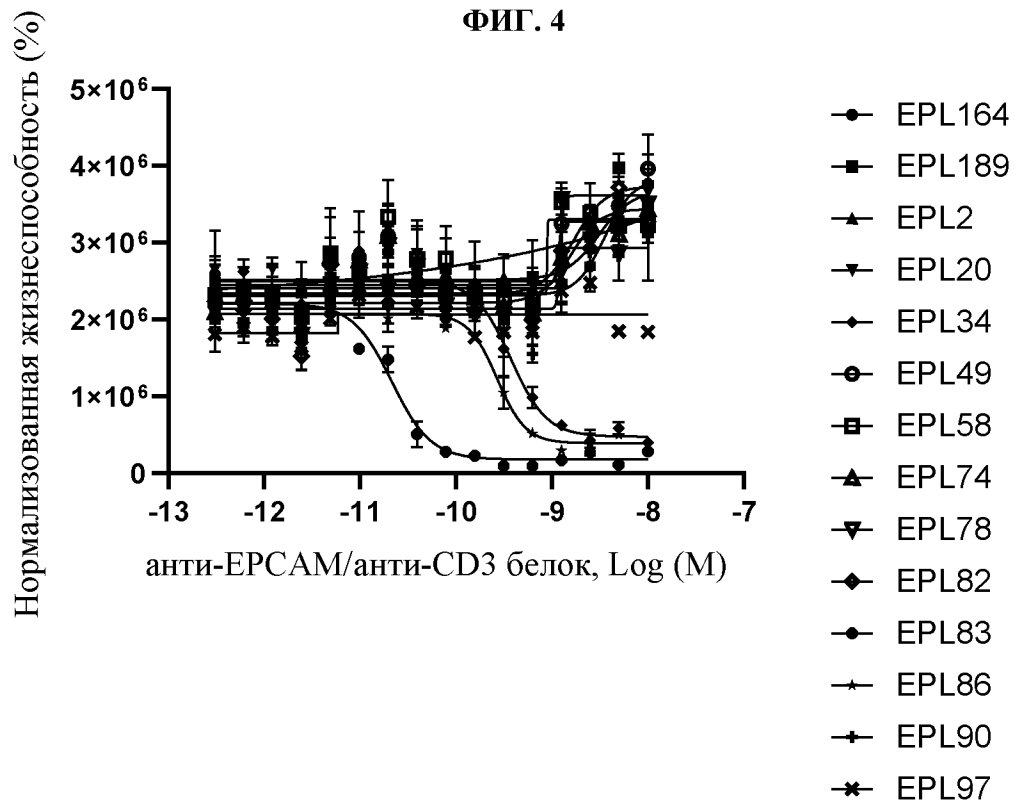
ФИГ. 2



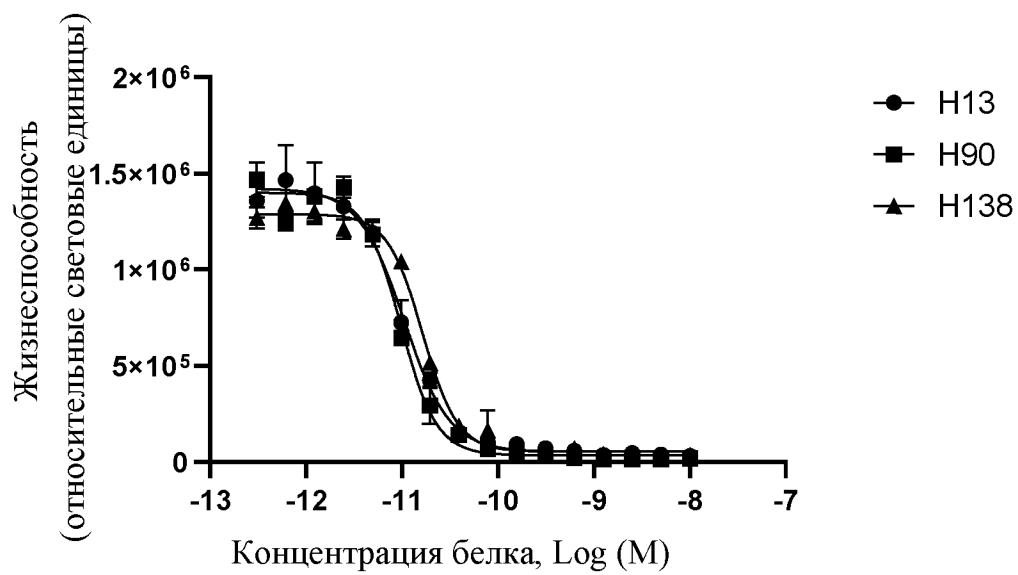
ФИГ. 3

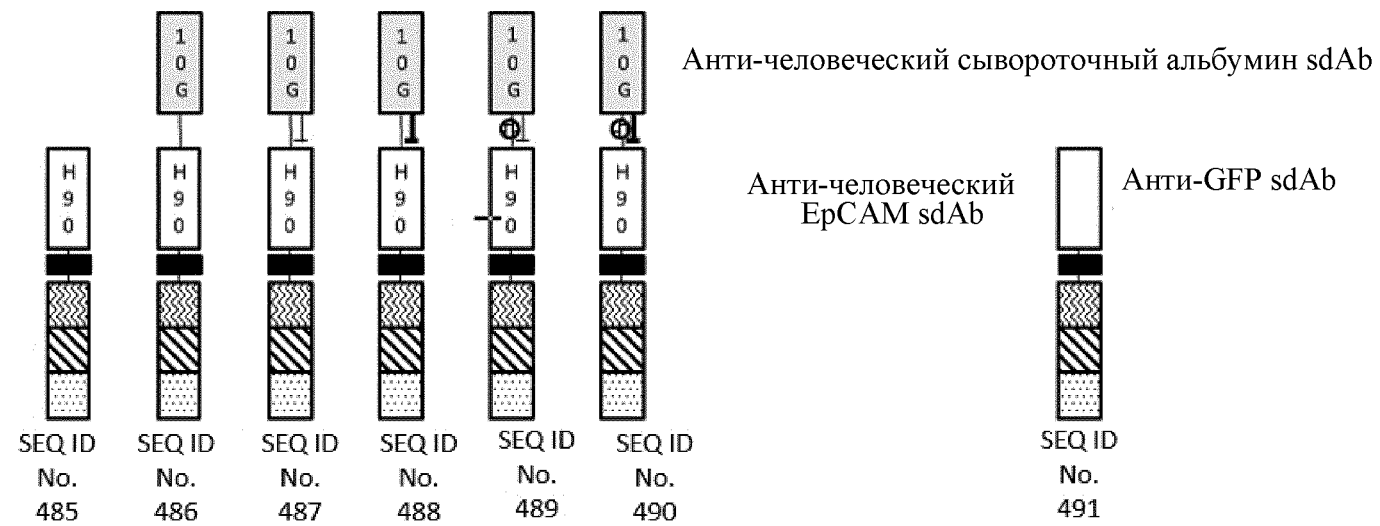


ФИГ. 4

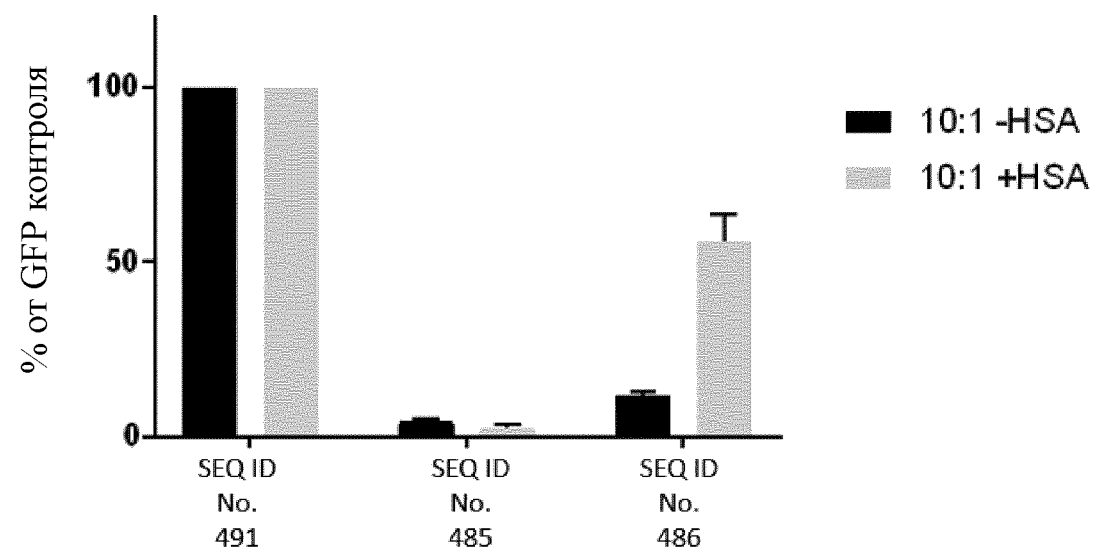


ФИГ. 5

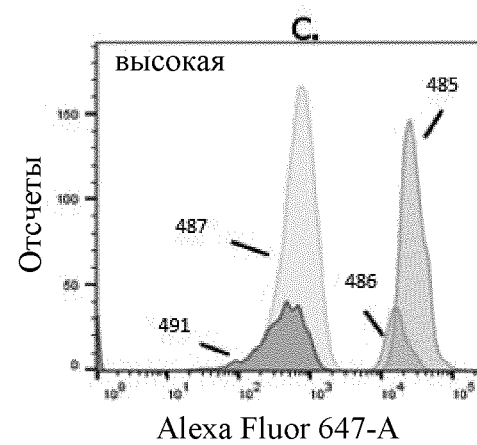
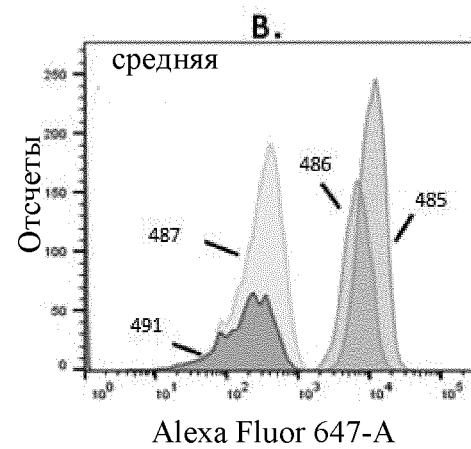
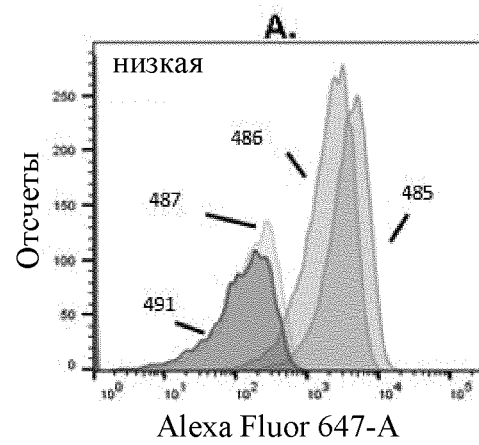




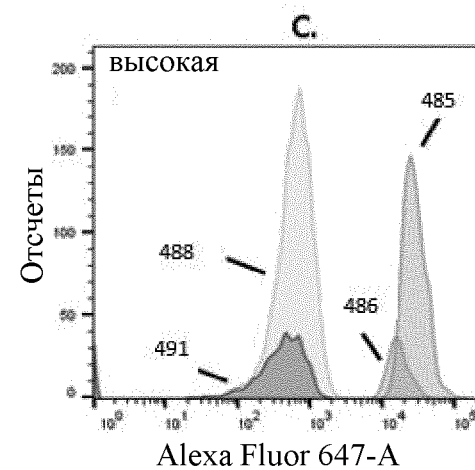
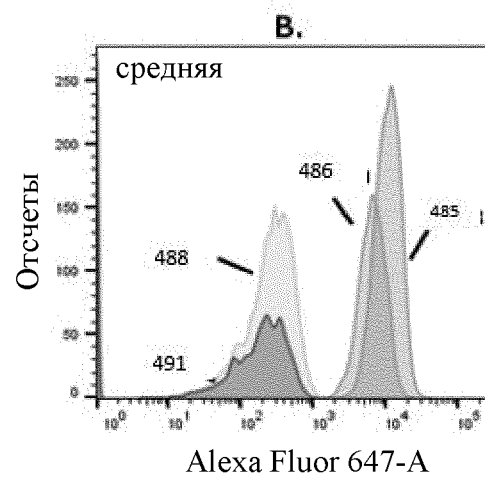
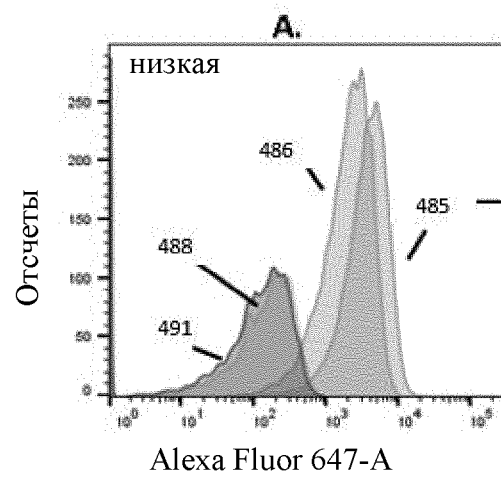
ФИГ. 6



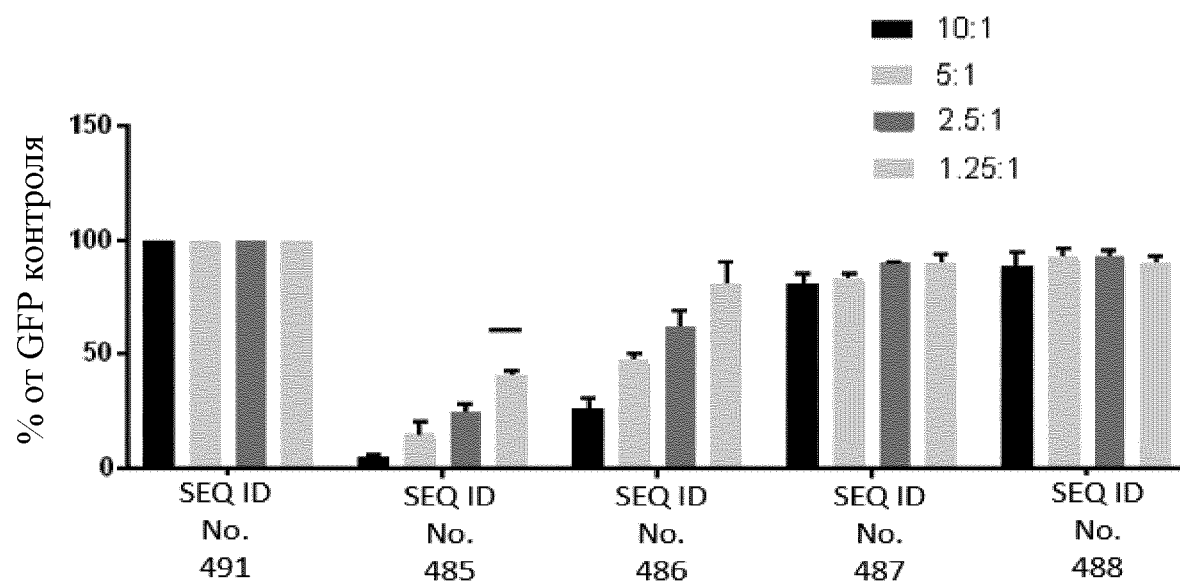
ФИГ. 7



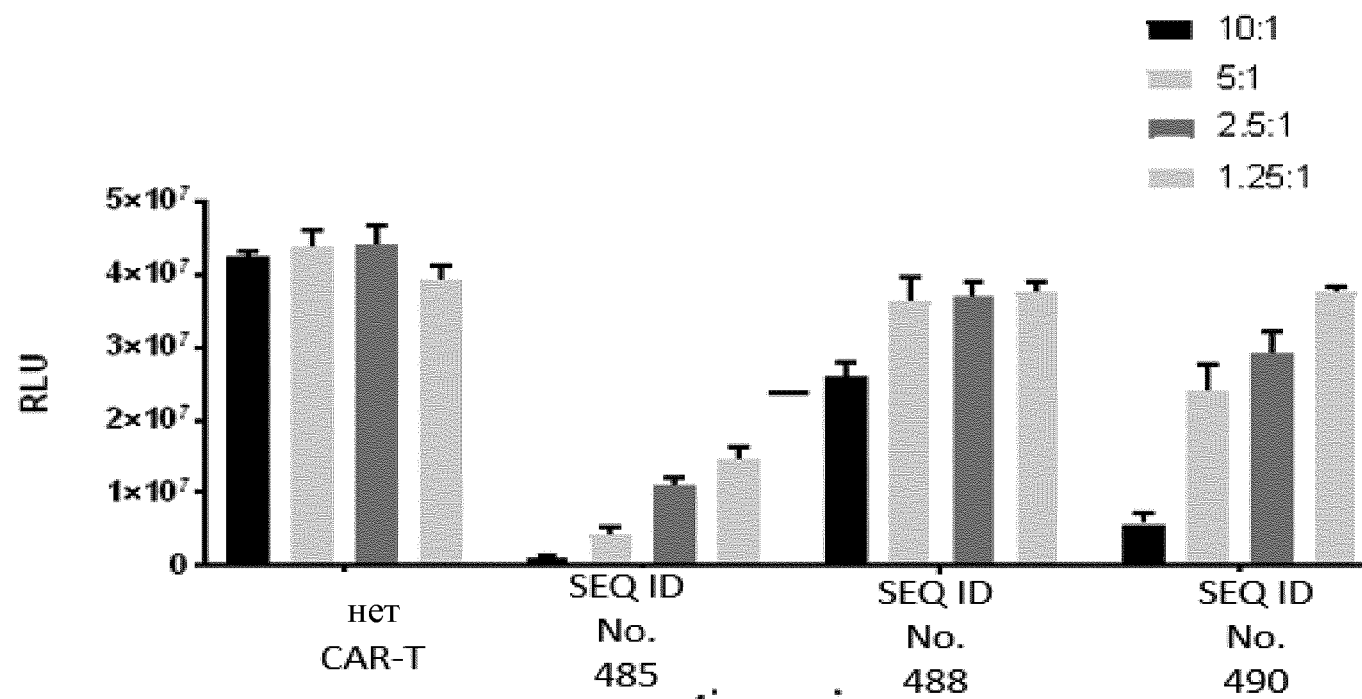
ФИГ. 8



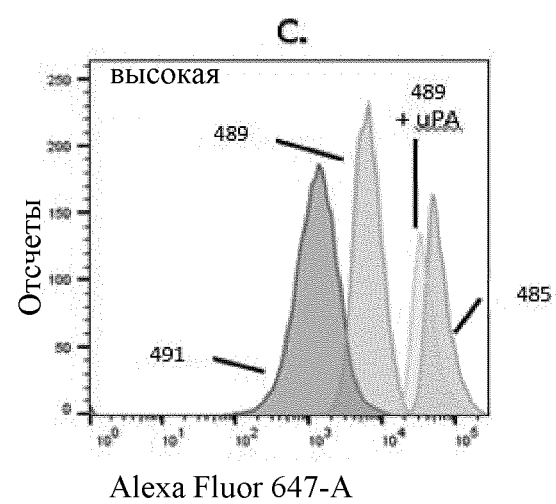
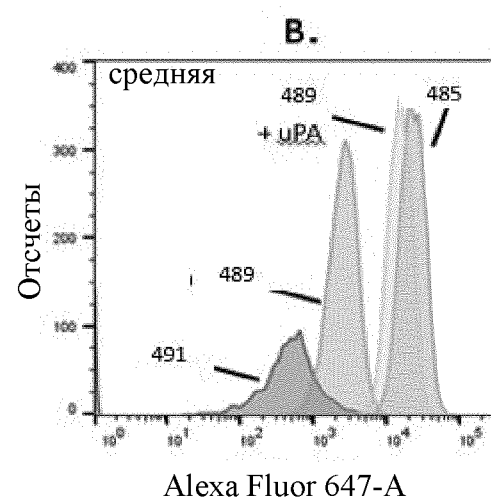
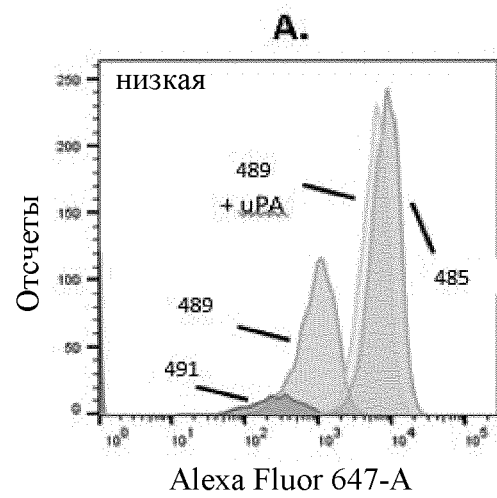
ФИГ. 9



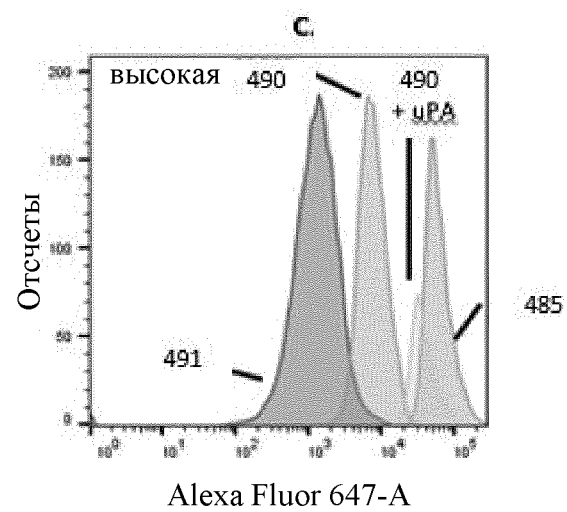
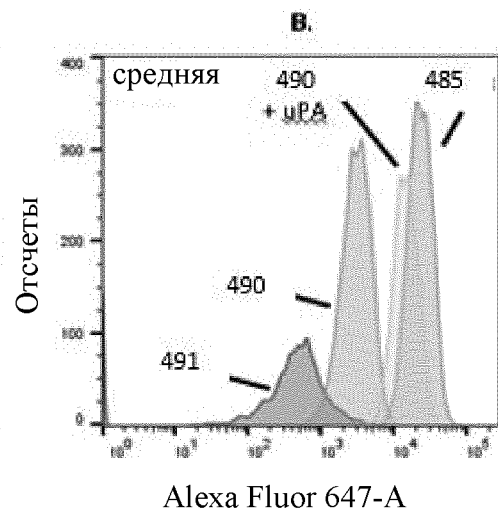
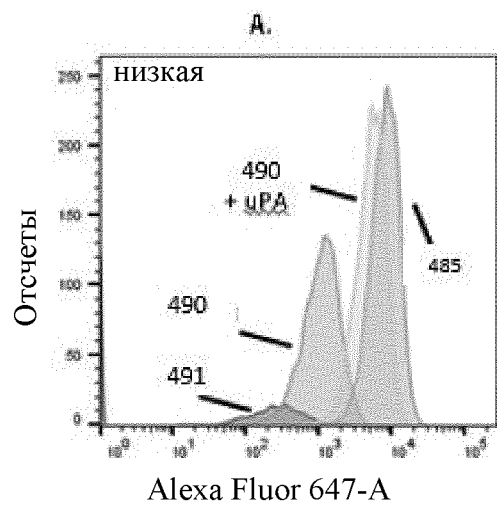
ФИГ. 10



ФИГ. 11



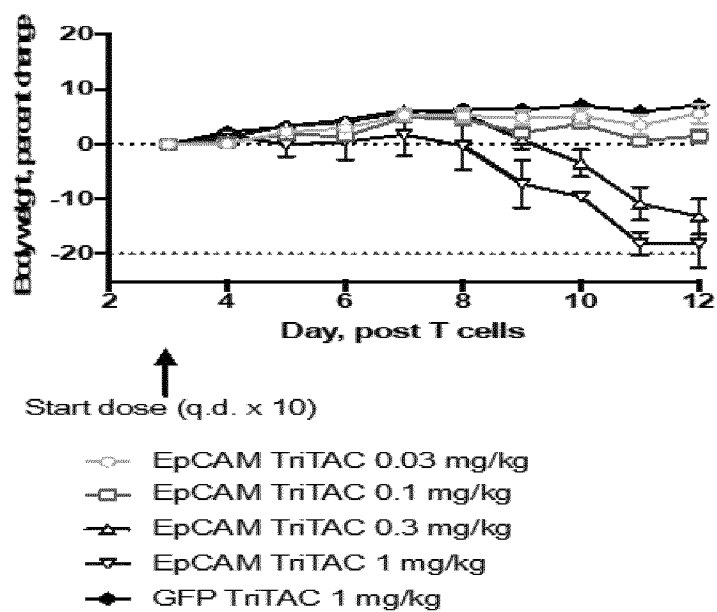
ФИГ. 12



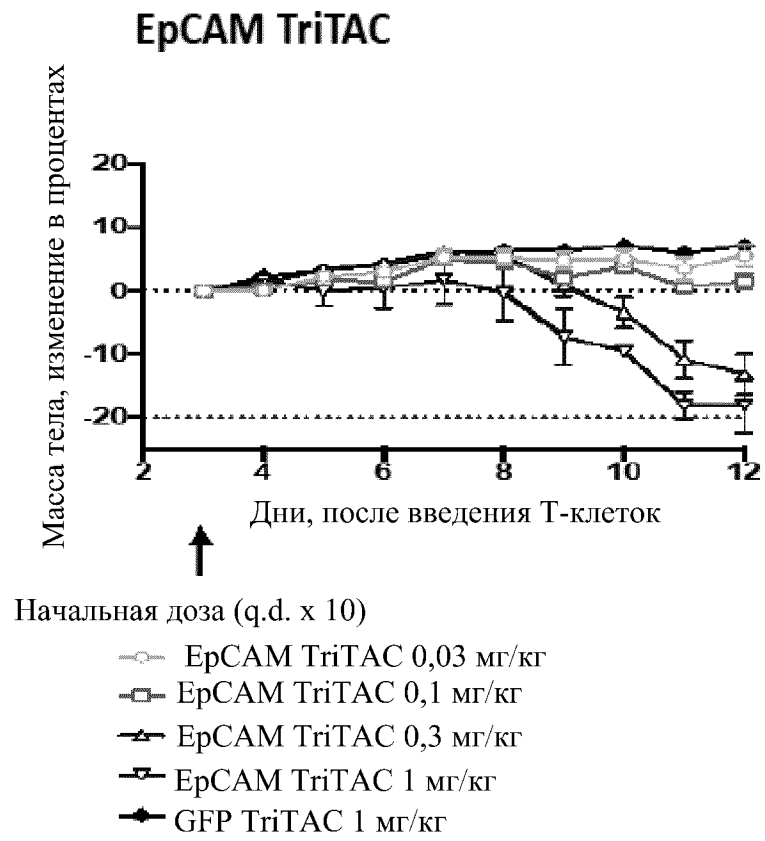
ФИГ. 13

ФИГ. 14А

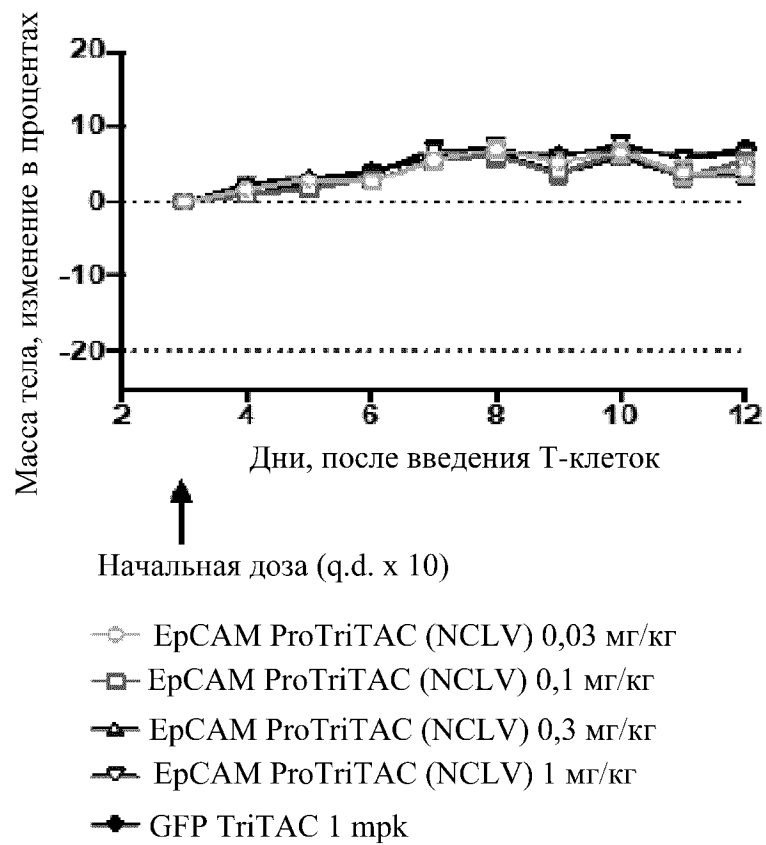
EpCAM TriTAC



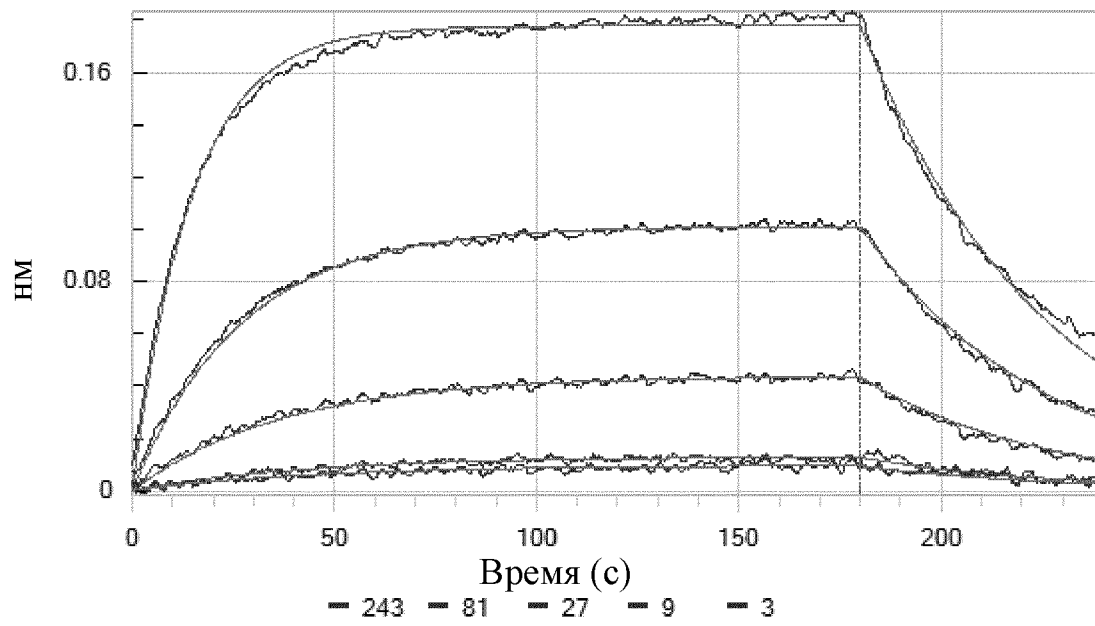
ФИГ. 14В



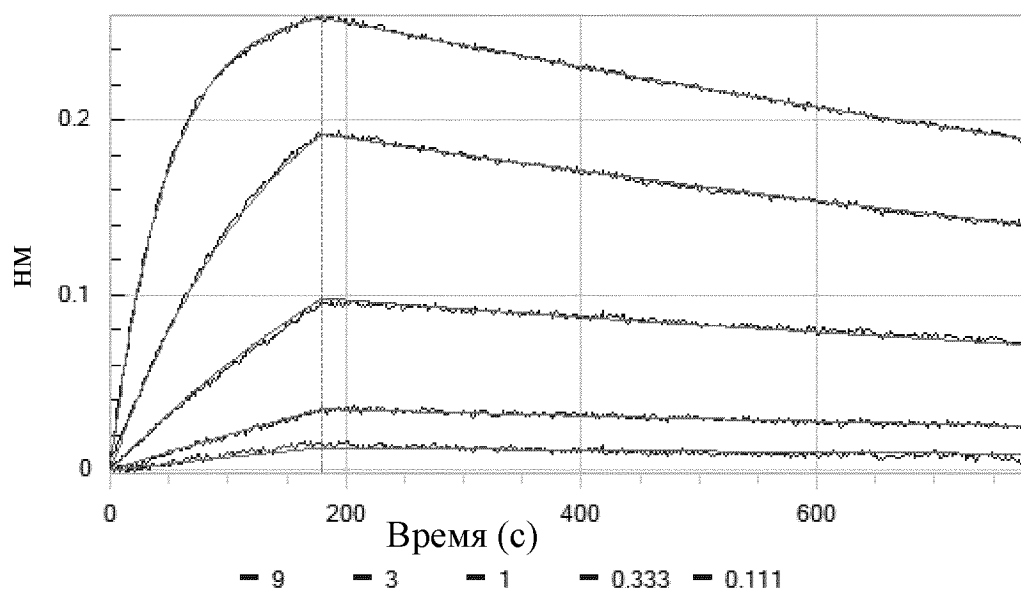
ФИГ. 14С

EpCAM ProTriTAC (NCLV)

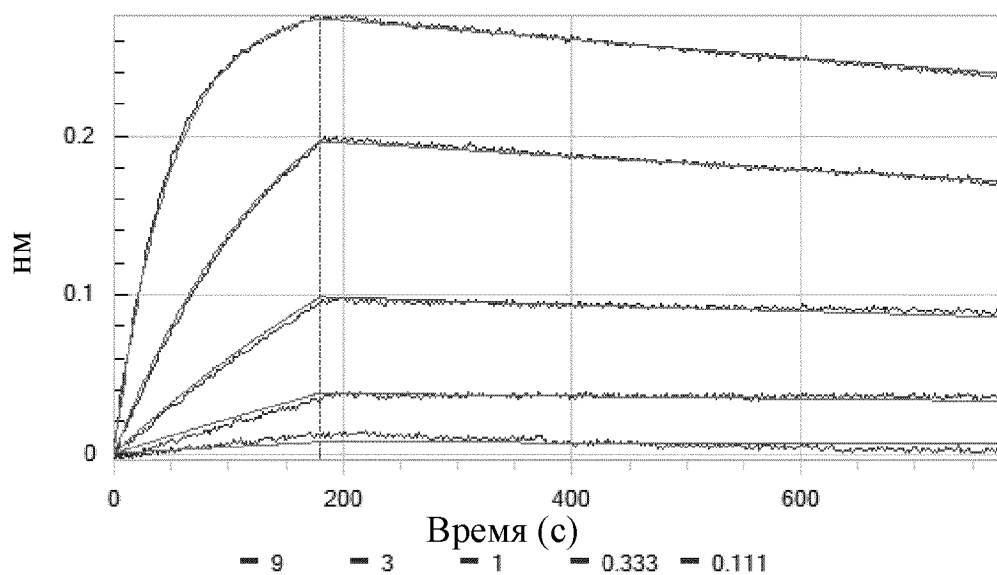
ФИГ. 15А



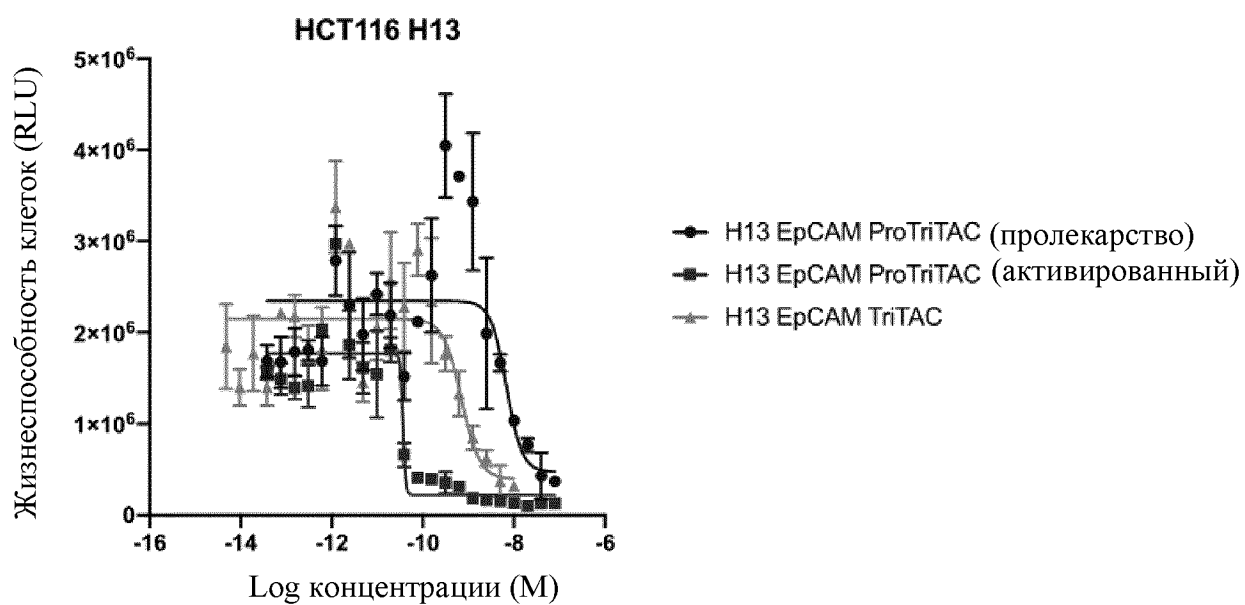
ФИГ. 15В



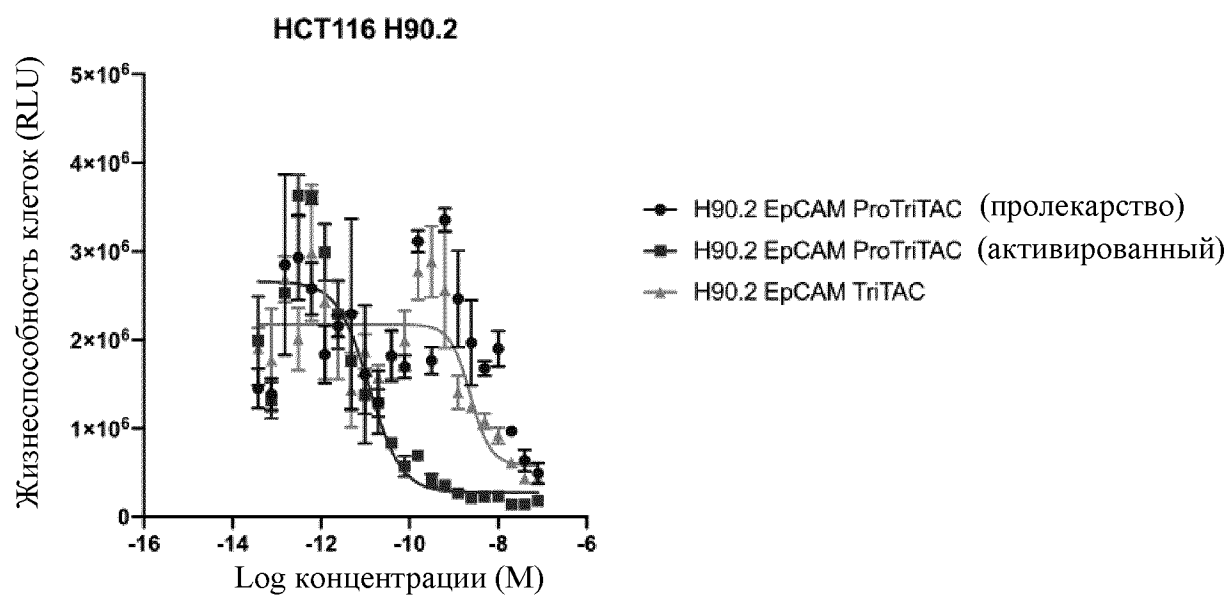
ФИГ. 15С



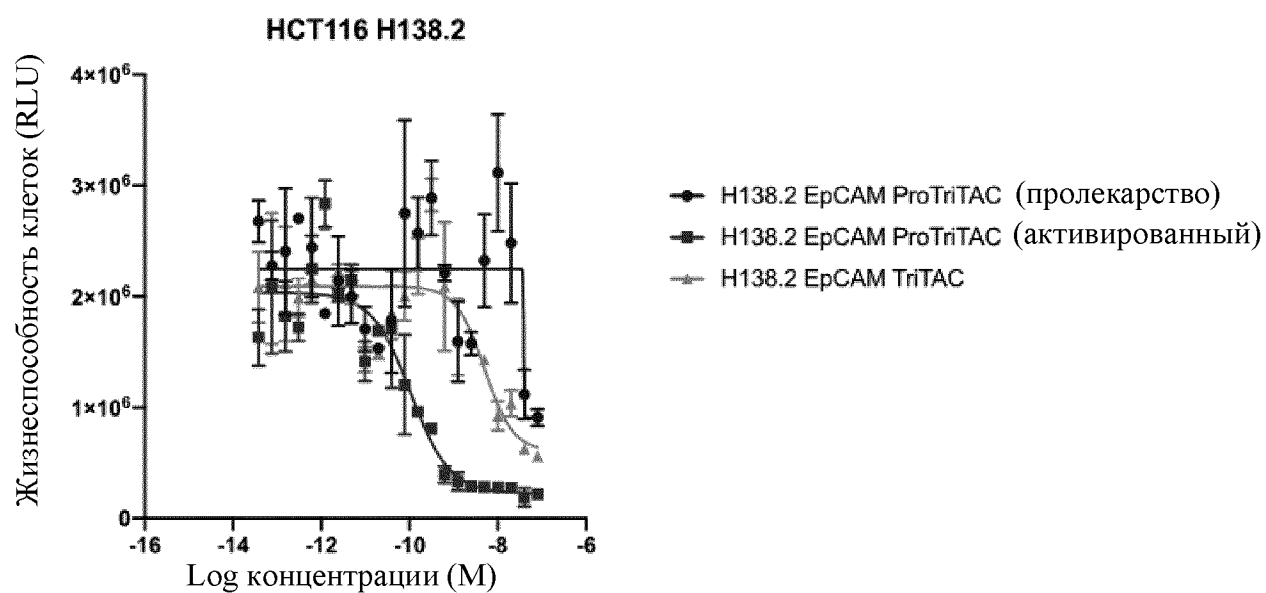
ФИГ. 16А



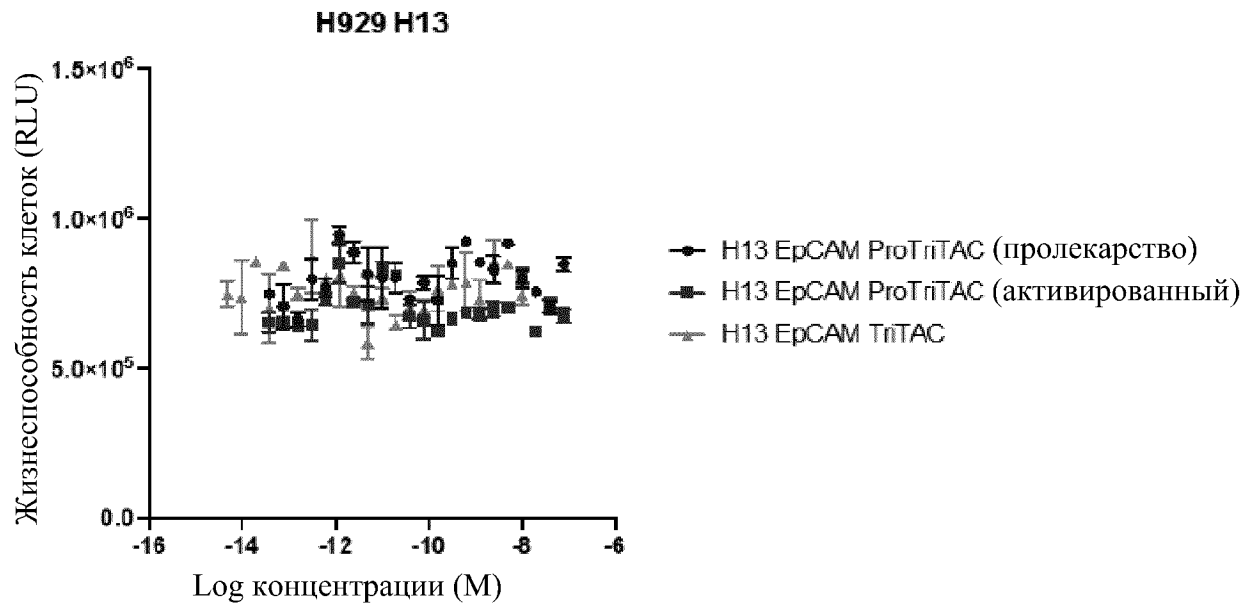
ФИГ. 16В



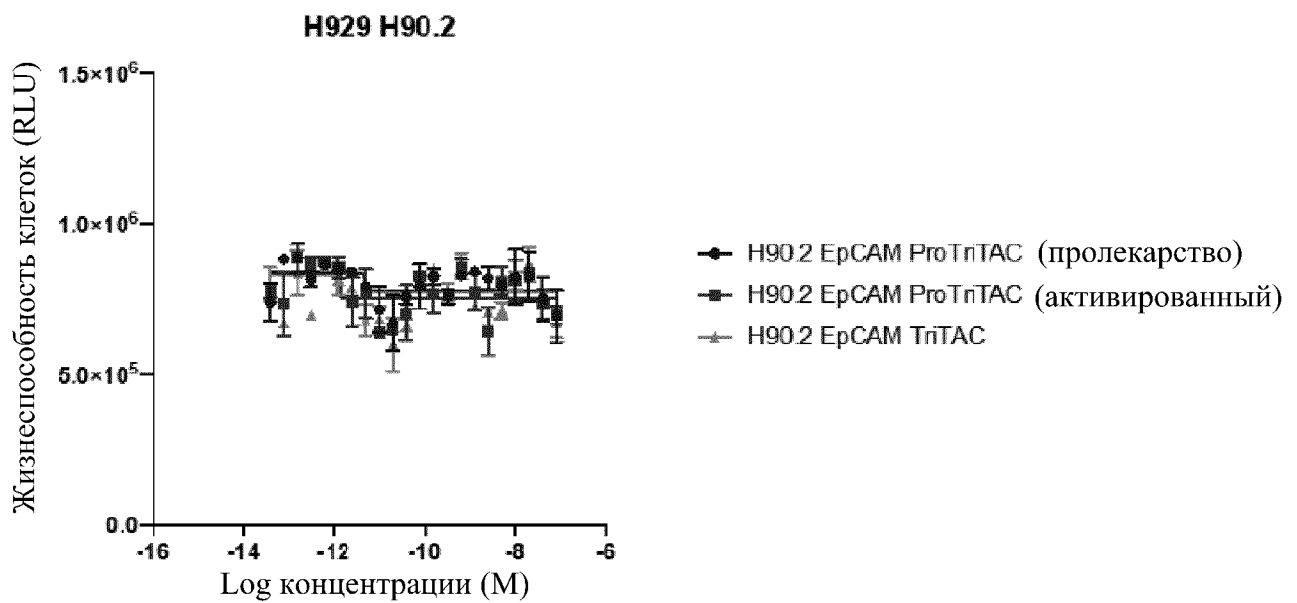
ФИГ. 16С



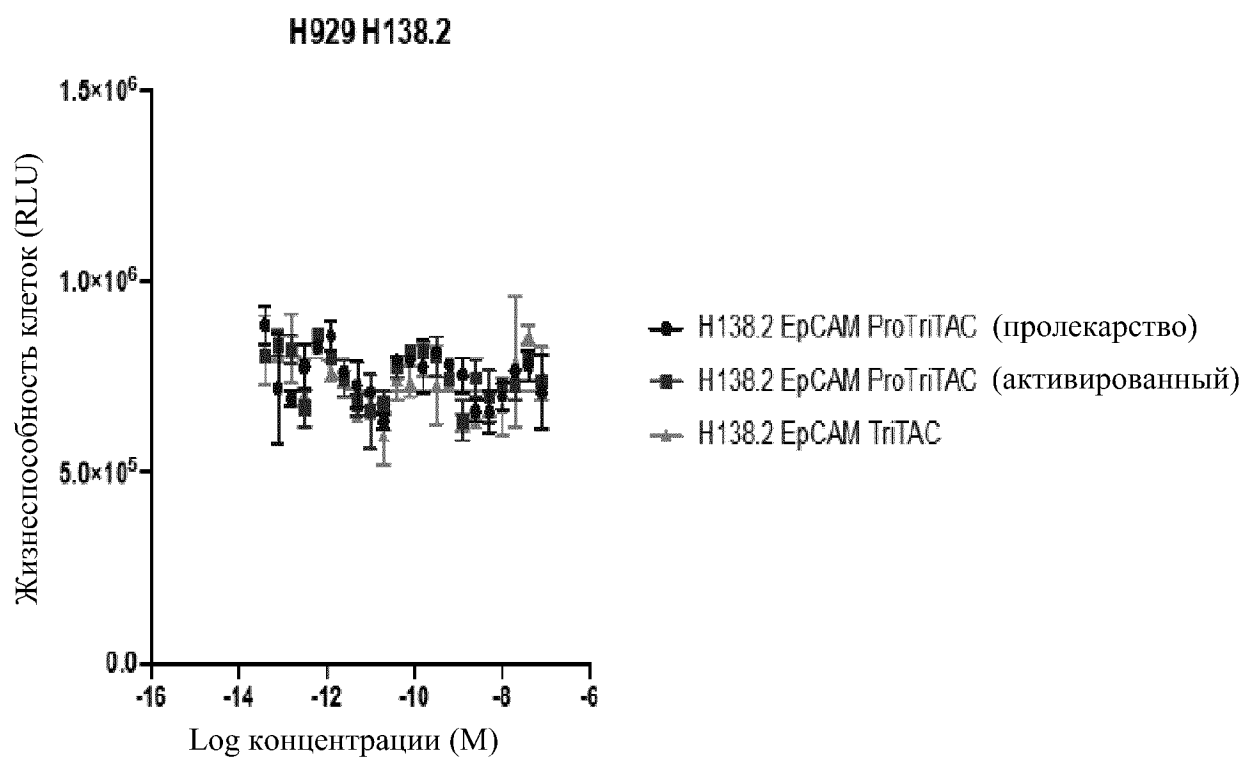
ФИГ. 17А



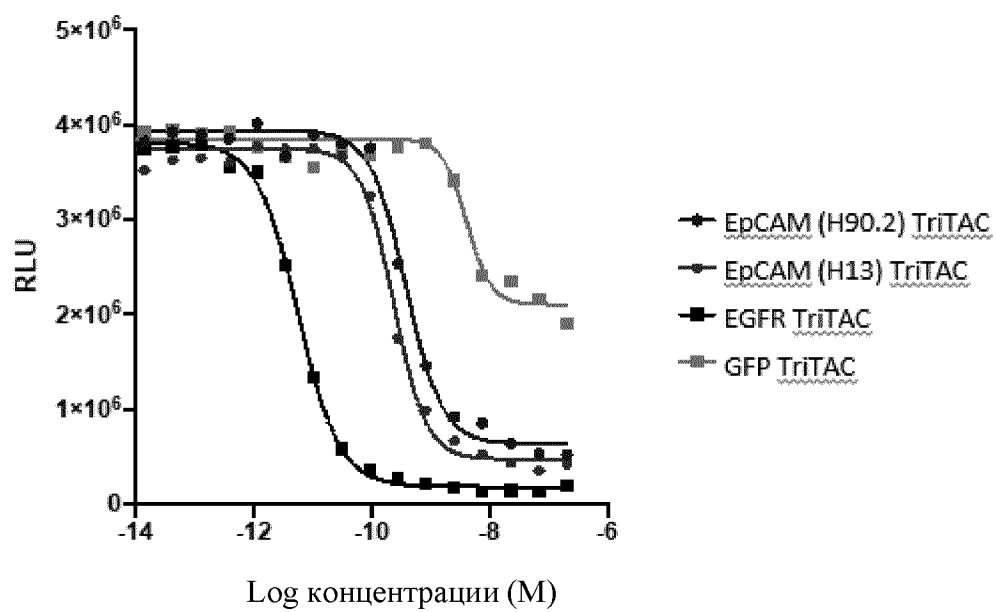
ФИГ. 17В



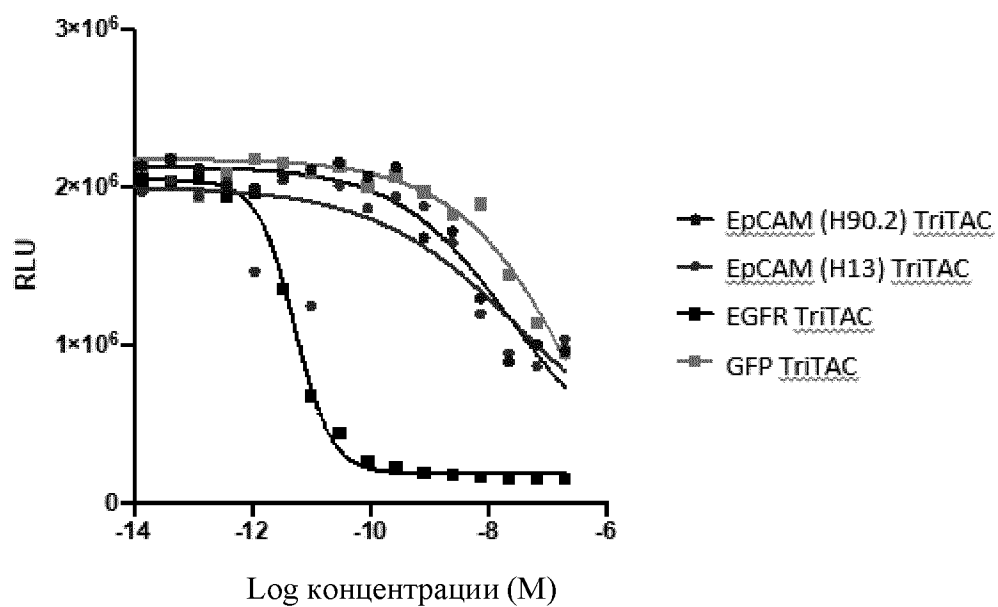
ФИГ. 17С



ФИГ. 18А

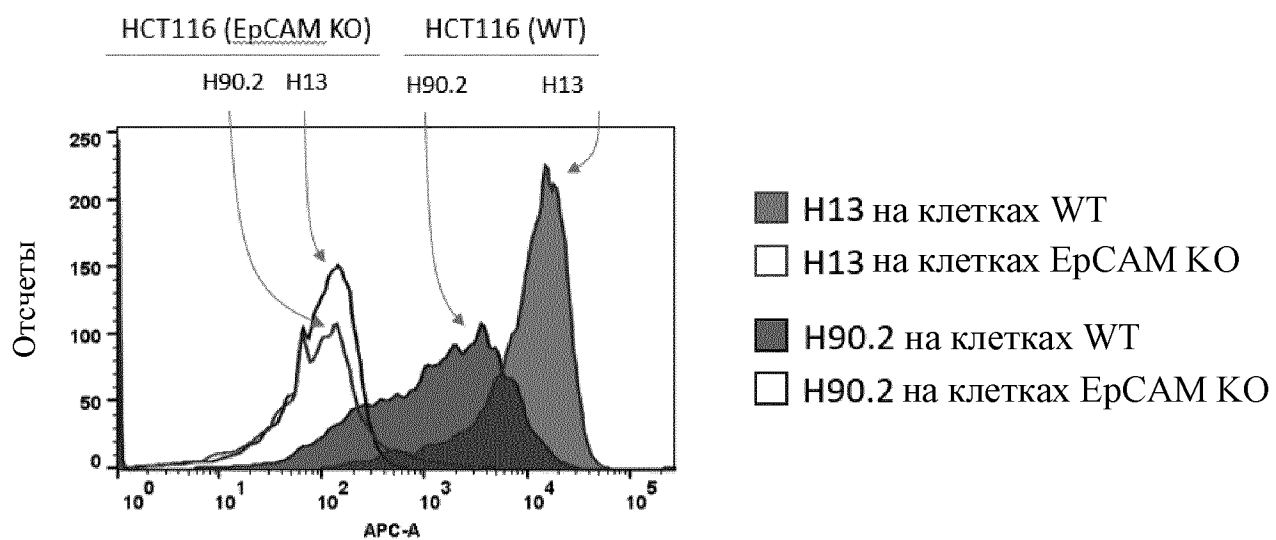
НСТ116 (WT)

ФИГ. 18В

НСТ116 (EpCAM-KO)

ФИГ. 19

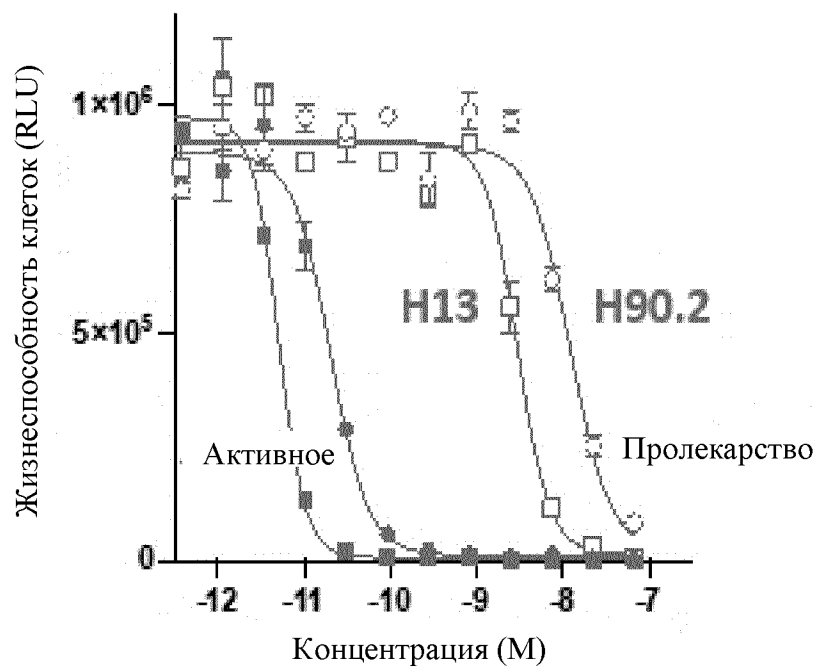
Связывание с клетками НСТ116 посредством проточной цитометрии



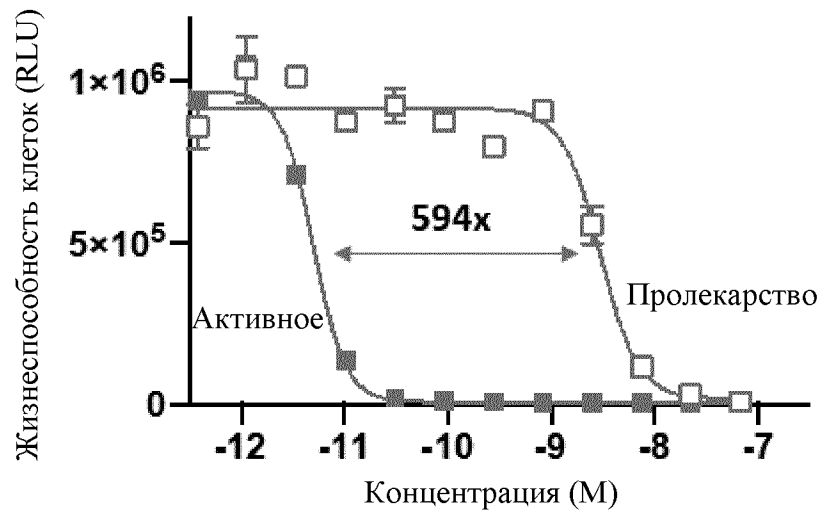
Связывание клеток (интенсивность флуоресценции)

ФИГ. 20

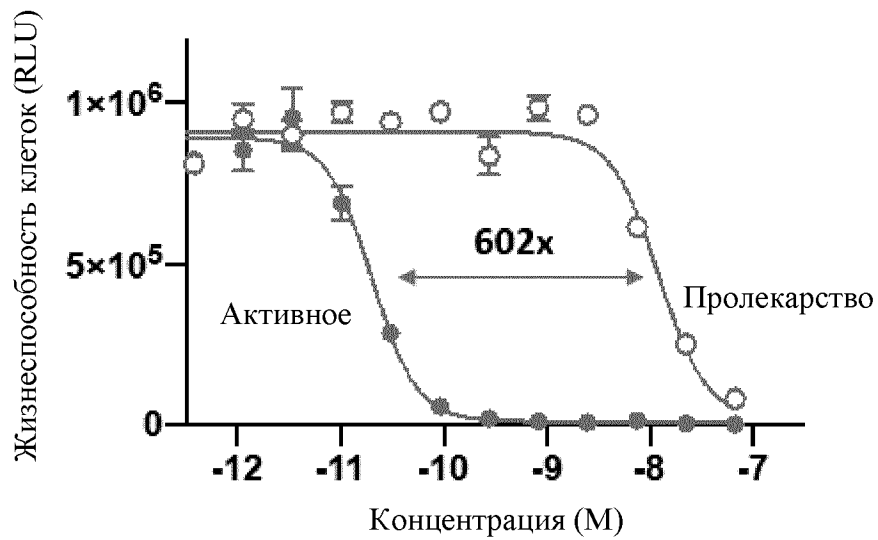
TDCC на клетках SKBR3



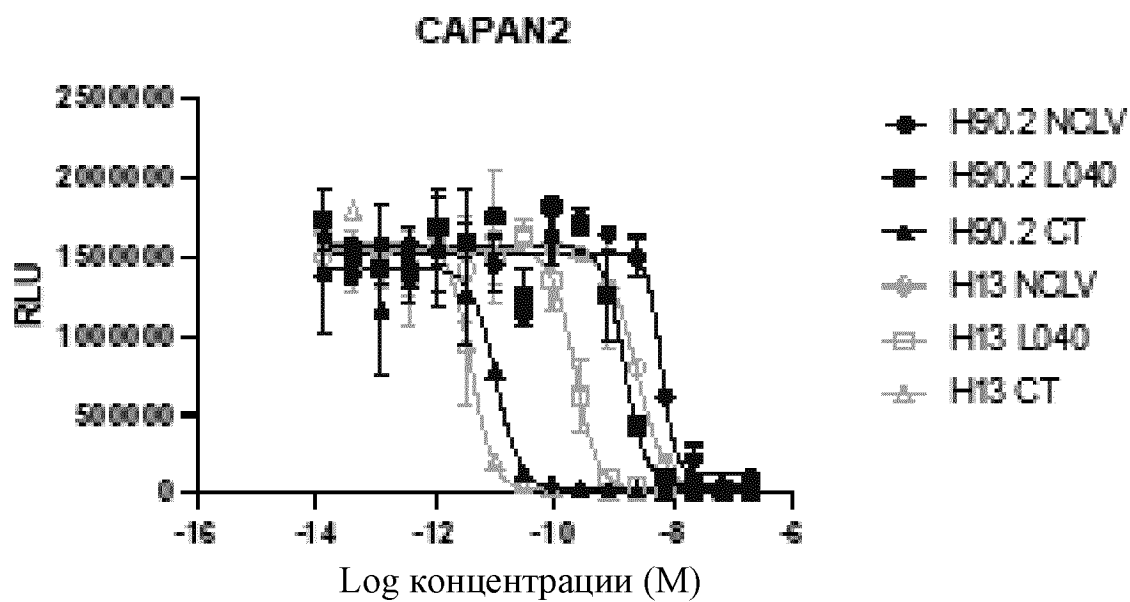
ФИГ. 21А

H13

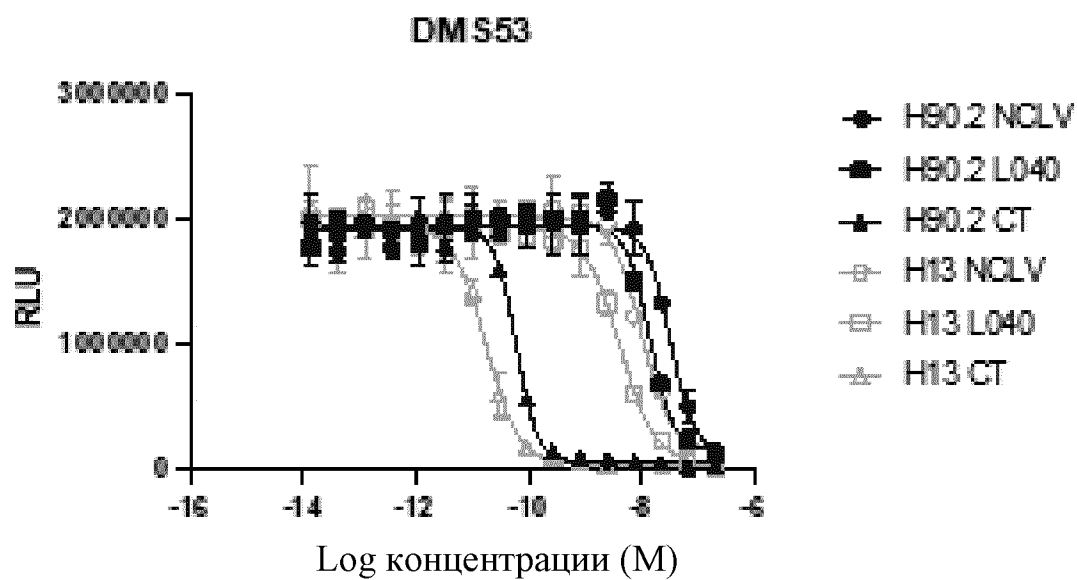
ФИГ. 21В

H90.2

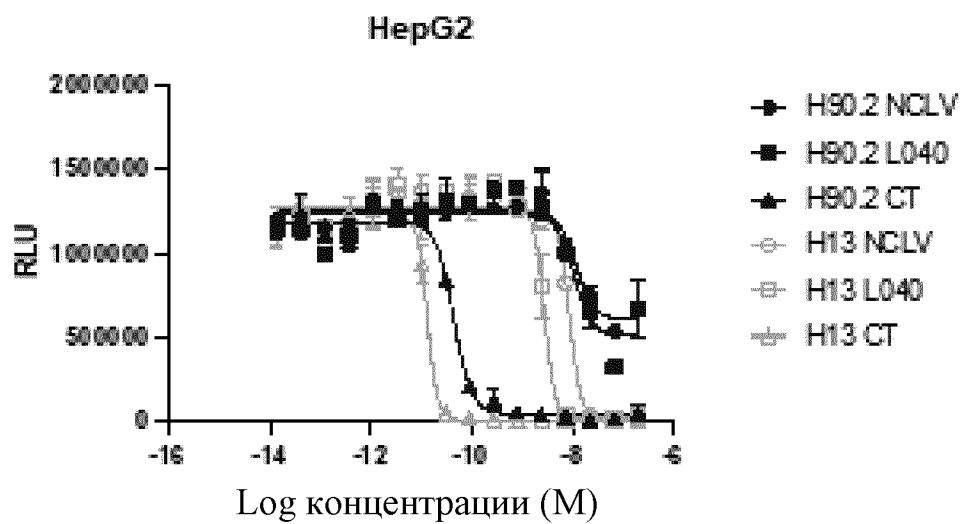
ФИГ. 22А



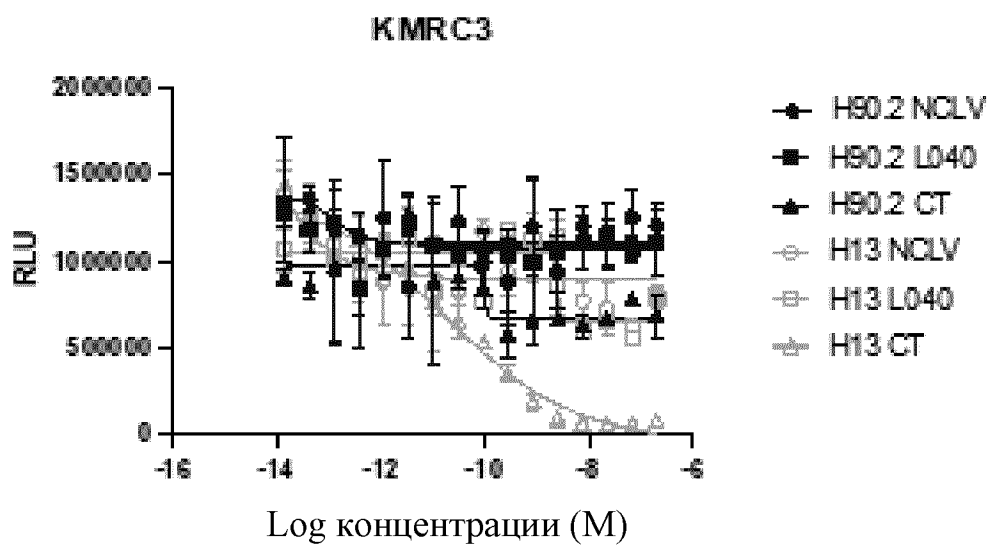
ФИГ. 22В



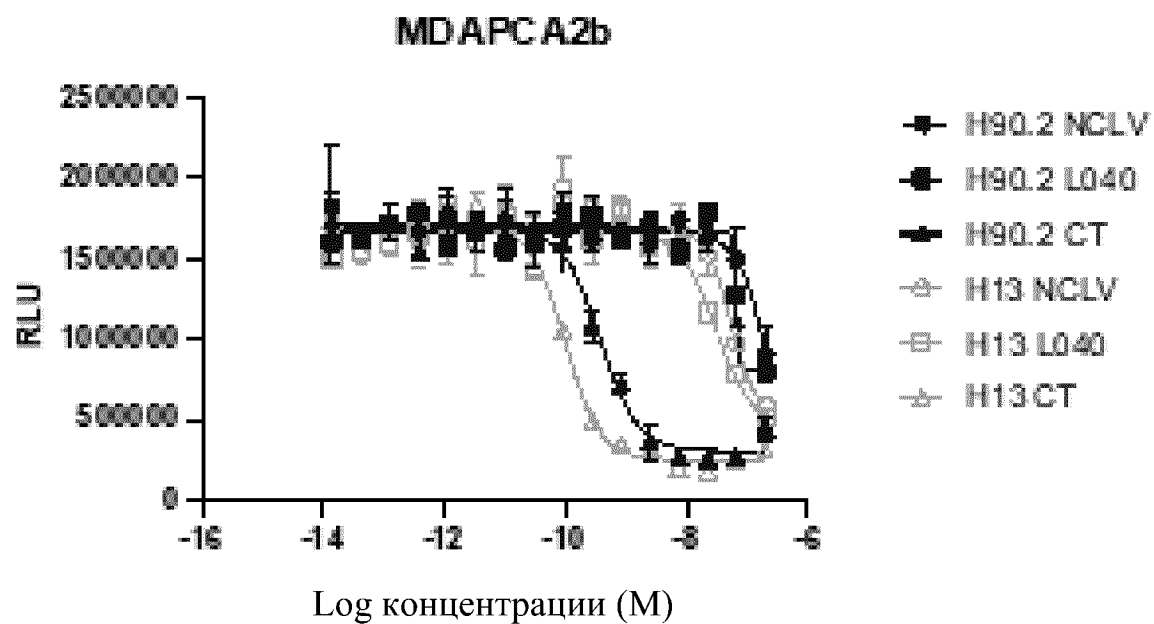
ФИГ. 22С



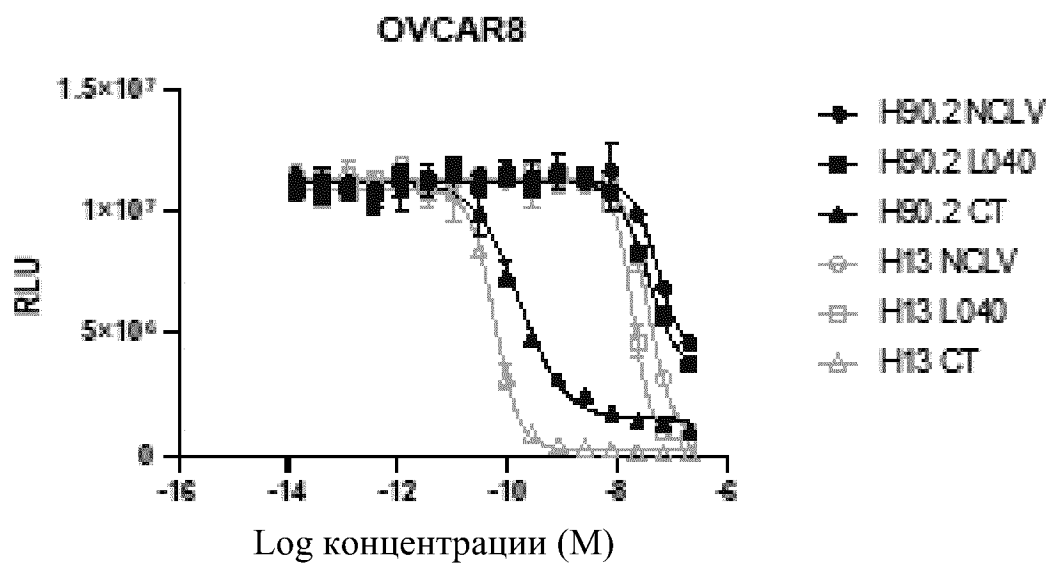
ФИГ. 22D



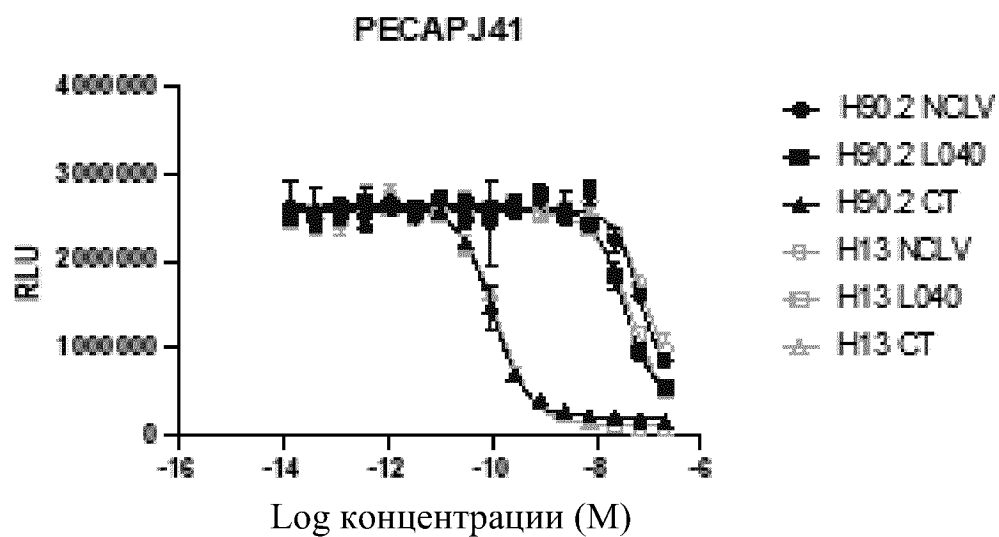
ФИГ. 22Е



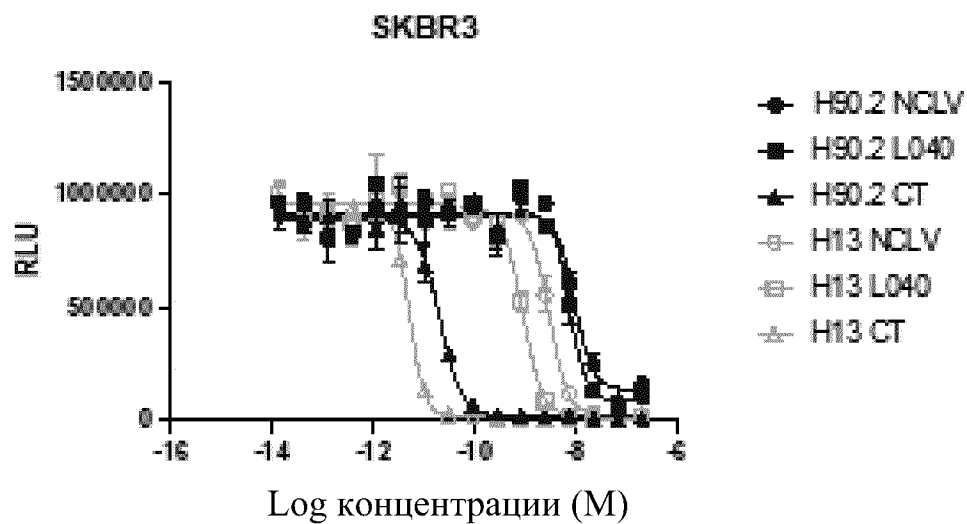
ФИГ. 22F



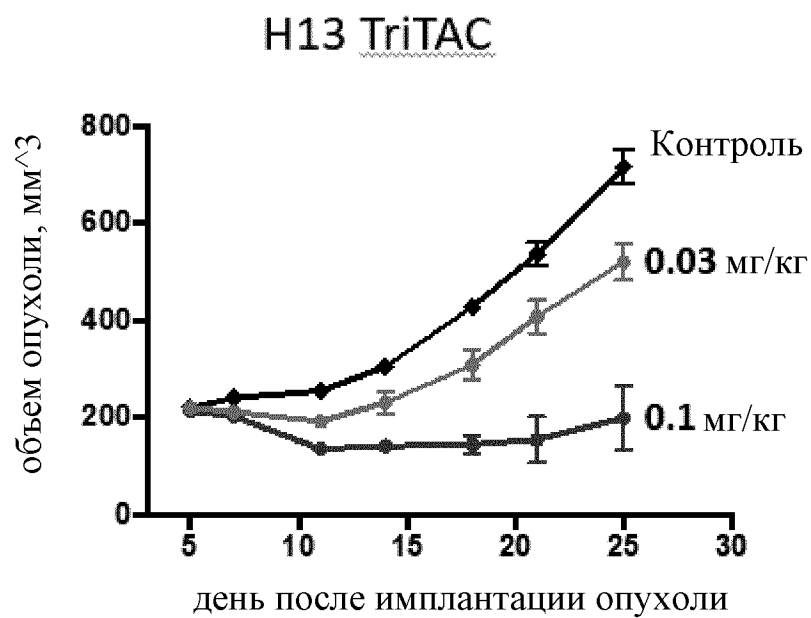
ФИГ. 22G



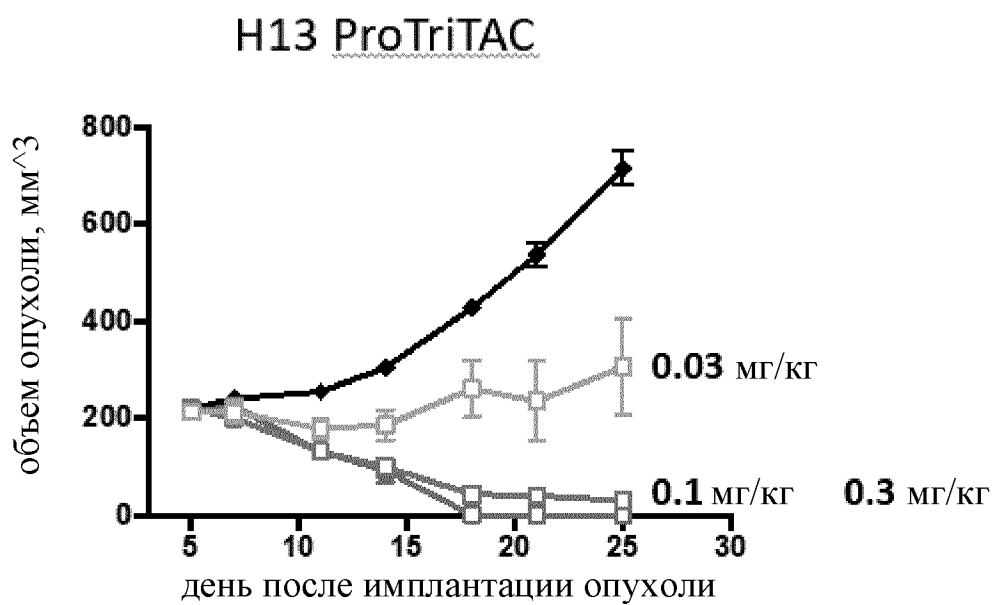
ФИГ. 22H



ФИГ. 23А

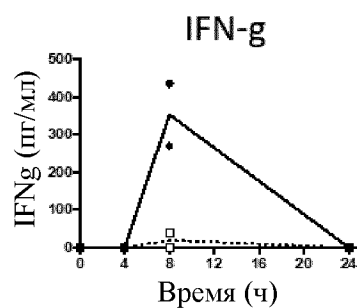


ФИГ. 23В

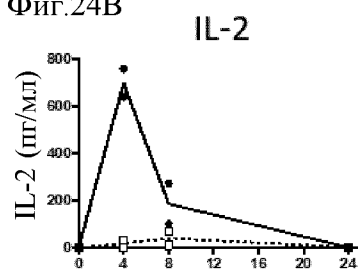


Фиг.24А -24D

Фиг.24А

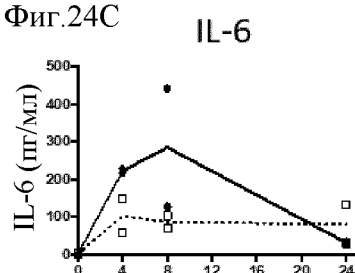


Фиг.24В

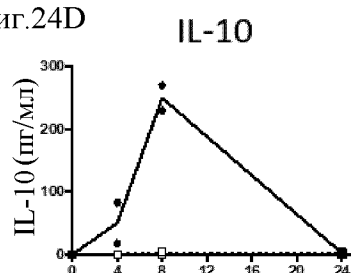


—●— H13 TriTAC
□.... H13 ProTriTAC

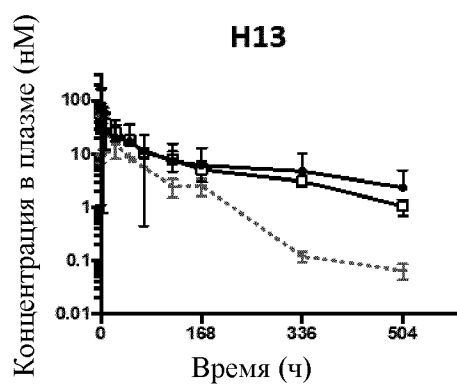
Фиг.24С



Фиг.24D

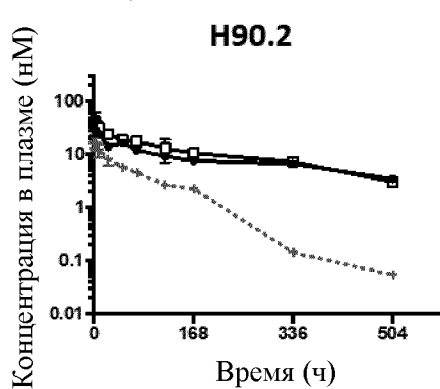


Фиг.25А



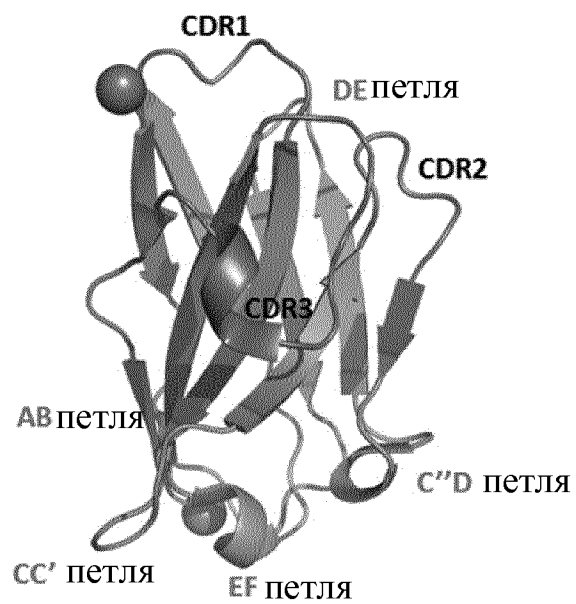
Фиг.25А -25В

Фиг.25В

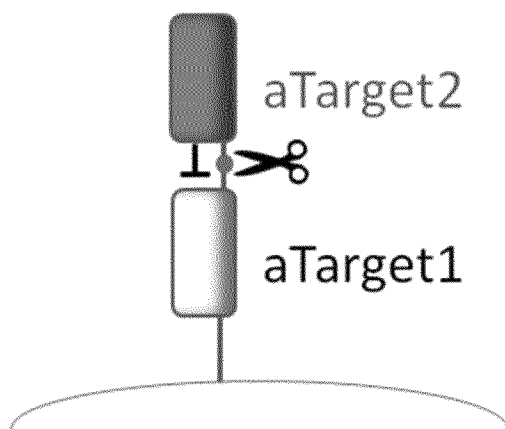


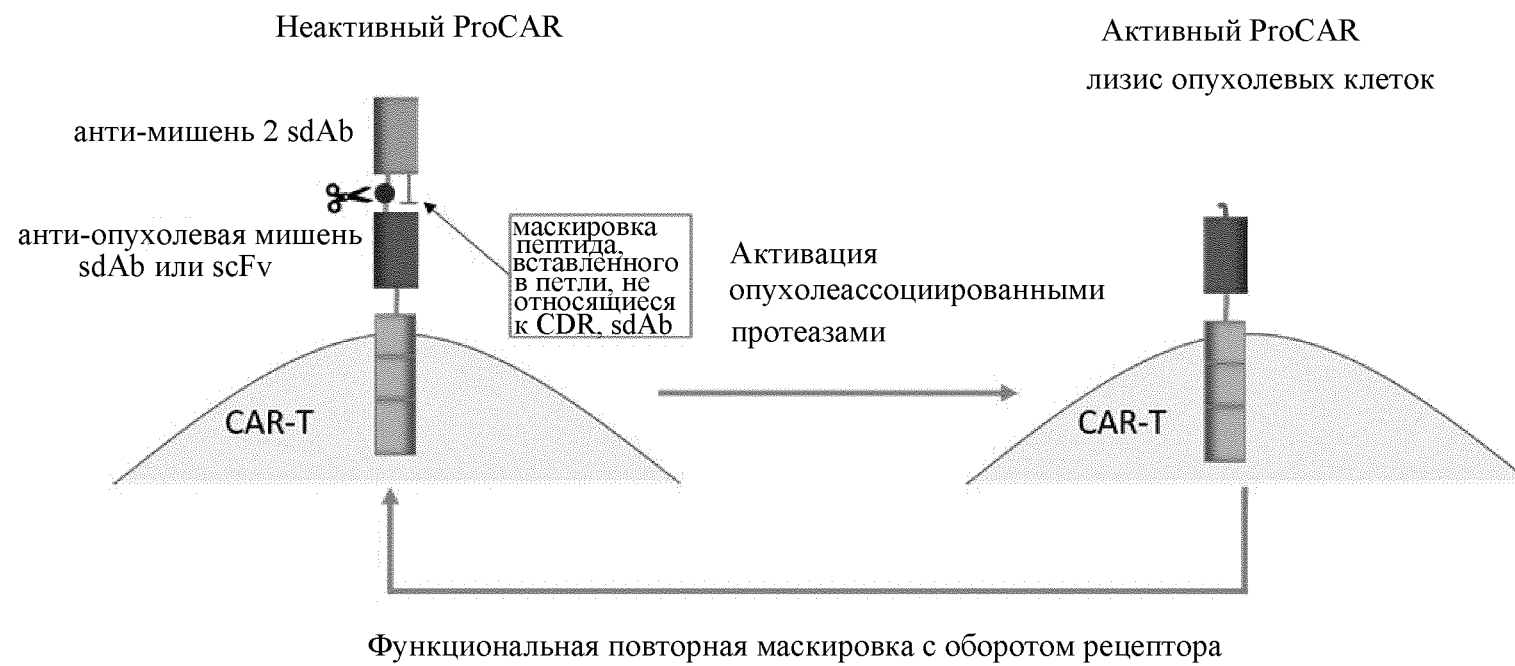
—●— ProTriTAC (NCLV)
 —□— ProTriTAC (L040)
+.... TriTAC

ФИГ. 26



ФИГ. 27



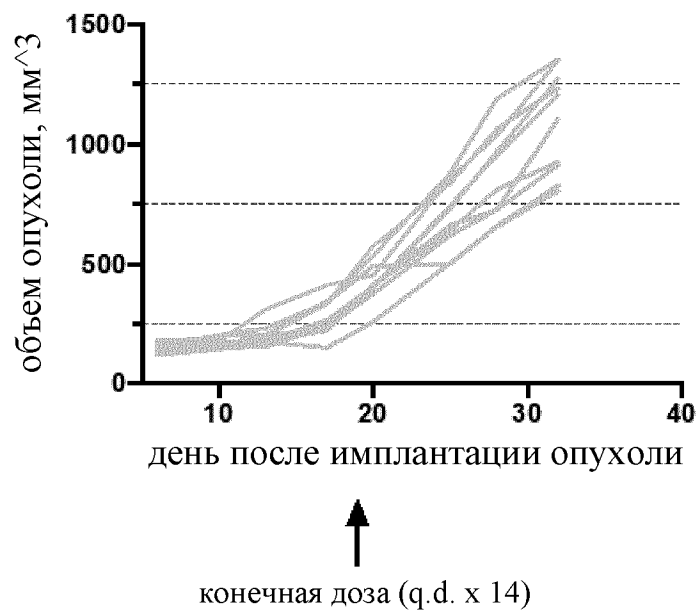


ФИГ. 28

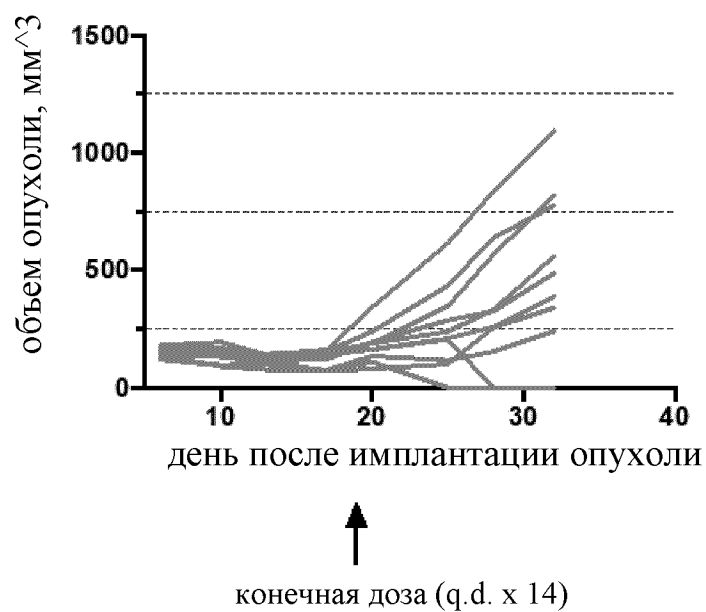
ФИГ. 29А



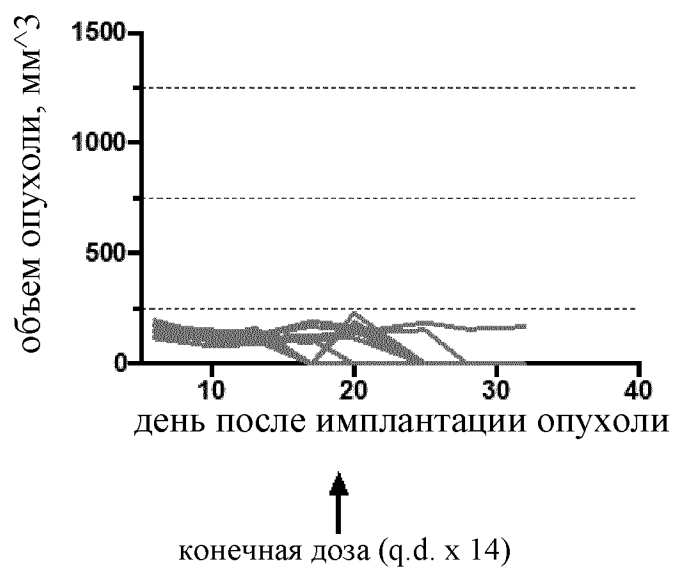
ФИГ. 29В



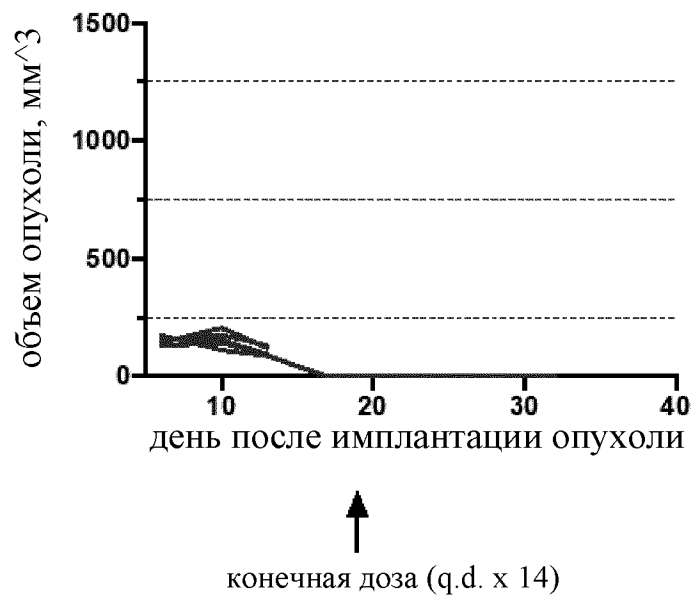
ФИГ. 29С



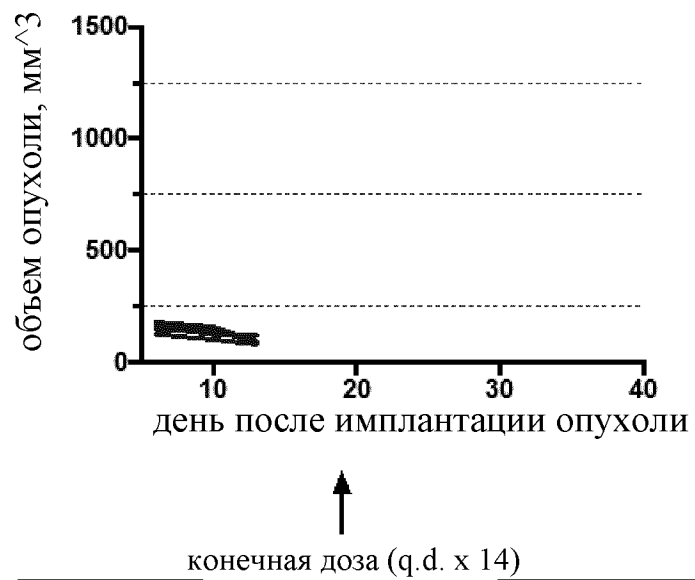
ФИГ. 29D



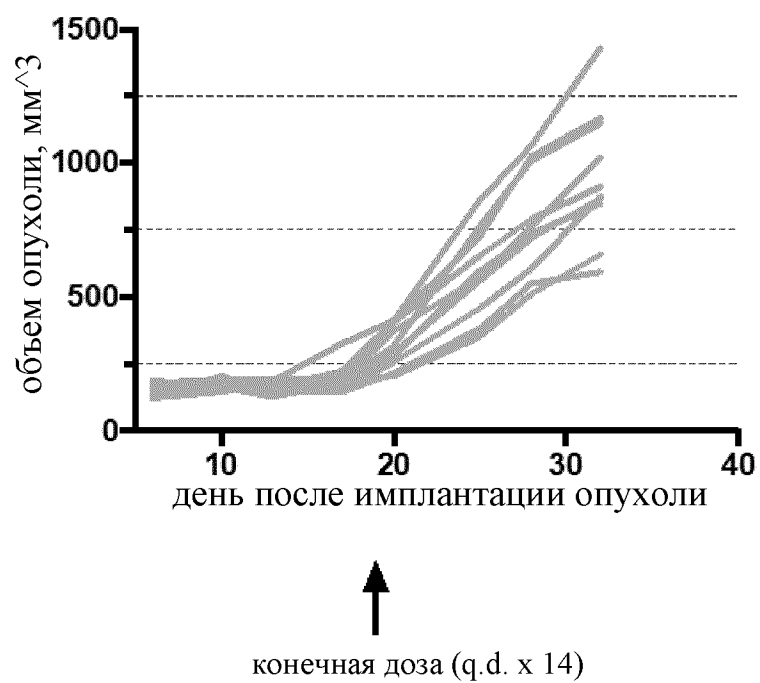
ФИГ. 29Е



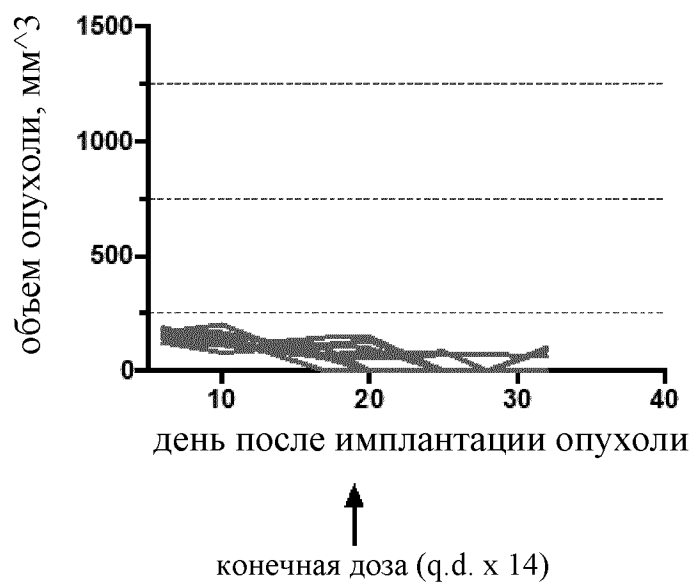
ФИГ. 29F



ФИГ. 29Г



ФИГ. 29Н



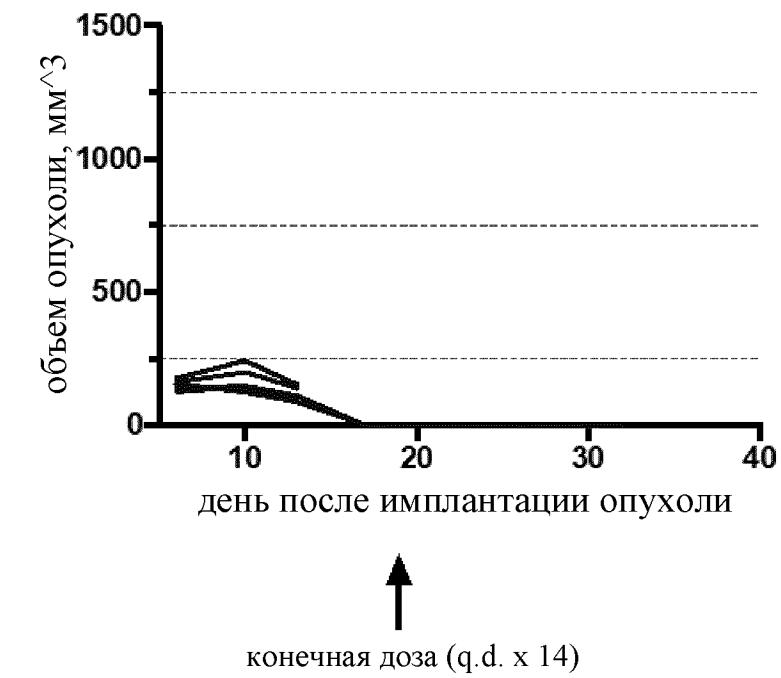
ФИГ. 29I



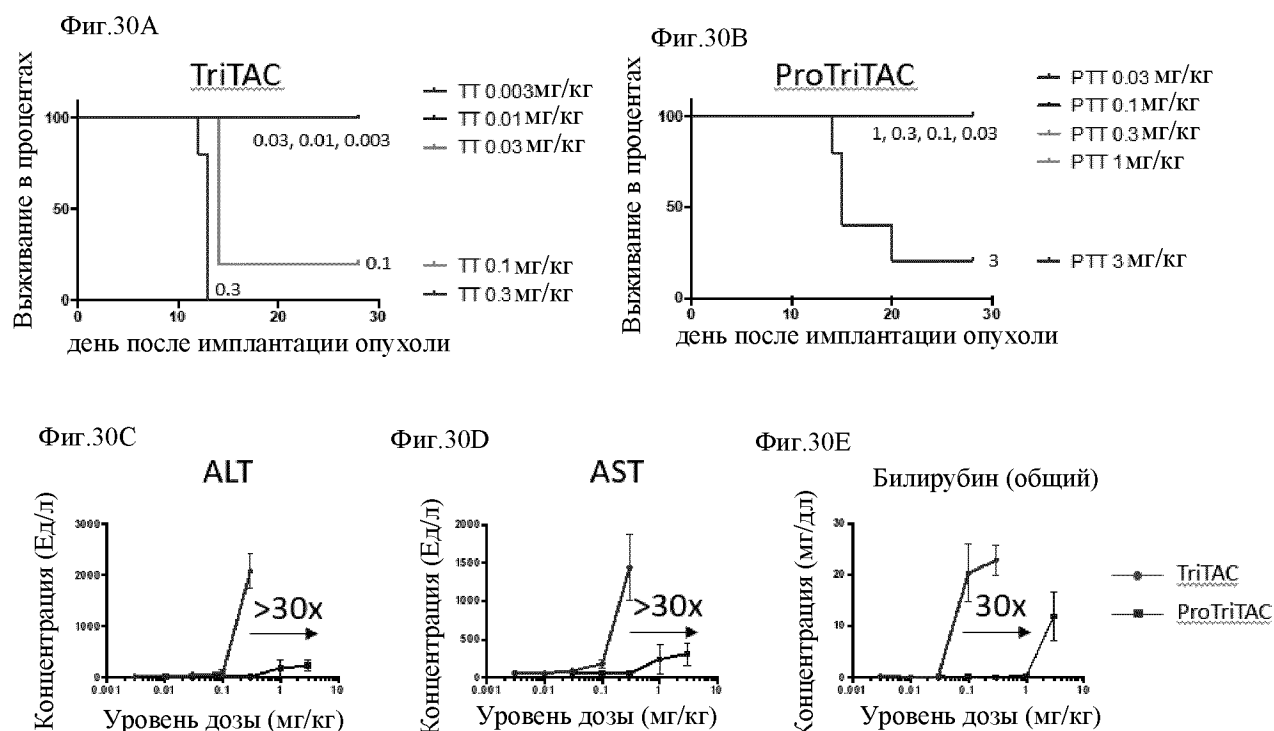
ФИГ. 29J



ФИГ. 29К



ФИГ. 30



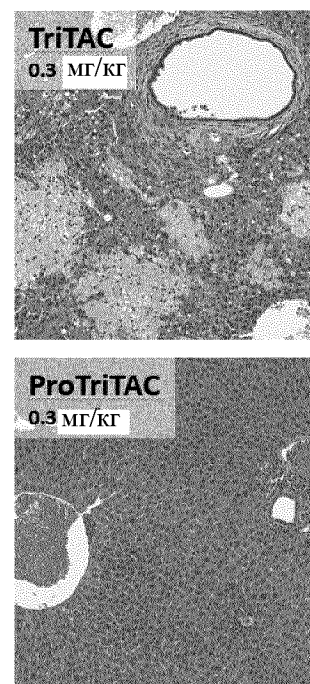
ФИГ. 31

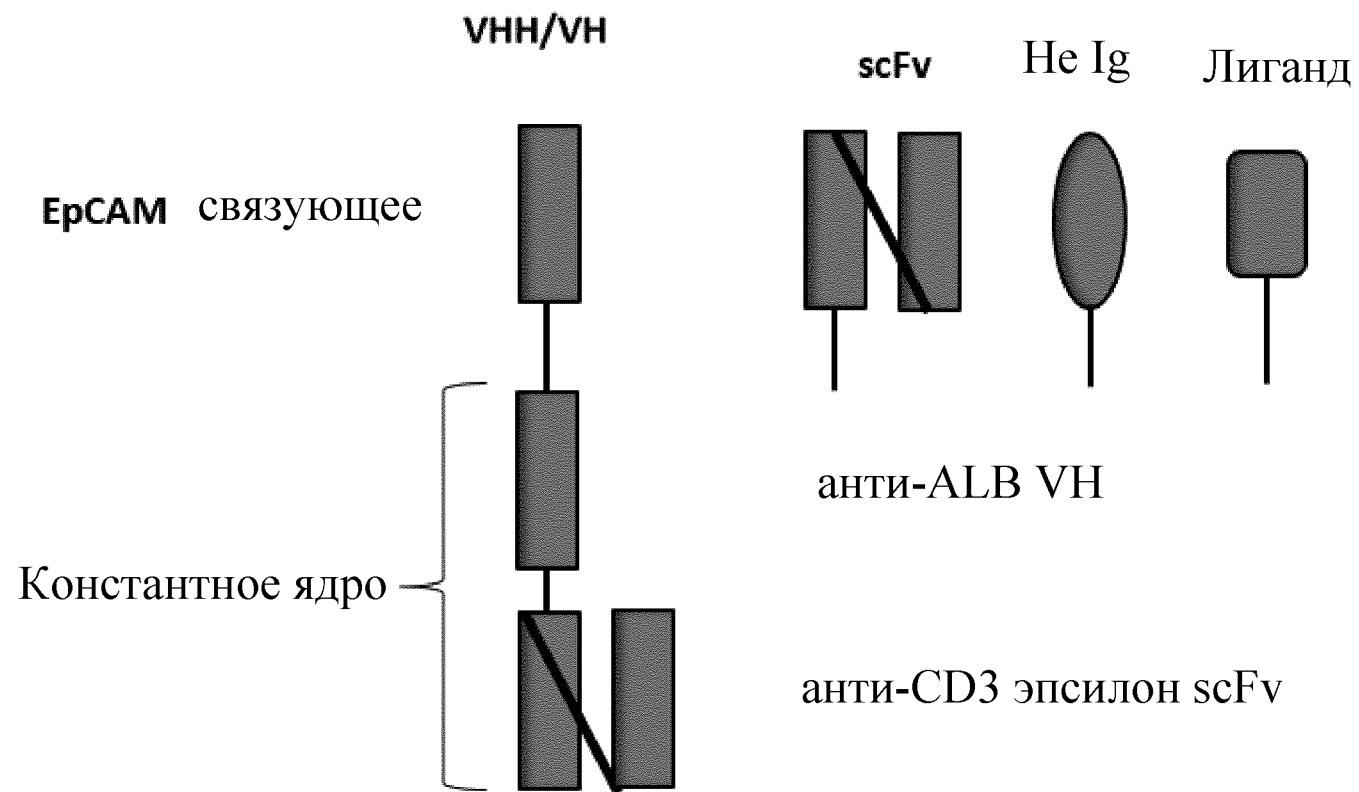
Оценка гистопатологии печени мышей

GFP TriTAC		TriTAC						ProTriTAC					
мг/кг		0.3	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3	1	3	
Группа	F	C	E	A	K	H	D	B	G	I	J		
Тип изделия	CA	Tri	Tri	Tri	Tri	Tri	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro		
Доза (мг/кг)	0	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3	1.0	3.0		
№ номер животного в группе	10	10	10	10	5	5	10	10	5	5	4		
Печень													
Коагуляционный некроз (гепатоклеточный)	(0)*	(0)	(0)	(0)	(5)	(5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)		
минимальный	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1		
мягкий	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	2		
умеренный	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-		
заметный	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1		
Портальный фиброз	(1)	(1)	(1)	(1)	(5)	(5)	(2)	(2)	(0)	(0)	(4)		
минимальный	1	1	1	1	1	-	2	2	-	-	-		
мягкий	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	2		
умеренный	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	2		
Дилатация желчных протоков	(0)	(0)	(0)	(0)	(5)	(5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)		
минимальная	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
мягкая	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	1		
умеренная	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2		
заметная	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-		
тяжелая	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	1		

* Числа в процентах представляют собой число животных с обнаружением
Tri = TriTAC, Pro = ProTriTAC, CA = Контрольное антитело (анти-GFP Tri TAC)

0.1 мг/кг TriTAC = 3 мг/кг ProTriTAC





ФИГ. 32