

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290391** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.26

(22) Дата подачи заявки
2020.07.31

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕ MAGE-A

(31) 10 2019 121 007.0; 62/882,131;
62/905,782

(32) 2019.08.02; 2019.08.02; 2019.09.25

(33) DE; US; US

(86) PCT/EP2020/071660

(87) WO 2021/023658 2021.02.11

(71) Заявитель:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Хутт Майке, Унвердорбен Феликс,
Бунк Себастиан, Маурер Доминик,
Хофманн Мартин, Псзолла Габриэль,
Юсеф Сара, Вагнер Клаудиа, Швебель
Франк, Шустер Хайко (DE)**

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

(57) Изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, специфически связывающим антигены, производные от белка, ассоциированного с меланомой антигена А (MAGE-A). В частности, изобретение предлагает антигенсвязывающие белки, которые специфически связываются с антигенным пептидом MAGE-A, включающим или состоящим из SEQ ID NO: 1, в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС). Антигенсвязывающие белки по изобретению содержат, в частности, определяющие комплементарность области (CDR) новых сконструированных Т-клеточных рецепторов (TCR), которые специфически связываются с указанным комплексом пептид MAGE-A/МНС. Антигенсвязывающие белки по изобретению могут применяться для диагностики, лечения и профилактики раковых заболеваний, экспрессирующих MAGE-A. Кроме того, предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающие белки по изобретению; векторы, включающие в себя эти нуклеиновые кислоты; рекомбинантные клетки, экспрессирующие антигенсвязывающие белки, и фармацевтические композиции, включающие антигенсвязывающие белки по изобретению.

A1

202290391

202290391

A1

Антигенсвязывающие белки, специфически связывающие MAGE-A

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, специфически связывающим антигены, производные от белка ассоциированного с меланомой антигена А (MAGE-A). В частности, изобретение предлагает антигенсвязывающие белки, которые специфически связываются с антигенным пептидом MAGE-A, включающим или состоящим из SEQ ID NO: 1, в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (MHC). Антигенсвязывающие белки по изобретению содержат, в частности, определяющие комплементарность области (CDR) новых сконструированных Т-клеточных рецепторов (TCR), которые специфически связываются с указанным комплексом пептид MAGE-A/MHC. Антигенсвязывающие белки по изобретению могут применяться для диагностики, лечения и профилактики раковых заболеваний, экспрессирующих MAGE-A. Кроме того, предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающие белки по изобретению; векторы, включающие в себя эти нуклеиновые кислоты; рекомбинантные клетки, экспрессирующие антигенсвязывающие белки, и фармацевтические композиции, включающие антигенсвязывающие белки по изобретению.

Предпосылки создания изобретения

Опухолевый антиген MAGE-A с аминокислотной последовательностью «KVLEHVVRV» (SEQ ID NO: 1), также известный как пептид MAG-003, представляет собой HLA-A*02:01-ограниченный эпитоп цитотоксического Т-лимфоцита (ЦТЛ) MAGE-A4 (аминокислоты 286-294) и MAGE-A8 (аминокислоты 288-296) (Zheng-Cai J. et al. Clin Dev. Immunol. 2010, 567594). И MAGE-A4, и MAGE-A8 являются белками и членами семейства генов MAGE-A. Функции MAGE-A8 и MAGE-A4 не известны, хотя они могут играть роль в эмбриональном развитии и трансформации опухоли или аспектах прогрессирования опухоли. Для этих белков идентифицировано множество альтернативно сплайсированных вариантов. Антиген MAGE-A с SEQ ID NO: 1 относится к раково-тестикулярным антигенам (СТ), которые экспрессируются в опухолях, но не в нормальных тканях, за исключением семенников и плаценты. Например, экспрессию белка MAGE-A4 и мРНК MAGE-A4 связывают с развитием и прогнозом различных видов рака. Пептиды, такие как MAGE-A, в частности производный от MAGE-A4 и/или MAGE-A8 пептид «KVLEHVVRV», которые представлены молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC), могут связываться с TCR и, таким образом, являются мишенью иммунотерапии на основе, например, Т-клеток. Поэтому антигены MAGE-A и их эпитопные пептиды использовались в испытаниях иммунотерапии опухолей.

Несмотря на то, что были достигнуты успехи в разработке противораковых лекарственных средств, нацеленных на молекулы, в данной области сохраняется потребность в разработке новых противораковых агентов, которые специфически нацелены на высокоспецифичные раковым клеткам молекулы, но не на нормальные клетки.

Таким образом, настоящее изобретение предлагает новые антигенсвязывающие белки, которые специфичны в отношении экспрессируемого опухолью антигена MAGE-A с SEQ ID NO: 1 в комплексе с белком MHC.

В заявке WO 2017/158103 предлагаются TCR, в частности нативные TCR, такие как нативный TCR R7P1D5, которые связываются с комплексом антигенного пептида MAGE-A, имеющего аминокислотную последовательность KVLEHVVRV с SEQ ID NO: 1, и молекулой HLA класса I, и их применение в диагностике, лечении и профилактике раковых заболеваний. Однако нативные TCR, специфически связывающиеся с MHC-презентированными раковыми антигенами, часто имеют более низкое сродство ($K_D = 1\text{--}300\text{ мкМ}$) по сравнению с TCR, специфически связывающимися с MHC-презентированными вирусными антигенами. Объяснение этого явления, по-видимому, отчасти заключается в том, что Т-клетки, которые развиваются в тимусе, негативно отобраны (индукция толерантности) в отношении лигандов собственный пептид-MHC, вследствие чего Т-клетки со слишком высоким сродством к таким комплексам собственного пептида-MHC удаляются. Такое низкое сродство может быть одним из возможных объяснений иммунного ускользания опухоли (Alek sic et al. 2012, Eur J Immunol. 2012 Dec;42(12):3174-9). Следовательно, представляется желательным разработать варианты TCR, которые связываются с более высоким сродством с раковыми антигенами, для использования в качестве антиген-распознающих структур в адоптивной клеточной терапии (АСТ) или в качестве модуля распознавания доступного подхода, то есть с использованием биспецифических молекул (Hickman et al. 2016, J Biomol Screen. 2016 Sep;21(8):769-85).

Однако увеличение аффинности TCR может также увеличить риск побочных эффектов. Как упоминалось выше, в природе высокоаффинные TCR, направленные против ассоциированных с опухолью антигенов, которые являются собственными белками, исключаются тимической селекцией, чтобы избежать распознавания собственных пептидов, присутствующих в нормальной ткани, за счет перекрестной реактивности. Соответственно, простое увеличение аффинности TCR к его целевой последовательности, вероятно, также увеличит сродство к подобным неспецифичным к раку пептидам и, следовательно, повысит риск перекрестной реактивности и нежелательных цитотоксических эффектов на здоровую ткань. То, что это не просто теоретический риск, было, к сожалению, обнаружено у сконструированных TCR,

нацеленных на MAGE-A3. В частности, ранее опубликованные результаты показали летальную токсичность у двух пациентов, которым вводили инфузией Т-клетки, сконструированные для экспрессии нацеленного на MAGE-A3 TCR, перекрестно реагирующего с пептидом из мышечного белка титина, хотя перекрестная реактивность не прогнозировалась в доклинических исследованиях (Linette GP et al. Blood 2013;122:863–71, Cameron BJ, et al. Sci. Transl. Med. 2013; 5: 197-103). Эти пациенты продемонстрировали, что Т-клетки со сконструированным TCR могут обладать серьезной и непредсказуемой нецелевой и органоспецифической токсичностью.

Соответственно, существует неудовлетворенная медицинская потребность в разработке и предложении TCR или антигенсвязывающих белков, специфически связывающихся со своей мишенью с более высоким сродством, что позволяет нацеливаться даже на опухолевые клетки или клеточные линии со сниженной экспрессией целевого антигенного пептида, в то время как высокая безопасность поддерживается благодаря низкой или пониженной перекрестной реактивности с пептидами, не являющимися мишенями (также называемыми «подобными пептидами»). Другими словами, авторы настоящего изобретения смогли разработать антигенсвязывающие белки, которые проявляют высокую аффинность связывания со своим пептидом-мишенью, сохраняя при этом высокую опухолевую селективность.

Кроме того, как показали авторы настоящего изобретения, специфическая к MAGE-A молекула TCR – TCR R7P1D5 – показывает относительно низкую растворимость в виде одноцепочечной конструкции или в биспецифическом формате, называемом TCER (далее называемом молекулы «TCER™» или «TCER™»), который включает часть, которая специфически связывается с поверхностной молекулой на Т-клетке и которая специфически связывается с МНС-пептидным комплексом.

Следовательно, несмотря на достижения в технологии TCR, остается потребность в дополнительных противораковых препаратах, особенно в тех, которые эффективно нацеливаются на раковые клетки и убивают их. В частности, существует необходимость в разработке новых антигенсвязывающих белков, которые i) являются селективными и специфичными для опухолеспецифического пептида MAGE-A с SEQ ID NO: 1 в комплексе с белком МНС, имеющим желаемую биологическую активность; ii) имеют хорошие метаболические, фармакокинетические профили, растворимость, стабильность и/или безопасность; и iii) которые можно производить в больших масштабах.

Соответственно, в контексте настоящего изобретения авторы настоящего изобретения сконструировали несколько антигенсвязывающих белков, включающих варианты CDR, полученные из указанных родительских TCR R7P1D5. Эти антигенсвязывающие белки обладают повышенным сродством связывания с

комплексом пептид-MHC и повышенной стабильностью и/или повышенной растворимостью, что делает их более подходящими для медицинского применения.

Кроме того, как продемонстрировали авторы настоящего изобретения, эти новые антигенсвязывающие белки эффективно связывают и убивают раковые клетки-мишени, даже которые имеют низкое число копий и, что предпочтительно, поддерживают высокий профиль безопасности с низкой перекрестной реактивностью с подобными пептидами.

Кроме того, эти новые антигенсвязывающие белки, в частности в форме молекул TCER™, проявляют высокую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток. Например, для новых антигенсвязывающих белков в форме молекул TCER™ полумаксимальная эффективная концентрация (EC₅₀) против клеток NCI-H1755, Hs695T клеток и U2OS находится в диапазоне от 1 до 300 пМ, от 1 до 100 пМ, более конкретно, от 1 до 20 пМ для клеток. Кроме того, EC₅₀ антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению в 100 раз, предпочтительно более чем в 1000 раз выше в отношении клеточных линий здоровых тканей, таких как первичные клеточные линии, по сравнению с опухолевой клеточной линией Hs695T, что демонстрирует их высокую безопасность.

Кроме того, авторы настоящего изобретения продемонстрировали для этих новых антигенсвязывающих белков, в частности молекул TCER™, *in vivo*, значительное ингибирование роста опухоли в терапевтической модели мыши даже при низких дозах.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, специфичным в отношении производного от MAGE-A антигенного пептида в комплексе с белком MHC, где указанный антигенсвязывающий белок имеет повышенную стабильность, такую как пониженная агрегация, во время экспрессии и/или очистки, например по сравнению с нативным TCR R7P1D5. Кроме того, указанные антигенсвязывающие белки обладают высокой цитотоксичностью, например, против клеточных линий NCI-H175, клеток Hs695T и клеток U2OS.

Таким образом, полученные авторами изобретения неожиданные результаты, среди прочего, следующие преимущества по уровню техники: (i) снижение перекрестной реактивности TCR или антигенсвязывающих белков с подобными пептидами на здоровых тканях и поддержание высокой опухолевой селективности; (ii) улучшенный профиль безопасности TCR или антигенсвязывающих белков; (iii) TCR или антигенсвязывающие белки, проявляющие пониженную нецелевую и внеопухолевую цитотоксичность; и (iv) предложение улучшенных специфических, селективных и безопасных TCR или антигенсвязывающих белков.

Определения

Понятие «антигенсвязывающий белок» в настоящем документе относится к полипептидам или связывающим белкам, которые способны связываться по меньшей мере с одним антигеном, в частности с антигеном, сформулированным в контексте настоящего изобретения. В предпочтительном варианте осуществления указанные антигенсвязывающие белки способны одновременно связываться с двумя разными антигенами, что, как известно, характерно, например, для биспецифических антител. Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат по меньшей мере 6 CDR, как определено в контексте настоящего изобретения, которые исходно были произведены от TCR. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один переменный домен альфа и по меньшей мере один переменный домен бета, как определено в контексте настоящего изобретения, которые исходно были произведены от TCR.

«Домен» представляет собой область белка, определенную на основе гомологии последовательностей и часто связанную со специфической структурной или функциональной единицей. Примерами таких доменов являются переменный домен легкой цепи, принадлежащий легкой цепи антитела, переменный домен тяжелой цепи, принадлежащий тяжелой цепи, антитела, домен C_{H1}, C_{H2} и C_{H3} (константные домены) тяжелой цепи антитела, переменный домен α -цепи TCR или переменный домен β -цепи TCR.

Понятие «антиген» или «целевой антиген» в контексте настоящего изобретения относится к молекуле или части молекулы или комплекса, которые способны связываться по меньшей мере с одним сайтом связывания антигена, где указанный один сайт связывания антигена присутствует, например, на обычном антителе, обычном TCR и/или на антигенсвязывающих белках по настоящему изобретению.

Антиген, который специфически связывается с антигенсвязывающими белками по настоящему изобретению, представляет собой антигенный пептид MAGE-A, включающий или состоящий из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» с SEQ ID NO: 1, в частности антигенный пептид MAGE-A, включающий или состоящий из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» SEQ ID NO: 1, в комплексе с белком MHC.

Понятие «эпитоп» в настоящем документе включает термины «структурный эпитоп» и «функциональный эпитоп». «Структурный эпитоп» представляет собой те аминокислоты антигена, например комплекс пептид-MHC, которые покрываются антигенсвязывающим белком при связывании с антигеном. Обычно считаются покрытыми все аминокислоты антигена, которые находятся в пределах 5 Å от любого атома аминокислоты антигенсвязывающего белка. Структурный эпитоп антигена может

быть определен известными в данной области знаний методами, включая рентгеновскую кристаллографию или анализ ЯМР. Структурный эпитоп антитела обычно содержит от 20 до 30 аминокислот. Структурный эпитоп TCR обычно содержит от 20 до 30 аминокислот. «Функциональный эпитоп» представляет собой подмножество аминокислот, образующих структурный эпитоп, и включает аминокислоты антигена, которые имеют решающее значение для формирования интерфейса с антигенсвязывающим белком по изобретению, либо путем прямого образования нековалентных взаимодействий, таких как Н-связи, солевые мостики, стекинг-взаимодействие между ароматическими фрагментами или гидрофобные взаимодействия, либо путем не прямой стабилизации конформации связывания антигена, и определяется, например, методом мутационного сканирования. Обычно функциональный эпитоп антигена, связанного с антителом, содержит от 4 до 6 аминокислот. Обычно функциональный эпитоп комплекса пептид-МНС включает от 2 до 6 аминокислот пептида и от 2 до 7 аминокислот молекулы МНС. Поскольку пептиды, представленные МНС I, обычно имеют длину от 8 до 10 аминокислот, только подмножество аминокислот каждого данного пептида является частью функционального эпитопа комплекса пептид-МНС. В контексте настоящего изобретения эпитоп, в частности функциональный эпитоп, связанный с антигенсвязывающими белками по настоящему изобретению, содержит или состоит из аминокислот антигена, которые необходимы для образования интерфейса связывания, следовательно, функциональный эпитоп содержит по меньшей мере 3, предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислоты антигенного пептида MAGE-A с SEQ ID NO: 1.

Подсемейство белков «MAGE-A» или «ассоциированного с меланомой антигена А» были первыми опухолевыми антигенами, идентифицированными на молекулярном уровне (van der Bruggen P, et al. Science. 1991; 254:1643–47). MAGE-A представляет собой подсемейство из 12 генов (от MAGE-A1 до MAGE-A12), расположенных в области q28 X-хромосомы. Члены подсемейства белков MAGE-A нормально экспрессируются только в семенниках или плаценте, и их ограниченная экспрессия предполагает, что они могут играть роль в развитии зародышевых клеток. Белки MAGE-A также были обнаружены на раннем этапе развития центральной нервной системы, спинного мозга и ствола мозга, что свидетельствует о том, что белки MAGE-A также могут участвовать в развитии нейронов. Члены этого семейства кодируют белки с 50–80 % идентичностью последовательностей друг другу и все белки MAGE имеют общий домен гомологии MAGE (MHD) – высококонсервативный домен, состоящий приблизительно из 170 аминокислот. Биологические функции и лежащий в основе регуляторный механизм экспрессии белков MAGE-A в раковой опухоли до сих пор полностью не изучены.

Белок «MAGE-A4» или «ассоциированный с меланомой антиген 4» принадлежит к семейству генов MAGE-A и имеет регистрационный номер Uniprot P43358 с SEQ ID NO: 97 (по состоянию на 8 июля 2019 г.). Локализация MAGE-A4 была описана как цитоплазматическая. Тем не менее было также обнаружено окрашивание MAGE-A4 в ядрах, с различным распределением между ядром и цитоплазмой при хорошо дифференцированном в сравнении с менее дифференцированным раком (Sarcevic B et. Al., 2003, Oncology 64, 443–449). MAGE-A4 используется в качестве маркера мужских половых клеток. Он не экспрессируется в гоноцитах, но экспрессируется в пре-сперматогониях и зрелых половых клетках (Mitchell et al., 2014, Mod. Pathol. 27, 1255–1266). Экспрессию белка MAGE-A4 и мРНК MAGE-A4 связывают с развитием и прогнозом различных видов рака.

Белок «MAGE-A8» или «ассоциированный с меланомой антиген 8» принадлежит к семейству генов MAGE-A и имеет регистрационный номер Uniprot P43361 с SEQ ID NO: 98 (по состоянию на 8 июля 2019 г.).

У белков «MAGE-A4» и «MAGE-A8» идентичность последовательностей составляет 72 %, как определено выравниванием последовательностей белков с использованием алгоритма BLASTP 2.9.0 (Stephen F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Кроме того, и «MAGE-A4», и «MAGE-A8» содержат пептид MAG-003, то есть KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1).

«Главный комплекс гистосовместимости» (МНС) представляет собой набор белков на клеточной поверхности, необходимый для приобретенной иммунной системы для распознавания чужеродных молекул у позвоночных, что, в свою очередь, определяет гистосовместимость. Основная функция молекул МНС состоит в связывании с антигенами, происходящими от патогенов, и представлять их на поверхности клетки для распознавания соответствующими Т-клетками. Человеческий МНС также называется комплексом человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) (часто просто HLA). Семейство генов МНС делится на три подгруппы: класс I, класс II и класс III. Комплексы пептида и МНС класса I распознаются CD8-положительными Т-клетками, несущими соответствующий Т-клеточный рецептор (TCR), тогда как комплексы пептида и молекул МНС класса II распознаются CD4-положительными вспомогательными Т-клетками, несущими соответствующий TCR. Поскольку оба типа ответа, зависящие от CD8 и CD4, совместно и синергетически вносят свой вклад в противоопухолевый эффект, идентификация и характеристика ассоциированных с опухолью антигенов и соответствующих Т-клеточных рецепторов важны для разработки иммунотерапевтических средств против рака, таких как вакцины и клеточная терапия. Ген HLA-A расположен на коротком плече хромосомы 6 и кодирует более крупную составляющую HLA-A, α -цепь. Вариация α -цепи HLA-A является ключом к функции HLA.

Эта вариация способствует генетическому разнообразию в популяции. Поскольку каждый HLA имеет разное сродство к пептидам определенных структур, большее разнообразие HLA означает большее разнообразие антигенов, которые будут «представлены» на поверхности клетки. Каждый человек может экспрессировать до двух типов HLA-A, по одному от каждого из своих родителей. Некоторые люди наследуют один и тот же HLA-A от обоих родителей, уменьшая индивидуальное разнообразие HLA; однако большинство людей получают две разные копии HLA-A. Такая же закономерность характерна для всех групп HLA. Другими словами, каждый человек может экспрессировать только один или два из 2432 известных аллелей HLA-A.

Белок HLA класса I MHC в контексте настоящего изобретения может представлять собой белок HLA-A, HLA-B или HLA-C, предпочтительно белок HLA-A, более предпочтительно HLA-A*02.

«HLA-A*02» обозначает конкретный аллель HLA, где буква A обозначает ген, а суффикс «*02» обозначает серотип A2.

В иммунной реакции, зависимой от MHC класса I, пептиды не только должны быть способны связываться с определенными молекулами MHC класса I, экспрессируемыми опухолевыми клетками, они также должны впоследствии распознаваться Т-клетками, несущими специфические Т-клеточные рецепторы (TCR).

«TCR» представляет собой гетеродимерный белок клеточной поверхности, принадлежащий суперсемейству иммуноглобулинов, который связан с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в опосредовании передачи сигнала. TCR существуют в формах $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$, которые структурно похожи, но имеют совершенно разные анатомические локации и, вероятно, функции. Внеклеточная часть каждого нативного гетеродимерного $\alpha\beta$ TCR и $\gamma\delta$ TCR содержит два полипептида, каждый из которых имеет проксимальный к мембране константный домен и дистальный к мембране переменный домен. Каждый из константных и переменных доменов включает внутрицепочечную дисульфидную связь. Переменные домены содержат высокополиморфные петли, аналогичные определяющим комплементарность областям (CDR) антител. Использование генной TCR терапии позволяет преодолеть ряд текущих препятствий. Это позволяет, как правило, наделять собственные Т-клетки субъектов (пациентов) желаемой специфичностью и генерировать достаточное количество Т-клеток за короткий период времени, не допуская их истощения. Например, TCR будет трансдуцироваться в мощные Т-клетки (например, Т-клетки центральной памяти или Т-клетки с характеристиками стволовых клеток), что может обеспечить лучшую устойчивость, сохранность и функцию при переносе. Т-клетки, сконструированные с помощью TCR, будут вводиться онкологическим больным, у которых наблюдается

лимфопения в результате химиотерапии или облучения, обеспечивая эффективное приживание, но подавляя иммунную супрессию.

Понятие «TCR» в настоящем документе обозначает TCR и их фрагменты, а также одноцепочечные TCR и их фрагменты, в частности вариабельные домены альфа и бета однодоменных TCR, а также химерные, гуманизированные, биспецифические или мультиспецифические TCR.

«Фрагменты TCR» содержат часть интактного или нативного TCR, в частности антигенсвязывающую область или вариабельную область интактного или нативного TCR. Примеры фрагментов TCR включают фрагменты цепи α , β , δ , γ , такие как V_α - C_α или V_β - C_β или их части, такие фрагменты могут также дополнительно содержать соответствующую шарнирную область или отдельные вариабельные домены, такие как V_α , V_β , V_δ , V_γ , одноцепочечные фрагменты $V_\alpha V_\beta$ или биспецифические и мультиспецифические TCR, образованные от фрагментов TCR. Фрагменты TCR обладают идентичными функциями по сравнению с встречающимися в природе полноразмерными TCR, то есть фрагменты избирательно и специфически связываются со своим целевым пептидом.

«Одноцепочечный TCR (scTCR)» в настоящем документе обозначает белок, в котором вариабельные домены TCR, такие как V_α и V_β или V_δ и V_γ расположены на одном полипептиде. Обычно вариабельные домены разделены линкером, при этом указанный линкер обычно содержит от 5 до 20, например от 5 до 15 аминокислот.

Определение «нативный» используемое, например, в формулировке «нативный TCR» относится к TCR дикого типа.

В подходе адоптивного переноса клеток (ACT) полученные трансгенные Т-клетки могут экспрессировать TCR дикого типа, имеющий альфа- и бета-цепи дикого типа, и трансгенный TCR с альфа- и бета-цепями, специфичными для соответствующего целевого комплекса антиген-МНС. Как альфа- и бета-цепи дикого типа, так и трансгенные альфа- и бета-цепи обычно все еще способны к кросс-спариванию друг с другом. Эта нежелательная возможность связывания называется «ошибочным спариванием TCR» и является признанной проблемой в области TCR (генной) терапии. Ошибочное спаривание и неправильное спаривание между α - или β -цепью трансгенного TCR и β - или α -цепью эндогенного TCR, соответственно, может привести к снижению поверхностной экспрессии трансгенного гетеродимера $TCR\alpha\beta$, что, в свою очередь, снизит функциональную avidность модифицированных Т-клеток. Кроме того, на доклинической модели было продемонстрировано, что Т-клетки, экспрессирующие ошибочно спаренные TCR и экспандирующиеся в условиях высокого уровня IL-2, вызывают болезнь «трансплантат против хозяина» (GvHD).

Некоторые стратегии оптимизации спаривания трансгенных TCR α и β во избежание неправильного спаривания могут включать следующее:

1. Муринизированные TCR: в этом подходе константные домены α - и β - цепей человеческих TCR заменяются соответствующими мышинными доменами. Хотя человеческие и мышинные TCR-С домены демонстрируют высокую степень гомологии, небольшие различия влияют на стабильность взаимодействий TCR/CD3 и, следовательно, на уровни поверхностной экспрессии TCR.
2. Модифицированные цистеином TCR: в этом подходе цистеиновые аминокислоты вводят в структурно благоприятном положении, что приводит к образованию по меньшей мере одного дополнительного дисульфидного мостика и способствует правильному спариванию между двумя цепями TCR. Сайт-ориентированные мутации, например T48C в константной области альфа-цепи TCR и S57C в константной области бета-цепи TCR, приводили к образованию гетеродимера TCR, связанного двумя межцепочечными связями (то есть введенный дисульфидный мостик плюс эндогенный трансмембранный дисульфидный мостик (положение № 95 в константном домене альфа и положение № 131 в константном домене бета)).
3. Обмен доменов: константные домены меняют местами между α - и β -цепями опухолеспецифического Т-клеточного рецептора, создавая TCR с замененным доменом (ds). При правильном спаривании эти цепи dsTCR сохраняют все домены, необходимые для рекрутирования белков CD3, экспрессии на поверхности Т-клеток и опосредования функциональных ответов Т-клеток при взаимодействии с целевым антигеном. Напротив, неправильно спаренные TCR, включающие одну цепь dsTCR и одну цепь TCR дикого типа, лишены ключевых доменов, необходимых для рекрутинга, экспорта и передачи сигнала CD3, и, таким образом, не могут опосредовать губительный аутоиммунитет.
4. Эксклюзивные гетеродимеры TCR: в этом подходе используются стерические и электростатические силы для облегчения правильного спаривания между альфа- и бета-трансгенами TCR и в то же время ингибируют спаривание между экзогенными и эндогенными альфа- и бета-цепями TCR. В одном примере используются сайт-ориентированные мутации для введения S85R в константный домен альфа и R88G в константный домен бета, чтобы получить требуемые изменения электростатических зарядов и, следовательно, создать взаимную конфигурацию «выступ-во-впадину», которая, согласно предположениям, минимально искажает вторичные и третичные структуры.
5. Использование химерной цепи TCR-CD3 ζ , в которой каждая цепь TCR слита с молекулой CD3 ζ .
6. Использование одноцепочечных TCR, где V-альфа-цепь определенного TCR слита с бета-цепью с использованием гибкого пептидного линкера.
7. Использование последовательностей shRNA или нуклеаз цинковых пальцев для подавления экспрессии эндогенного TCR.

Другой подход, называемый «липучкой», позволяет соединить две цепи TCR друг с

другом за счет благоприятных электростатических взаимодействий в гетеродимерном состоянии. То есть два пептида преимущественно развернуты в изолированной форме, но при смешивании ассоциируются преимущественно с образованием стабильного гетеродимера в форме параллельной спирализованной спирали – *coiled coil*. Этот

5 подход может быть применен для получения растворимого TCR, при котором гетеродимерный комплекс образуется преимущественно путем слияния пептидов с укороченными альфа- и бета-цепями соответственно.

Нативные альфа-бета гетеродимерные TCR имеют альфа-цепь и бета-цепь. Каждая альфа-цепь содержит переменную, соединяющую и константную области, а

10 бета-цепь также обычно содержит короткую область разнообразия между переменной и соединяющей областями, но эту область разнообразия часто рассматривают как часть соединяющей области. Константные, или C, области альфа- и бета-цепей TCR обозначаются как TRAC и TRBC соответственно (Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 10). Каждая переменная область, называемая в настоящем

15 документе переменным доменом альфа и переменным доменом бета, содержит три определяющих комплементарных области (CDR), встроенные в каркасную последовательность, одна из них является гиперпеременной областью, называемой CDR3. CDR переменного домена альфа обозначены в настоящем документе как CDRa1, CDRa2, CDRa3, а CDR переменного домена бета обозначены в настоящем

20 документе как CDRb1, CDRb2, CDRb3. Существует несколько типов переменных областей альфа-цепи (Valpha) и несколько типов переменных областей бета-цепи (Vbeta), различающихся своим каркасом, последовательностями CDR1 и CDR2 и частично определенной последовательностью CDR3. Типы Valpha обозначаются в номенклатуре IMGT уникальным номером TRAV, типы Vbeta обозначаются в

25 номенклатуре IMGT уникальным номером TRBV. (Folch and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(1): 42-54; Scaviner and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 83-96; LeFranc and LeFranc, (2001), «T cell Receptor Factsbook», Academic Press). Для получения дополнительной информации о генах, кодирующих антитела-иммуноглобулины и TCR, см. Международную информационную систему

30 ImMunoGeneTics®, Lefranc M-P et al (Nucleic Acids Res. 2015 Jan; 43 (Database issue):D413-22; и <http://www.imgt.org/>). Обычный сайт TCR для связывания с антигеном, таким образом, включает, как правило, шесть CDR, включающих набор CDR от каждой переменной области альфа- и бета-цепи, где последовательности CDR1 и CDR3 имеют отношение к распознаванию и связыванию пептидного антигена,

35 связанного с белком HLA, и последовательности CDR2 имеют отношение к распознаванию и связыванию белка HLA.

Аналогично антителам, «каркасные области TCR» (FR) относятся к аминокислотным последовательностям, расположенным между CDR, то есть к тем участкам переменных областей альфа- и бета-цепей TCR, которые в некоторой степени консервативны среди различных TCR у одного вида. Каждая из альфа- и бета-цепей TCR имеет четыре FR, обозначенных в настоящем документе FR1-a, FR2-a, FR3-a, FR4-a и FR1-b, FR2-b, FR3-b, FR4-b соответственно. Соответственно, переменный домен альфа-цепи может быть обозначен как (FR1-a)-(CDRa1)-(FR2-a)-(CDRa2)-(FR3-a)-(CDRa3)-(FR4-a) и переменный домен бета-цепи, таким образом, может быть обозначен как (FR1-b)-(CDRb1)-(FR2-b)-(CDRb2)-(FR3-b)-(CDRb3)-(FR4-b).

В контексте изобретения определение CDR/FR в α - или β -цепи или γ - или δ -цепи должно производиться на основе определения IMGT (Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org). Соответственно, положения аминокислот CDR/FR, относящиеся к TCR-производным доменам или TCR, указаны в соответствии с указанным определением IMGT. Предпочтительно, чтобы IMGT-положение аминокислотных положений CDR/FR первого переменного домена было дано по аналогии с IMGT-нумерацией TRAV5 и/или IMGT-положение аминокислотных положений CDR/FR второго переменного домена было дано по аналогии с IMGT-нумерацией TRBV12-4. Что касается TCR гамма/дельта, понятие «переменный домен TCR гамма», используемое в настоящем документе, относится к соединению областей TCR гамма V (TRGV) без лидерной области (L) и TCR гамма J (TRGJ); а понятие константный домен TCR гамма относится к внеклеточной области TRGC или к усеченной на С-конце последовательности TRGC. Аналогичным образом, понятие «переменный домен TCR дельта» относится к соединению областей TCR дельта V (TRDV) без лидерной области (L) и TCR дельта D/J (TRDD/TRDJ); а понятие константный домен TCR дельта относится к внеклеточной области TRDC или к усеченной на С-конце последовательности TRDC.

В «антителе», также называемом «иммуноглобулином», две тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями, и каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью дисульфидной связью. Есть два типа легкой цепи: лямбда (λ) и каппа (κ). Существует пять основных классов тяжелых цепей (или изотипов), которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит определенную последовательность доменов. Легкая цепь включает два домена или области: переменный домен (V_L) и константный домен (C_L). Тяжелая цепь включает четыре домена: переменный домен (V_H) и три константных домена (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} , вместе именуемые C_H). Переменные области обеих и легкой (V_L), и тяжелой цепей (V_H) определяют распознавание связывания и специфичность к антигену. Домены константной области легкой (C_L) и тяжелой (C_H) цепей определяют важные

биологические свойства, такие как сборка цепи, секреция, трансплацентарная подвижность антитела, связывание комплемента и связывание с F_c рецепторами (F_cP). Фрагмент F_v представляет собой N-концевую часть Fab-фрагмента иммуноглобулина и состоит из переменных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи.

5 Специфичность антитела заключается в структурной комплементарности между соединяющим сайтом антитела (синоним сайта связывания антитела). Специфичность антитела заключается в структурной комплементарности между соединяющим сайтом антитела (синоним сайта связывания антитела и антигенной детерминантой) и антигенной детерминантой. Сайты связывания антител состоят из остатков, которые в
10 основном относятся к гиперпеременным или определяющим комплементарность областям (CDR). Иногда остатки негиперпеременных областей или FR влияют на общую структуру домена и, следовательно, на сайт связывания. CDR относятся к аминокислотным последовательностям, которые вместе определяют аффинность и специфичность связывания нативной F_v -области и нативного сайта связывания
15 иммуноглобулина. Легкая и тяжелая цепи иммуноглобулина, каждая, имеют три CDR, обозначаемых CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L и CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H соответственно. Таким образом, обычный антигенсвязывающий сайт антитела включает шесть CDR, включающих набор CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепи.

В контексте изобретения антитело или иммуноглобулин представляет собой IgM,
20 IgD, IgG, IgA или IgE.

«Каркасные области антитела» (FR) обозначают аминокислотные последовательности, расположенные между CDR, то есть те части переменных областей легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина, которые относительно консервативны среди различных иммуноглобулинов у одного биологического вида.
25 Каждая легкая и тяжелая цепь иммуноглобулина имеет четыре FR, обозначаемых FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H соответственно. Соответственно, переменный домен легкой цепи может быть обозначен как (FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L) и переменный домен тяжелой цепи может быть обозначен как (FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H).

30 В контексте изобретения определение CDR/FR в легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина, за исключением домена F_c , должно быть выполнено на основе определения IMGT (Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org). Соответственно, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 конкретной переменной цепи и аминокислотные последовательности FR1, FR2, FR3, FR4 и
35 FR5 указаны в соответствии с указанным определением IMGT.

Как будет понятно специалисту в данной области, структуры антител, в частности структура переменных тяжелых и легких цепей антител, подобны структурам

вариабельных доменов TCR альфа-цепи и бета-цепи. Таким образом, CDR TCR по настоящему изобретению могут быть пересажены в обычные антитела, биспецифические антитела или мультиспецифические антитела.

Зная аминокислотную последовательность CDR антитела, TCR или антигенсвязывающего белка по изобретению, специалист в данной области может легко определить каркасные области, такие как каркасные области TCR или каркасные области антитела. Однако в случаях, когда CDR не указаны, специалист в данной области может сначала определить аминокислотные последовательности CDR на основе определения IMGT для TCR или определения IMGT для антител, а затем определить аминокислотные последовательности каркасных областей.

В данном контексте «человеческая каркасная область» представляет собой каркасную область, которая по существу идентична (примерно на 85 % или более, в частности на 90 %, 95 %, 97 %, 99 % или 100 %) каркасной области встречающегося в природе антигенсвязывающего белка, такого как встречающееся в природе человеческое антитело или человеческий TCR.

Понятие «антитело» обозначает антитело и их фрагменты, а также однодоменные антитела и их фрагменты, в частности вариабельную тяжелую цепь однодоменного антитела, и химерные, гуманизированные, биспецифические или мультиспецифические антитела.

«Обычное антитело» в настоящем документе представляет собой антитело, которое имеет те же домены, что и антитело, выделенное из природного источника, и включает CDR и каркасные области, полученные из антитела. По аналогии, «обычный TCR», как упоминается в настоящем документе, представляет собой TCR, который включает те же домены, что и нативный TCR, а также CDR и каркасные области, полученные из TCR.

Понятие «гуманизированное антитело» относится к антителу, которое полностью или частично имеет нечеловеческое происхождение и которое было модифицировано для замены определенных аминокислот, в частности, в каркасных областях тяжелой и легкой цепей, чтобы избежать или минимизировать иммунный ответ у людей. Константные домены гуманизированного антитела представляют собой в основном человеческие домены C_H и C_L.

В данной области известны многочисленные методы гуманизации последовательности антитела; например, как в обзоре Almagro & Fransson (2008) Front Biosci. 13: 1619-1633. Одним из широко используемых методов является трансплантация CDR или изменение формы антитела, которое включает в себя перенос последовательностей CDR донорского антитела, обычно мышинового антитела, в каркасный остов человеческого антитела с другой специфичностью. Поскольку

трансплантация CDR может снизить специфичность и аффинность связывания и, таким образом, биологическую активность нечеловеческого антитела с привитой CDR, обратные мутации могут быть введены в выбранные положения антитела с привитым CDR, чтобы сохранить специфичность связывания и аффинность родительского антитела. Определение позиций для возможных обратных мутаций может быть выполнено с использованием информации, имеющейся в литературе и базах данных антител. Методом гуманизации, альтернативным трансплантации CDR и обратной мутации, является изменение поверхности, при которой сохраняются не экспонированные на поверхности остатки нечеловеческого происхождения, а поверхностные остатки заменяются на остатки человеческого происхождения. Другой альтернативный метод известен под названием «управляемый отбор» (Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12, 899) и может быть использован для получения, например, из антитела мыши или крысы полностью человеческого антитела, сохраняющего эпитоп и характеристики связывания родительского антитела. Еще один метод гуманизации – это так называемая 4D-гуманизация. Протокол 4D-гуманизации описан в заявке на патент США 20110027266 A1 (WO2009032661A1) и проиллюстрирован ниже в качестве примера применения 4D-гуманизации для гуманизации переменных доменов легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепей крысиного антитела.

Для химерных антител гуманизация обычно включает модификацию каркасных областей в последовательностях переменной области.

Аминокислотные остатки, которые являются частью CDR, как правило, не будут изменены в связи с гуманизацией, хотя в некоторых случаях может быть желательно изменить отдельные аминокислотные остатки CDR, например для удаления сайта гликозилирования, сайта деамидирования, сайта изомеризации или нежелательного остатка цистеина. N-связанное гликозилирование происходит путем присоединения олигосахаридной цепи к остатку аспарагина в трипептидной последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме Pro. Удаление сайта N-гликозилирования может быть достигнуто путем мутации остатка Asn или Ser/Thr до другого остатка, в частности, путем консервативной замены. Деамидирование остатков аспарагина и глутамина может происходить в зависимости от таких факторов, как pH и обнажение поверхности. Остатки аспарагина особенно чувствительны к деамидированию, прежде всего, когда они находятся в последовательности Asn-Gly, и в меньшей степени в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala. Когда такой сайт деамидирования, в частности Asn-Gly, присутствует в последовательности CDR, может быть желательно, таким образом, удалить этот сайт, обычно путем консервативной замены для удаления одного из задействованных остатков. Замена в

последовательности CDR для удаления одного из задействованных остатков также входит в объем настоящего изобретения.

«Фрагменты антител» содержат часть интактного антитела, в частности антигенсвязывающую область или вариабельную область интактного антитела.

- 5 Примеры фрагментов антител включают Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, диатела, биспецифические и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагмент антитела также может быть однодоменным антителом, таким как антитело из тяжелой цепи или VHH.

- 10 Понятие «Fab» обозначает фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу около 50000 дальтон и антигенсвязывающую активность, в котором около половины N-концевой стороны H-цепи и вся L-цепь, среди фрагментов, полученных обработкой IgG протеазой, например папаином, связаны между собой дисульфидной связью.

- 15 Понятие «биспецифический» в отношении антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению относится к антигенсвязывающим белкам по меньшей мере с двумя валентностями и специфичностями связывания с двумя разными антигенами и, таким образом, включает два антигенсвязывающих сайта. Понятие «валентность» обозначает число сайтов связывания антигенсвязывающего белка, например, двухвалентный антигенсвязывающий белок обозначает антигенсвязывающий белок, который имеет два сайта связывания. Следует отметить, что понятие «валентность»
20 относится к числу сайтов связывания, при этом эти сайты связывания могут связываться с одними и теми же или разными мишенями, то есть двухвалентный антигенсвязывающий белок может быть моноспецифическим, то есть связывающим одну мишень, или биспецифическим, то есть связывающим две разные мишени. Мишени могут быть антигенами, целевыми пептидами, нецелевыми элементами, то
25 есть подобными пептидами или тому подобное.

В контексте настоящего изобретения предпочтительно, чтобы по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт был произведен от TCR, конкретнее, чтобы по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт содержал TCR-производные CDR, как определено в контексте настоящего изобретения.

- 30 В контексте настоящего изобретения для термина «биспецифический» предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна специфичность сайтов связывания антигена происходила от TCR, конкретнее, чтобы по меньшей мере один сайт связывания антигена содержал TCR-производные CDR, как определено в контексте настоящего изобретения. Соответственно, понятие «биспецифический» в контексте
35 настоящего изобретения относится к антигенсвязывающему белку, который объединяет по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, включающий CDR, как определено в контексте настоящего изобретения, то есть TCR-производные CDR, и по меньшей мере

один дополнительный антигенсвязывающий сайт, при этом указанный по меньшей мере один дополнительный сайт связывания антигена, может происходить от антитела и, таким образом, содержать участки CDR антител, или от дополнительного TCR и, таким образом, содержать участки CDR дополнительного TCR. Однако в предпочтительном варианте осуществления указанный дополнительный сайт связывания антигена происходит от антитела и, таким образом, содержит участки CDR антитела.

Понятие «формат» в настоящем документе относится к антигенсвязывающему белку, включающему определенное число и тип доменов, которые присутствуют в указанном антигенсвязывающем белке, и его пространственную организацию.

Многие различные форматы, такие как биспецифические форматы, описаны в данной области знаний, обычно в контексте антител; такие форматы обычно включают неограничивающие примеры, такие как диатела, двойной вариабельный домен с перекрестной ориентацией (CODV) и/или белки с двойным вариабельным доменом (DVD). Обзор этих различных биспецифических антител и способов их получения представлен, например, в публикации Brinkmann U. and Kontermann E.E. MAbs. 2017 Feb-Mar; 9(2): 182–212. В частности, формат DVD раскрыт, например, в следующих научных статьях (Wu C et al. Nat Biotechnol 2007; 25:1290-7; PMID:17934452; Wu C. et al. MAbs 2009; 1:339-47; Lacy SE et al. MAbs 2015; 7:605-19; PMID:25764208; Craig RB et al. PLoS One 2012; 7:e46778; PMID:23056448; Piccione EC et al. MAbs 2015). CODV, например, описан в публикации Onuoha SC et al. Arthritis Rheumatol. 2015 Oct; 67(10):2661-72 или, например, в заявках WO2012/135345, WO2016/116626. Биспецифические диатела описаны, например, в публикации Holliger P et al. Protein Eng 1996; 9:299-305; PMID:8736497; Atwell JL et al. Mol Immunol 1996; 33:1301-12; PMID:9171890; Kontermann RE, Nat Biotechnol 1997; 15:629-31; PMID:9219263; Kontermann RE et al. Immunotechnology 1997; 3:137-44; PMID:9237098; Cochlovius B et al. Cancer Res 2000; 60:4336-41; PMID:10969772; и DeNardo DG et al. Cancer Biother Radiopharm 2001; 16:525-35; PMID:11789029.

Понятие «Диатела», используемый в контексте антител, обычно относится к двухвалентным молекулам, состоящим из двух цепей, каждая из которых содержит домены VH и VL, каждый либо от одного, либо от разных антител. Эти две цепи обычно имеют конфигурацию VHA-VLB и VHB-VLA (A и B представляют две разные специфичности) или VLA-VHB и VLB-VHA.

В контексте настоящего изобретения «диатела (Db)» или «формат диатела» в данном документе относится к двухвалентным молекулам, состоящим из двух полипептидных цепей, каждая из которых содержит два вариабельных домена, соединенных линкером (LDb1 и LDb2), где два из доменов являются первым и вторым доменами, как определено в контексте настоящего изобретения (V1 и V2), а два других

домена могут быть переменными доменами (V_A , V_B), производными от TCR или от антитела. Домены V_1 и V_2 расположены на двух разных полипептидах, и V_A и V_B домены расположены на двух разных полипептидах, и эти домены димеризуются в ориентации голова к хвосту. Соответственно, ориентация может быть V_1 - L_{Db1} - V_A и V_B - L_{Db2} - V_2 , V_2 - L_{Db1} - V_A и V_B - L_{Db2} - V_1 , V_1 - L_{Db1} - V_B и V_A - L_{Db2} - V_2 или V_2 - L_{Db1} - V_B и V_A - L_{Db2} - V_1 . Для того чтобы домены димеризовались в ориентации голова к хвосту линкеры, то есть L_{Db1} и L_{Db2} , могут быть одинаковыми или разными и представляют собой короткие линкеры. Короткий линкер представляет собой линкер, который обычно имеет длину от 2 до 12, от 3 до 13 аминокислот, в частности длиной 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 аминокислот, например длиной 4, 5 (Brinkmann U. and Kontermann E.E. (MAbs. 2017 Feb-Mar; 9(2): 182–212) или 8 аминокислот, например «GGGS» с SEQ ID NO: 100, «GGGGS» с SEQ ID NO: 101 или «GGGSGGGG» с SEQ ID NO: 96.

Формат «иммуноглобулин с двумя переменными доменами (DVD-IgTM)» был первоначально описан в 2007 году в публикации Wu C. et al. (Nat Biotechnol. 2007 Nov; 25(11):1290-7). В этом формате мишень-связывающие переменные домены, как правило, второго моноклонального антитела (B) обычно слиты с обычным антителом (A) (включающим домены V_{LA} и V_{HA}), при этом легкая цепь обычного антитела (A), таким образом, содержит дополнительный переменный домен легкой цепи (V_{LB}), а тяжелая цепь обычного антитела (A) содержит дополнительный переменный домен тяжелой цепи (V_{HB}). Таким образом, DVD-IgTM, как описано в данной области знаний, обычно состоит из двух полипептидных цепей, при этом одна тяжелая цепь содержит V_{HB} -L- V_{HA} - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} и одна легкая цепь содержит V_{LB} -L- V_{LA} - C_L . Пары доменов V_{LA}/V_{HA} и V_{LB}/V_{LA} , таким образом, соединяются параллельно.

В контексте настоящего изобретения «формат Ig с двойным переменным доменом» относится к белку, включающему две полипептидные цепи, каждая из которых содержит два переменных домена, соединенных линкером (L_1 , L_3), где два из доменов являются первым и вторым доменами, как определено в контексте настоящего изобретения (V_1 и V_2), а два других домена представляют собой производные от антитела переменные домены тяжелой и легкой цепей (V_{HA} и V_{HB}). В формате DVD-Ig в контексте настоящего изобретения полипептидные цепи имеют, например, организацию V_1 - L_1 - V_{HA} - L_2 - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} и V_2 - L_3 - V_{LA} - L_4 - C_L или V_2 - L_1 - V_{HA} - L_2 - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} и V_1 - L_3 - V_{LA} - L_4 - C_L . Соединяющие линкеры L_1 и L_3 предпочтительно имеют длину от 5 до 20 аминокислотных остатков, например от 5 до 15 аминокислотных остатков, и/или связывающие линкеры L_2 и L_4 могут присутствовать или отсутствовать.

«Ig-подобные белки с двойным переменным доменом с перекрестной ориентацией», как описано в данной области знаний в контексте антител, представляют собой формат, в котором два V_H и два V_L домена связаны таким образом, чтобы было

возможно спаривание переменных доменов V_H - V_L , которые имеют перекрестную ориентацию и расположены либо (от N- до C-конца) в порядке V_{HA} - V_{HB} и V_{LB} - V_{LA} , либо в порядке V_{HB} - V_{HA} и V_{LA} - V_{LB} .

В контексте настоящего изобретения «Ig-подобный белок с двойным переменным доменом с перекрестной ориентацией» обозначает белок, включающий две полипептидные цепи, каждая из которых содержит два переменных домена, соединенных линкером (L_1 , L_2 , L_3 и L_4), где два из доменов являются первым и вторым доменами, как определено в контексте настоящего изобретения (V_1 и V_2), а два других домена представляют собой производные от антитела переменные домены тяжелой и легкой цепей (V_{HA} , V_{HB}). В формате CDVD-Ig в контексте настоящего изобретения полипептидные цепи имеют, например, организацию V_1 - L_1 - V_{HA} - L_2 - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} и V_{LA} - L_3 - V_2 - L_4 - C_L , V_2 - L_1 - V_{HA} - L_2 - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} и V_{LA} - L_3 - V_1 - L_4 - C_L , V_{HA} - L_1 - V_1 - L_2 - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} и V_2 - L_3 - V_{LA} - L_4 - C_L или V_{HA} - L_1 - V_2 - L_2 - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} и V_1 - L_3 - V_{LA} - L_4 - C_L . В этом формате CDVD линкеры (от L_1 до L_4) обычно имеют разную длину, включая линкеры, полностью состоящие из глицина, и линкеры, описанные в данном изобретении в разделе о линкерах. Например, L_1 имеет длину от 3 до 12 аминокислотных остатков, L_2 имеет длину от 3 до 14 аминокислотных остатков, L_3 имеет длину от 1 до 8 аминокислотных остатков, а L_4 имеет длину от 1 до 3 аминокислотных остатков, или L_1 имеет длину от 5 до 10 аминокислотных остатков, L_2 имеет длину от 5 до 8 аминокислотных остатков, L_3 имеет длину от 1 до 5 аминокислотных остатков, а L_4 имеет длину от 1 до 2 аминокислотных остатков или L_1 имеет длину 7 аминокислотных остатков, L_2 имеет длину 5 аминокислотных остатков, L_3 составляет 1 аминокислотный остаток в длину, а L_4 имеет длину 2 аминокислотных остатка.

Понятие «по меньшей мере один» в настоящем документе относится к одному или нескольким указанным объектам, например 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или более указанных объектов. Например, по меньшей мере один сайт связывания в настоящем документе означает 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или более сайтов связывания.

Последовательность, которая «по меньшей мере на 85 % идентична референтной последовательности», представляет собой последовательность, которая по всей длине на 85 % или более, в частности на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентична всей длине референтной последовательности.

В контексте настоящей заявки «процент идентичности» рассчитывается с использованием глобального попарного выравнивания (то есть две последовательности сравниваются по всей их длине). Способы сравнения идентичности двух или более последовательностей хорошо известны в данной области знаний. Может, например, быть использована программа «needle», которая реализует алгоритм глобального выравнивания Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol.

Biol. 48: 443-453), для нахождения оптимального выравнивания двух последовательностей (включая пропуски) при рассмотрении всей их длины. Программа needle доступна, например, на сайте в сети Интернет и, кроме того, описана в следующей публикации (*EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite* (2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp. 276—277). Процент идентичности двух полипептидов, в соответствии с данным изобретением, рассчитывается с использованием EMBOSS: (глобальной) программы needle с параметром «Gap Open», равным 10,0, параметром «Gap Extend», равным 0,5, и матрицей Blosum62.

Белки, состоящие из аминокислотной последовательности, «идентичной по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 %» референтной последовательности, могут содержать аминокислотные мутации, такие как делеции, вставки и/или замены, по сравнению с референтной последовательностью. В случае замен, белок, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичной референтной последовательности, может соответствовать гомологичной последовательности, происходящей от иного биологического вида, чем референтная последовательность.

«Аминокислотные замены» могут быть консервативными или неконсервативными. Предпочтительно замены представляют собой консервативные замены, при которых одна аминокислота заменяется другой аминокислотой с аналогичными структурными и/или химическими свойствами.

В одном из вариантов осуществления консервативные замены могут включать такие, которые описаны Dayhoff в документе «The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5», Natl. Biomedical Research, содержание которого включено во всей полноте посредством ссылки. Например, в одном аспекте аминокислоты, которые принадлежат к одной из следующих групп, могут быть заменены друг на друга, составляя таким образом консервативный обмен: группа 1: аланин (A), пролин (P), глицин (G), аспарагин (N), серин (S), треонин (T); группа 2: цистеин (C), серин (S), тирозин (Y), треонин (T); группа 3: валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), аланин (A), фенилаланин (F); группа 4: лизин (K), аргинин (R), гистидин (H); группа 5: фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W), гистидин (H); и группа 6: аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E). В одном аспекте консервативная аминокислотная замена может быть выбрана из следующих: $T \rightarrow A$, $G \rightarrow A$, $A \rightarrow I$, $T \rightarrow V$, $A \rightarrow M$, $T \rightarrow I$, $A \rightarrow V$, $T \rightarrow G$ и/или $T \rightarrow S$.

В другом варианте осуществления консервативная аминокислотная замена может включать замену аминокислоты другой аминокислотой того же класса, например (1) неполярные: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp.; (2) незаряженные полярные: Gly, Ser,

Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) кислые: Asp, Glu; и (4) основные: Lys, Arg, His. Другие консервативные аминокислотные замены также могут быть выполнены следующим образом: (1) ароматические: Phe, Tyr, His; (2) доноры протона: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; и (3) акцепторы протона: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (см., например, патент США № 10 106 805, содержание которого включено во всей полноте посредством ссылки).

В другом варианте осуществления консервативные замены могут быть выполнены в соответствии с таблицей 1. Способы прогнозирования толерантности к модификации белка можно найти, например, в документе Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101 (25): 9205-9210 (2004), содержание которого включено во всей полноте посредством ссылки.

Таблица 1: Консервативная аминокислотная замена

Консервативные аминокислотные замены	
Аминокислота	Замены (другие известны из уровня техники)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

В другом варианте осуществления консервативными заменами могут быть такие, которые показаны в Таблице 2 под определением термина «консервативные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда могут быть внесены более существенные изменения, обозначенные в Таблице 2 как «примеры замен», и при необходимости продукты будут подвергнуты скринингу.

Таблица 2: Консервативная аминокислотная замена

Аминокислотные замены		
Исходный остаток (встречающаяся в природе аминокислота)	Консервативные замены	Примеры замен
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок может включать вариантный антигенсвязывающий белок, при этом указанный вариантный антигенсвязывающий белок включает первую полипептидную цепь (такую как α -цепь) и вторую полипептидную цепь (такую как β -цепь), включающую до 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислотных замен, предпочтительно в областях CDR первого переменного домена (такого как домен Вальфа) и второго переменного домена

(такого как домен Vбета) по сравнению с антигенсвязывающим белком, от которого был произведен данный вариант. В связи с этим может быть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислотных замен в каждой из областей CDR антигенсвязывающего белка или во всех областях CDR первого и/или второго 5
вариабельного домена. Замены могут быть в CDR в первом и/или во втором вариабельном домене.

В одном варианте осуществления вариант представляет собой функциональный вариант.

«Функциональный вариант» в настоящем документе обозначает 10
антигенсвязывающий белок, имеющий существенную или значительную идентичность последовательности или подобие с родительским антигенсвязывающим белком, такой как антигенсвязывающие белки, включающие консервативные аминокислотные замены, где указанный функциональный вариант сохраняет биологическую активность 15
родительского антигенсвязывающего белка. В одном аспекте функциональные варианты включают, например, те варианты антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе (антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, в этом случае сами называются родительскими антигенсвязывающими 20
белками), которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени в аналогичной степени, в той же степени или в большей степени, что и родительские антигенсвязывающие белки. Что касается родительского антигенсвязывающего белка, функциональный вариант может, например, иметь аминокислотную 25
последовательность, которая является идентичной по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % аминокислотной последовательности родительского антигенсвязывающего белка.

Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность родительского антигенсвязывающего белка по меньшей мере с 30
одной консервативной аминокислотной заменой. Альтернативно или дополнительно функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность родительского антигенсвязывающего белка по меньшей мере с одной неконсервативной аминокислотной заменой. В этом случае предпочтительно, чтобы неконсервативная аминокислотная замена не мешала или не подавляла биологическую активность 35
функционального варианта. Предпочтительно неконсервативная аминокислотная замена усиливает биологическую активность функционального варианта, таким образом биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с родительским антигенсвязывающим белком.

Модифицированные TCR, полипептиды и антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению (включая функциональные части и функциональные

варианты) могут иметь любую длину, то есть могут содержать любое количество аминокислот при условии, что модифицированные TCR, полипептиды или белки (или их функциональные части или функциональные варианты) сохраняют свою биологическую активность, например способность специфически связываться с антигеном, обнаруживать больные клетки у хозяина или лечить или предотвращать заболевание у хозяина и так далее.

Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению (включая функциональные части и функциональные варианты) могут содержать синтетические аминокислоты вместо одной или нескольких встречающихся в природе аминокислот.

Такие синтетические аминокислоты известны в данной области знаний и могут включать, например, аминокислоты: циклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α-амино-н-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометилцистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β-фенилсерин, β-гидроксифенилаланин, фенилглицин, α-нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты, N'-бензил-N'-метиллизин, N',N'-дибензиллизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α-аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогептанкарбоновую кислоту, α-(2-амино-2-норборнан)карбоновую кислоту, α,γ-диаминомасляную кислоту, α,β-диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин и α-трет-бутилглицин.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению (включая функциональные части и функциональные варианты) может быть гликозилирован, амидирован, карбоксилирован, фосфорилирован, этерифицирован, N-ацилирован, циклизован, например, через дисульфидный мостик, или превращен в кислотно-аддитивную соль и/или, факультативно, димеризован, или полимеризован или конъюгирован.

Антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению может быть синтетическим, рекомбинантным, выделенным и/или очищенным.

“Ковалентная связь» в настоящем документе обозначает, например, дисульфидный мостик или пептидную связь, или ковалентную связь через линкер, или линкерную последовательность, такую как полипептидный линкер.

Понятие «линкер» в настоящем документе относится к одному или нескольким аминокислотным остаткам, встроенным между двумя доменами, чтобы обеспечить достаточную подвижность доменов, например, в одноцепочечных конструкциях, между первым переменным доменом и вторым переменным доменом антигенсвязывающих белков по изобретению и, факультативно, между переменными

доменами переменных доменов легкой и тяжелой цепей, для правильной укладки с образованием сайта связывания антигена или, в случае биспецифических антигенсвязывающих белков, для образования сайта связывания антигена и по меньшей мере одного дополнительного сайта связывания антигена, либо в конфигурации перекрестного спаривания (в формате CODV или в некоторых форматах диател), либо в конфигурации параллельного спаривания (например, в формате DVD) антигенсвязывающих белков по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из 0 аминокислот, что означает, что линкер отсутствует. Линкер встраивают в переходный участок между переменными доменами или между переменными и константными доменами, соответственно, на уровне аминокислотной последовательности. Переходный участок между доменами можно идентифицировать, поскольку приблизительный размер доменов иммуноглобулина, а также доменов TCR хорошо известен. Специалистам в данной области известно, что точное положение переходного участка между доменами может быть определено путем нахождения участков пептида, которые не образуют вторичных структурных элементов, таких как бета-листы или альфа-спирали, что подтверждается экспериментальными данными, или может быть определено или предположено с помощью методов моделирования или предсказания вторичной структуры. Понятие линкер, используемый в контексте настоящего изобретения, обозначает, но не ограничивается линкерами, обозначаемыми как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆.

Линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может иметь длину по меньшей мере от 1 до 30 аминокислот, если в соответствующем контексте не указано иное. В некоторых вариантах осуществления линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может состоять из 2-25, 2-20 или 3-18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₅ и L₆, может быть пептидом длиной не более 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может состоять из 5-25, 5-15, 4-11, 10-20 или 20-30 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может быть длиной примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. В конкретном варианте осуществления линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может быть длиной менее 24, менее 20, менее 16, менее 12, менее 10 аминокислотных остатков, например от 5 до 24, от 10 до 24 или 5-10 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления указанный линкер имеет длину 1 или более аминокислотных остатков, например более 1, более 2, более 5, более 10, более 20, более 22 аминокислотных остатков.

Примеры линкеров, таких как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, включают или состоят из аминокислотной последовательности, выбранной из группы аминокислот, состоящей из аминокислотных последовательностей

5 TVAAP (SEQ ID NO: 99), GGS (SEQ ID NO: 100), GGG (SEQ ID NO: 101),
 GSGG (SEQ ID NO: 140), TVLRT (SEQ ID NO: 102), TVSSAS (SEQ ID NO: 103),
 GGGSGGG (SEQ ID NO: 96), GGGSGT (SEQ ID NO: 148), GSGGGSGG (SEQ ID
 NO: 141), GGGSGGGG (SEQ ID NO: 104), GSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 143),
 GGGGAAA (SEQ ID NO: 105), GGGSGGGSGT (SEQ ID NO: 155)
 GGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO: 106), GGGSGGGSGGGSGT (SEQ ID NO: 161),
 10 GGGSGGGSGGGSGGGSGT (SEQ ID NO: 163), GSGGGSGGGSGGGSGG
 (SEQ ID NO: 144), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGT (SEQ ID NO: 165),
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 107),
 GSGGGSGGGSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 145),
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 108), GSADDAKKDAKKDGKS
 15 (SEQ ID NO: 146), GGQSGGTGSGQGSGGTGSGQGS (SEQ ID NO: 147), TVLSSAS
 (SEQ ID NO: 109) и GGGSGGGSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 110), в частности
 GGGSGGG (SEQ ID NO: 96), GGGSGGGSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 110) и
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 108).

Понятие «F_c-домен» в контексте настоящего изобретения охватывает нативные F_c-
 20 домены и варианты и последовательности F_c-доменов, как дополнительно определено
 ниже в настоящем документе. Как и в случае с F_c-вариантами и нативными F_c-
 молекулами, понятие «F_c-домен» включает молекулы в мономерной или мультимерной
 форме, независимо от того, получены они из полноразмерного антитела или получены
 другим способом.

25 Понятие «нативный F_c» в настоящем документе относится к молекуле,
 включающей последовательность неантигенсвязывающего фрагмента, полученного в
 результате переваривания антитела или полученного другими способами, в
 мономерной или мультимерной форме, и может содержать шарнирную область.
 Исходный иммуноглобулиновый источник нативного F_c имеет, в частности,
 30 человеческое происхождение и может представлять собой любой из иммуноглобулинов,
 предпочтительно IgG1 или IgG2, наиболее предпочтительно IgG1. Нативные F_c
 молекулы состоят из мономерных полипептидов, которые могут быть связаны в
 димерные или мультимерные формы ковалентной (то есть дисульфидной связью) и
 нековалентной связью. Число межмолекулярных дисульфидных связей между
 35 мономерными субъединицами нативных молекул F_c составляет от 1 до 4 в зависимости
 от класса (например, IgG, IgA и IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 и
 IgGA2). Одним из примеров нативного F_c является дисульфидно-связанный димер,

полученный в результате расщепления IgG папаином. Понятие «нативный F_c» в настоящем документе является общим для мономерных, димерных и мультимерных форм. Одним из примеров нативной аминокислотной последовательности F_c является аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 111, которая представляет собой нативную аминокислотную последовательность F_c IGHG1*01.

Понятие «шарнир» или «шарнирная область», или «шарнирный домен» обозначает обычно гибкую часть тяжелой цепи, расположенной между доменом C_{H1} и доменом C_{H2}. Она состоит примерно из 25 аминокислот и подразделяется на «верхний шарнир», «средний шарнир» (или «сердцевинную шарнирную область») и «нижний шарнир». Понятие «шарнирный поддомен» обозначает верхний шарнир, средний шарнир (или сердцевинную шарнирную область) или нижний шарнир. Аминокислотные последовательности шарниров молекулы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 указаны ниже в настоящем документе:

IgG1: E₂₁₆PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 114)

IgG2: E₂₁₆RKCCVECPPPCPAPPVAGP (SEQ ID NO: 115)

IgG3: ELKTP LGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE₂₁₆PKSCDTPPPCPRCPAPELLG (SEQ ID NO: 116)

IgG4: E₂₁₆SKYGPPCPSCPAPEFLG (SEQ ID NO: 117).

В контексте настоящего изобретения это относится к положениям аминокислот в F_c-домене, эти аминокислотные положения или остатки указаны в соответствии с системой нумерации EC, как описано, например, в публикации Edelman, GM et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969).

Понятие «F_c-вариант» в настоящем документе относится к молекуле или последовательности, которая модифицирована от нативного F_c но все еще содержит сайт связывания для рецептора реутилизации, F_cRn (неонатальный F_c-рецептор). Примеры F_c-вариантов и их взаимодействия с рецептором реутилизации известны в данной области знаний. Таким образом, понятие «F_c-вариант» может включать молекулу или последовательность, которая была получена гуманизацией нативного F_c нечеловеческого происхождения. Кроме того, нативный F_c включает области, которые можно удалить, поскольку они обеспечивают структурные особенности или биологическую активность, которые не требуются для антигенсвязывающих белков по данному изобретению. Таким образом, понятие «F_c-вариант» включает молекулу или последовательность, в которой отсутствует один или несколько нативных F_c-сайтов или остатков, или в которой один или несколько F_c-сайтов или остатков были модифицированы, что влияет на или вовлечено в следующее: (1) образование дисульфидной связи, (2) несовместимость с выбранной клеткой-хозяином, (3) гетерогенность N-конца при экспрессии в выбранной клетке-хозяине, (4)

гликозилирование, (5) взаимодействие с комплементом, (6) связывание с F_c -рецептором, отличным от рецептора реутилизации, или (7) антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

Соответственно, в одном варианте осуществления F_c -домен, такой как F_{c1} и/или F_{c2} , содержит шарнирный домен. В одном варианте осуществления F_c -домен представляет собой F_c -домен человеческого IgG, предпочтительно производный от человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно IgG1 или IgG2, более предпочтительно IgG1.

В некоторых вариантах осуществления, в частности, когда антигенсвязывающий белок содержит два F_c -домена, то есть имеет формат TCER™, описанный в настоящем документе ниже (например, F_{c1} и F_{c2}), два F_c -домена могут относиться к одному и тому же изотипу или подклассу изотипа иммуноглобулина или к другому изотипу или подклассу изотипа иммуноглобулина, предпочтительно к одному и тому же. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления F_{c1} и F_{c2} , относятся к подклассу IgG1 или подклассу IgG2, или подклассу IgG3, или подклассу IgG4, предпочтительно к подклассу IgG1, или подклассу IgG2, более предпочтительно, к подклассу IgG1.

В некоторых вариантах осуществления F_c -домен является вариантом F_c -домена и, таким образом, содержит одну или несколько аминокислотных замен, описанных в этом документе ниже.

В некоторых вариантах осуществления F_c -домен содержит или дополнительно содержит мутацию «RF» и/или «выступ-во-впадину», предпочтительно «выступ-во-впадину».

Понятие «RF-мутация» обычно относится к аминокислотным заменам аминокислот NY на RF в C_{H3} -домене F_c -доменов, таким как аминокислотная замена H435R и Y436F в домене C_{H3} , как описано в публикации Jendeborg, L. et al. (1997, J. Immunological Meth., 201: 25-34), и описывается как полезная для целей очистки, поскольку она устраняет связывание с белком A. В случае, если антигенсвязывающий белок содержит два F_c -домена, RF-мутация может быть в одном или обоих, предпочтительно в одном F_c -домене.

Понятие «выступ-во-впадину» или называемый также термином «выступ-во-впадину» относится к аминокислотным заменам T366S, L368A и Y407V (впадина) и T366W (выступ) в интерфейсе C_{H3} - C_{H3} для содействия образованию гетеромультимеров. Такие мутации типа «выступ-во-впадину» можно дополнительно стабилизировать путем введения дополнительных цистеиновых аминокислотных замен Y349C и S354C. Технология «выступ-во-впадину» вместе со стабилизирующими цистеиновыми аминокислотными заменами описана в патентах США №№ 5 731 168 и 8 216 805.

В контексте настоящего изобретения мутация «выступ» вместе с цистеиновой аминокислотной заменой S354C, например, присутствует в F_c-домене, включающем или состоящем из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, а мутация «впадина» вместе с цистеиновой аминокислотной заменой Y349C присутствует в F_c-домене, включающем или состоящем из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113.

В некоторых вариантах осуществления F_c-домен одного из полипептидов, например F_{c1}, содержит аминокислотную замену T366W (выступ) в C_{H3}-домене и F_c-домен другого полипептида, например F_{c2}, содержит аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V (впадина) в своем C_{H3}-домене или наоборот.

В некоторых вариантах осуществления F_c-домен одного из полипептидов, например F_{c1}, содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену S354C в C_{H3}-домене и F_c домен другого полипептида, например F_{c2}, содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену Y349C в своем C_{H3} домене или наоборот.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления F_c-домен одного из полипептидов, например F_{c1}, содержит аминокислотные замены S354C и T366W (выступ) в своем C_{H3} домене и F_c домен другого полипептида, например F_{c2}, содержит аминокислотные замены Y349C, T366S, L368A и Y407V (впадина) в C_{H3} домене или наоборот.

Этот набор аминокислотных замен может быть дополнительно расширен включением аминокислотных замен K409A в одном полипептиде и F405K в другом полипептиде, как описано Wei et al. (Structural basis of a novel heterodimeric F_c for bispecific antibody production, *Oncotarget*. 2017). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления F_c-домен одного из полипептидов, например F_{c1}, содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену K409A в C_{H3}-домене и F_c домен другого полипептида, например F_{c2}, содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену F405K в своем C_{H3} домене или наоборот.

В некоторых случаях искусственно введенные цистеиновые мостики могут улучшить стабильность антигенсвязывающих белков, оптимально без нарушения характеристик связывания антигенсвязывающих белков. Такие цистеиновые мостики могут дополнительно улучшить гетеродимеризацию.

Дополнительные аминокислотные замены, такие как замены заряженных пар, были описаны в данной области, например, в заявке EP 2 970 484, для улучшения гетеродимеризации полученных белков.

Соответственно, в одном варианте осуществления F_c-домен одного из полипептидов, например F_{c1}, содержит или дополнительно содержит замены заряженных пар E356K, E356R, D356R или D356K и D399K или D399R и F_c-домен другого

полипептида, например F_{c2} , содержит или дополнительно содержит замены заряженных пар R409D, R409E, K409E или K409D и N392D, N392E, K392E или K392D или наоборот.

В другом варианте осуществления F_c -домен в одной или обеих, предпочтительно в обеих, полипептидных цепях может содержать одно или несколько изменений, которые ингибируют связывание гамма-рецептора F_c ($F_{cy}R$). Такие изменения могут включать L234A, L235A.

С включением F_c -частей, состоящих из шарниров, C_{H2} и C_{H3} доменов или их частей, в антигенсвязывающие белки, в частности в биспецифические антигенсвязывающие белки, возникла проблема неспецифической иммобилизации этих молекул, индуцированной взаимодействием $F_c:F_c$ -гамма рецептор ($F_{cg}R$). $F_{cg}R$ состоят из различных молекул клеточной поверхности ($F_{cg}RI$, $F_{cg}RIIa$, $F_{cg}RIIb$, $F_{cg}RIII$), которые связываются с разным сродством с эпитопами, представленными F_c -частями IgG-молекул. Поскольку такая неспецифическая (то есть не индуцированная каким-либо из двух связывающих доменов биспецифической молекулы) иммобилизация является неблагоприятной из-за i) влияния на фармакокинетику молекулы и ii) нецелевой активации иммунных эффекторных клеток, были идентифицированы различные F_c -варианты и мутации для отмены $F_{cg}R$ -связывания. В этом контексте, Morgan et al. 1995, Immunology (The N-terminal end of CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, $F_{cy}RI$ and $F_{cy}RIII$ binding) раскрывают замену остатков 233-236 человеческого IgG1 на соответствующую последовательность, полученную из человеческого IgG2, то есть на остатки 233P, 234V и 235A, где отсутствует аминокислота в положении 236, что приводит к отмене связывания $F_{cg}RI$, отмене связывания C1q и уменьшению связывания $F_{cg}RIII$. Заявка EP1075496 раскрывает антитела и другие F_c -содержащие молекулы с вариациями в области F_c (например, один или несколько из 233P, 234V, 235A и без остатка или G в положении 236 и 327G, 330S и 331S), где рекомбинантное антитело способно связывать целевую молекулу без запуска значительного комплемент-зависимого лизиса или опосредованного клетками разрушения целевой мишени.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления область F_c содержит или дополнительно содержит одну или несколько аминокислот или делеций, выбранных из группы, состоящей из 233P, 234V, 235A, 236 (без остатка) или G, 327G, 330S, 331S, предпочтительно область F_c содержит или дополнительно содержит аминокислоты 233P, 234V, 235A, 236 (без остатка) или G и одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из 327G, 330S, 331S, наиболее предпочтительно область F_c содержит или дополнительно содержит аминокислоты 233P, 234V, 235A, 236 (без остатка) и 331S.

В еще одном варианте осуществления F_c-домен содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену N297Q, N297G или N297A, предпочтительно N297Q.

Аминокислотная замена «N297Q», «N297G» или «N297A» относится к аминокислотным заменам в положении 297, которые инактивируют нативный сайт N-гликозилирования в F_c-домене. Эта аминокислотная замена дополнительно предотвращает взаимодействие F_c-гамма-рецептора и снижает вариабельность конечных белковых продуктов, то есть антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, за счет сахаридных остатков, как описано, например, в публикации Тао, МН и Morrison, SL (J Immunol. 1989 Oct 15;143(8):2595-601.).

Еще в одном варианте осуществления, в частности когда нет легкой цепи, F_c-домен содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену S220C. Аминокислотная замена «S220C» исключает цистеин, образующий C_{H1}-CL дисульфидный мостик.

В некоторых вариантах осуществления F_c-домен содержит или дополнительно содержит по меньшей мере два дополнительных остатка цистеина, например S354C и Y349C или L242C и K334C, где S354C находится в F_c-домене одного полипептида, такого как F_{c1}, а Y349C находится в F_c-домене другого полипептида, такого как F_{c2}, с образованием гетеродимера и/или где L242C и K334C расположены в одном F_c-домене, F_{c1} или F_{c2}, одного или обоих полипептидов с образованием внутримолекулярного C-C-мостика.

Под «очищенным» и «выделенным» подразумевается, что указанная молекула присутствует при фактическом отсутствии других биологических макромолекул того же типа, когда речь идет о полипептиде (то есть антигенсвязывающем белке по изобретению) или последовательности нуклеотидов. Понятие «очищенный» в настоящем документе означает, в частности, присутствие по меньшей мере 75 %, 85 %, 95 % или 98 % по массе биологических макромолекул одного и того же типа.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая конкретный полипептид, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая по существу не содержит других молекул нуклеиновой кислоты, которые не кодируют рассматриваемый полипептид; однако эта молекула может включать некоторые дополнительные основания или фрагменты, которые не влияют отрицательно на основные характеристики композиции.

«Доменом» может быть любая область белка, обычно определяемая на основе гомологии последовательностей и часто связанная с конкретной структурной или функциональной единицей.

«Рекомбинантная» молекула – это молекула, которая была получена, экспрессирована, создана или выделена рекомбинантным способом.

Понятие «ген» означает последовательность ДНК, которая кодирует или соответствует определенной последовательности аминокислот, которая включает весь или часть одного или нескольких белков или ферментов и может включать или не включать регуляторные последовательности ДНК, такие как промоторные последовательности, которые определяют, например, условия, при которых экспрессируется ген. Некоторые гены, которые не являются структурными генами, могут транскрибироваться из ДНК в РНК, но не транслируются в аминокислотную последовательность. Другие гены могут функционировать как регуляторы структурных генов или как регуляторы транскрипции ДНК. В частности, понятие «ген» может означать геномную последовательность, кодирующую белок, то есть последовательность, включающую последовательности регулятора, промотора, интрона и экзона.

«Аффинность (сродство)» теоретически определяется равновесным связыванием между антигенсвязывающим белком и антигеном, в контексте настоящего изобретения – равновесным связыванием между антигенсвязывающим белком и его антигеном, а именно антигенным пептидом MAGE-A, включающим или состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, в комплексе с белком MHC.

Аффинность может быть выражена, например, в форме полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) или равновесной константы диссоциации (K_D).

« K_D » – равновесная константа диссоциации, отношение k_{off}/k_{on} , между антигенсвязывающим белком и его антигеном. K_D и аффинность находятся в обратной зависимости. Значение K_D относится к концентрации антигенсвязывающего белка, и чем ниже значение K_D , тем выше сродство антигенсвязывающего белка. Аффинность, то есть значение K_D , можно экспериментально оценить с помощью множества известных методов, таких как измерение скоростей ассоциации и диссоциации с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или биослойной интерферометрии (BLI), как более подробно описано в настоящем документе ниже в разделе «Антигенсвязывающие белки».

«Полумаксимальная эффективная концентрация», также называемая « EC_{50} », обычно относится к концентрации молекулы, которая вызывает ответ на половинном уровне между исходным и максимальным уровнем после определенного времени воздействия. EC_{50} и аффинность находятся в обратной зависимости; чем ниже значение EC_{50} , тем выше аффинность молекулы. В одном примере « EC_{50} » относится к концентрации антигенсвязывающего белка по изобретению, которая вызывает половинный ответ между исходным и максимальным уровнем после определенного времени воздействия, более конкретно, относится к концентрации антигенсвязывающего белка по изобретению, которая вызывает половинный ответ

между исходным и максимальным уровнем после указанного времени воздействия. Значения EC_{50} могут быть экспериментально оценены множеством известных методов, например с использованием анализа высвобождения IFN-гамма или анализа высвобождения LDH, как более подробно описано в настоящем документе ниже в

5 разделе «Антигенсвязывающие белки».

«CD3» представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех разных цепей. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 γ , цепь CD3 δ и две цепи CD3 ϵ . Эти цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), и ζ -цепью, чтобы генерировать сигнал активации в Т-лимфоцитах.

10 «CD28» также экспрессируется на Т-клетках и может обеспечивать костимулирующие сигналы, которые необходимы для активации Т-клеток. CD28 играет важную роль в пролиферации и выживании Т-клеток, продукции цитокинов и развитии Т-хелперов типа 2.

«CD134» также называется OX40. CD134/OX40 экспрессируется через 24-72 часа

15 после активации и может использоваться для определения вторичной костимулирующей молекулы.

«4-1BB» способен связываться с 4-1BB-лигандом на антигенпрезентирующих клетках (АПК), в результате чего генерируется костимулирующий сигнал для Т-клетки.

«CD5» – еще один пример рецептора, преимущественно обнаруживаемого на Т-

20 клетках, CD5 также обнаруживается на В-клетках на низком уровне.

«CD95» представляет собой еще один пример рецептора, модифицирующего функции Т-клеток, также известный как рецептор Fas, который опосредует передачу сигналов апоптоза с помощью Fas-лиганда, экспрессируемого на поверхности других клеток. Сообщалось, что CD95 модулирует управляемые TCR/CD3 сигнальные пути в

25 покоящихся Т-лимфоцитах.

«Молекула рецептора, специфичного к NK-клеткам» представляет собой, например, CD16, низкоаффинный Fc-рецептор и NKG2D.

Примером рецепторной молекулы, которая присутствует на поверхности как Т-клеток, так и естественных киллеров (NK), является CD2 и другие члены

30 суперсемейства CD2. CD2 способен действовать как костимуляторная молекула на Т- и NK-клетках.

«Трансмембранная область», как указано в пункте (ii) выше в настоящем документе, в контексте настоящего изобретения, может быть, например, трансмембранным доменом TCR альфа или бета.

35 «Цитоплазматическая сигнальная область» может быть, например, внутриклеточным доменом TCR альфа или бета.

«Диагностическое средство» в настоящем документе относится к обнаруживаемой молекуле или веществу, такому как флуоресцентная молекула, радиоактивная молекула или любые другие метки, известные в данной области знаний, которые обеспечивают сигнал (прямо или косвенно).

5 «Флуоресцентные молекулы», известные в данной области, включают флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE), флуорофоры для использования с синим лазером (например, PerCP, PE-Cy7, PE-Cy5, FL3 и APC или Cy5, FL4), флуорофоры для использования с красным, фиолетовым или УФ лазером (например, тихоокеанский синий, тихоокеанский оранжевый).

10 «Радиоактивные молекулы» включают, но не ограничиваются радиоактивным атомом для скинтиграфических исследований, например I^{123} , I^{124} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} , Tc^{99} . Антигенсвязывающие белки по изобретению могут также содержать спиновую метку для визуализации методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как магнитно-резонансная томография, МРТ), например йод-123, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Такие диагностические средства могут быть либо напрямую связаны (то есть физически связаны) с антигенсвязывающим белком, либо могут быть связаны опосредованно.

20 «Терапевтическое средство» в настоящем документе относится к средству, которое оказывает терапевтическое действие. В одном варианте осуществления такое терапевтическое средство может быть веществом, ингибирующим рост, таким как цитотоксическое средство или радиоактивный изотоп.

Термины «ингибитор роста» или «антипролиферативный агент» могут использоваться взаимозаменяемо, относятся к соединению или композиции, которые ингибируют рост клетки, особенно опухолевой клетки, *in vitro* или *in vivo*.

Понятие «цитотоксическое средство» в настоящем документе относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. Понятие «цитотоксическое средство» включает химиотерапевтические средства, ферменты, антибиотики и токсины, такие как 30 низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты, а также различные противоопухолевые или противораковые средства, описанные ниже. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой таксоид, барвинок, таксаны, майтанзиноид или аналог 35 майтанзиноида, такой как DM1 или DM4, небольшую лекарственную молекулу, производное томаимицина или пирролобензодиазепина, производное криптофицина, производное лептомицина, ауристатин или аналог доластатина, пролекарство,

ингибиторы топоизомеразы II, агент алкилирования ДНК, антитубулиновый агент, аналог CC-1065 или CC-1065.

Понятие «радиоактивный изотоп» используется для обозначения радиоактивных изотопов, подходящих для лечения рака, таких как At²¹¹, Bi²¹², Er¹⁶⁹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, In¹¹¹, P³², Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Sr⁸⁹ и радиоактивные изотопы Lu. Такие радиоизотопы обычно испускают в основном бета-излучение. В одном варианте осуществления радиоактивный изотоп представляет собой изотоп альфа-излучатель, точнее торий 227, который испускает альфа-излучение.

«Модифицирующий ФК фрагмент» в настоящем документе относится к фрагменту, который модифицирует фармакокинетику (ФК) антигенсвязывающего белка по изобретению. Соответственно, фрагмент модифицирует, в частности, *in vivo* период полувыведения и распределение антигенсвязывающего белка по изобретению. В предпочтительном варианте осуществления модифицирующий ФК фрагмент увеличивает период полувыведения антигенсвязывающего белка. Примеры модифицирующих ФК фрагментов, включают, среди прочего, PEG (Dozier *et al.*, (2015) Int J Mol Sci. Oct 28;16(10):25831-64 and Jevsevar *et al.*, (2010) Biotechnol J. Jan;5(1):113-28), технологию PASylation (Schlapschy *et al.*, (2013) Protein Eng Des Sel. Aug;26(8):489-501), альбумин (Dennis *et al.*, (2002) J Biol Chem. Sep 20;277(38):35035-43), F_c-часть антитела и/или неструктурированные полипептиды (Schellenberger *et al.*, (2009) Nat Biotechnol. Dec; 27(12):1186-90).

Под «периодом полувыведения (T_{1/2})» обычно понимается время, необходимое для того, чтобы половина количества лекарственного или другого вещества, попавшего в живой организм, была метаболизирована или выведена в результате нормальных биологических процессов. Таким образом, период полувыведения в контексте настоящего изобретения обозначает время, необходимое для выведения половины количества антигенсвязывающего белка по изобретению, например у мышей. Период полувыведения можно определить известными в данной области знаний методами. В одном примере период полувыведения определяют согласно подробному описанию в Примере 10. Соответственно, в одном примере период полувыведения определяют путем введения антигенсвязывающего белка по изобретению, например, мышам, таким как мыши NOG с тяжелым иммунодефицитом, например путем внутривенного введения с последующим взятием образцов плазмы, например из ретробульбарного сплетения, в различные моменты времени, например в моменты времени 0 ч, 0,1 ч, 2 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 120 ч, 240 ч и 360 ч. Затем уровни антигенсвязывающего белка в плазме определяют методами, известными в данной области знаний, такими как ИФА, используя различные схемы, например анализ F_c – V_L и анализ CD3 – pMHC. Плазменные концентрации образцов обычно получают путем интерполяции из соответствующих стандартных

кривых, а затем обычно определяют период полувыведения с помощью линейной регрессии плазменной концентрации, полученной в разные моменты времени.

Антигенсвязывающие белки

5 Используя TCR R7P1D5, раскрытый в заявке WO 2017/158103, в качестве отправной точки, авторы данного изобретения разработали, произвели и протестировали варианты переменного домена альфа цепи (Vальфа) TCR и, факультативно, переменного домена бета-цепи (Vбета) TCR либо в одноцепочечном формате (scTCR) с использованием дрожжевого скринингового анализа, как описано в
10 примерах 1 и 2 в данном документе, либо в одноцепочечной биспецифической конструкции TCR для дальнейшей оптимизации аффинности связывания, а также выхода и стабильности растворимых биспецифических конструкций scTCR, как описано в примере 4. Таким образом, авторы изобретения идентифицировали различные варианты переменного альфа-домена и, факультативно, бета-домена, более
15 конкретно, разные варианты CDRa3 (с 5 вариантами) переменного альфа-домена, которые могут быть выгодно скомбинированы с CDRa1, CDRa2, CDRb1, CDRb2 и/или CDRb3 родительского TCR или с любым из вариантов CDR, обнаруженных для CDRa1 (1 вариант), CDRa2 (3 варианта), CDRb1 (1 вариант), CDRb2 (5 вариантов) и/или CDRb3 (1 вариант), которые представляют собой варианты, обладающие
20 преимуществом в отношении связывания мишени антигенсвязывающими белками по изобретению, то есть антигенного пептида MAGE-A, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в комплексе с белком MHC, предпочтительно в комплексе с HLA-A*02, с высокой аффинностью, но также и с высокой специфичностью.

Авторы изобретения продемонстрировали в примерах, что CDR могут
25 использоваться в TCR для АСТ, одноцепочечных конструкциях TCR, а также в других биспецифических форматах и, таким образом, продемонстрировали в качестве доказательства принципа, что идентифицированные варианты CDR могут использоваться для получения различных антигенсвязывающих белков, обладающих высокой аффинностью, а также высокой специфичностью к антигенному пептиду MAGE-
30 А, включающему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в комплексе с белком MHC, предпочтительно в комплексе с HLA-A*02.

Более того, авторы изобретения обнаружили, что мутация каркаса переменного домена альфа (Vальфа) и переменного домена бета (Vбета) TCR улучшает специфичность связывания, а также выход и стабильность растворимых
35 биспецифических конструкций scTCR, как описано в настоящем документе в примере 4.

В примерах 5-8 авторы настоящего изобретения разработали, экспрессировали и успешно протестировали эффективность *in vitro* и *in vivo* против линий опухолевых

клеток, например, антигенсвязывающие белки в формате TCER™, специфически связывающиеся с человеческим комплексом TCR-CD3 и с комплексом пептид: MHC, включающим пептид MAGE-A с SEQ ID NO: 1, связанный с молекулами MHC класса I, например HLA-A*02:01. Для нацеливания на комплекс TCR-CD3 домены V_H и V_L, производные от CD3-специфического гуманизированного антитела hUCHT1, описанного Zhu et al. (J Immunol, 1995, 155, 1903-1910), или от альфа/бета TCR-специфического антитела BMA031, описанного Shearman et al. (J Immunol, 1991, 147, 4366-73), модифицируются и используются в этих примерах. Для нацеливания на комплекс MAGE-A:MHC можно использовать домены Vальфа и Vбета, включающие раскрытые в настоящем документе CDR, что позволяет получить стабильные и аффинно зрелые антигенсвязывающие белки. Те же самые домены V_L и V_H, Vальфа и Vбета были также использованы в формате человеческого одноцепочечного Т-клеточного рецептора, дополнительно включающего Fab-домен (включающего C_{H1}-шарнир и C_L), как описано в примере 4.

Соответственно, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который специфически связывается с антигенным пептидом MAGE-A, включающим или состоящим из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» с SEQ ID NO: 1, где указанный антигенный пептид находится в комплексе с белком MHC, причем этот антигенсвязывающий белок содержит

(а) первую полипептидную цепь, содержащую первый вариабельный домен, содержащий три определяющие комплементарность области (CDR): CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

- CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «X₁SSSTY» SEQ ID NO: 72, где X₁ представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно D или E, более предпочтительно E, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 72 по меньшей мере одной аминокислотной за меной, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой,

- CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «IX₁SX₂X₃DX₄» SEQ ID NO: 73, где X₁–X₄ представляет собой любую аминокислоту, и где предпочтительно X₁ представляет собой F или Y, более предпочтительно Y, X₂ представляет собой N или S, предпочтительно S, X₃ представляет собой Q или M, предпочтительно Q, и X₄ представляет собой M, V, S или Q, предпочтительно S или Q, более предпочтительно Q.

- CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «CAEX₁X₂SX₃SKIIF» SEQ ID NO: 77, где X₁–X₃ представляет собой

любую аминокислоту, и где предпочтительно X_1 представляет собой A, F или M, более предпочтительно M, предпочтительно X_2 представляет собой S, T или N, более предпочтительно T, и предпочтительно X_3 представляет собой E или A, предпочтительно E, при условии, что CDRa3 не содержит или не состоит из аминокислотной последовательности «CAEYSSASKIIF» (SEQ ID NO: 7), если CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 и CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, предпочтительно при условии, что CDRa3 не содержит или не состоит из аминокислотной последовательности «CAEYSSASKIIF» (SEQ ID NO: 7), или

- CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «CAEX₁X₂SX₃SKIIF» с SEQ ID NO: 77, где X_1 – X_3 представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно X_1 представляет собой F, M или A, предпочтительно M, предпочтительно X_2 представляет собой S, T или N, более предпочтительно T, и предпочтительно X_3 представляет собой E или A, предпочтительно E, и

(б) вторую полипептидную цепь, включающую второй вариабельный домен, включающий три определяющие комплементарность области (CDR) CDRb1, CDRb2 и CDRb3, и где

- CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «X₁GHDY» с SEQ ID NO: 78, где X_1 представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно S или P, более предпочтительно P, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 78 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, такими как одна аминокислотная замена,

- CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «FX₁X₂X₃X₄P» с SEQ ID NO: 79, где X_1 – X_4 представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно X_1 представляет собой C или N, более предпочтительно C, предпочтительно X_2 представляет собой Y или N, более предпочтительно Y, предпочтительно X_3 представляет собой G или N, более предпочтительно G, предпочтительно X_4 представляет собой H, V, T, A или M, предпочтительно H или T, наиболее предпочтительно T, где предпочтительно, когда X_1 представляет собой C, аминокислотная последовательность FR3-b включает в аминокислотном положении 66 аминокислоту 66C, и

- CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «CASRAX₁TGELFF» с SEQ ID NO: 82, где X_1 представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно D или N, более предпочтительно D, или

аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 82 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой.

В одном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который специфически связывается с антигенным пептидом MAGE-A, включающим или состоящим из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» с SEQ ID NO: 1, где указанный антигенный пептид находится в комплексе с белком MHC, причем этот антигенсвязывающий белок содержит

(а) первую полипептидную цепь, включающую первый переменный домен, включающий три определяющие комплементарность области (CDR): CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

- CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 5 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой,

- CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 6 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой, и

- CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «CAEX₁X₂SX₃SKIIF» SEQ ID NO: 77, где X₁–X₃ представляет собой любую аминокислоту, и где предпочтительно X₁ представляет собой A, F или M, более предпочтительно M, предпочтительно X₂ представляет собой S, T или N, более предпочтительно T, и предпочтительно X₃ представляет собой E или A, предпочтительно E, при условии, что CDRa3 не содержит или не состоит из аминокислотной последовательности «CAEYSSASKIIF» (SEQ ID NO: 7), если CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 и CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6,

предпочтительно при условии, что CDRa3 не содержит или не состоит из аминокислотной последовательности «CAEYSSASKIIF» (SEQ ID NO: 7), или

CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «CAEX₁X₂SX₃SKIIF» с SEQ ID NO: 77, где X₁-X₃ представляет собой любую аминокислоту, и предпочтительно X₁ представляет собой F, M или A, предпочтительно M, предпочтительно X₂ представляет собой S, T или N, более предпочтительно T, и предпочтительно X₃ представляет собой E или A, предпочтительно E, и где

(б) вторую полипептидную цепь, включающую второй вариабельный домен, включающий три определяющие комплементарность области (CDR) CDRb1, CDRb2 и CDRb3, и где

- CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 12, по меньшей мере, одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой,

- CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 13 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой, и

- CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 14 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой.

В одном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, такому как растворимый антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с антигенным пептидом MAGE-A, включающим или состоящим из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» с SEQ ID NO: 1, где указанный антигенный пептид находится в комплексе с белком MHC, причем антигенсвязывающий белок содержит

а) первую полипептидную цепь, содержащую первый вариабельный домен, содержащий три определяющие комплементарность области (CDR): CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

5 - CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «X₁SSSTY» с SEQ ID NO: 72, где X₁ представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно D или E, более предпочтительно E, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 72 по меньшей мере одной аминокислотной за меной, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, предпочтительно одной или двумя аминокислотными

10 заменами, например, одной аминокислотной заменой,

 - CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «LYSSQDX₁» с SEQ ID NO: 74, где X₁ представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно Q, V или S, более предпочтительно Q,

 - CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной

15 последовательности CAEMTSESKIIF» с SEQ ID NO:35, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 35 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой, и

20 (б) вторую полипептидную цепь, включающую второй вариабельный домен, включающий три определяющие комплементарность области (CDR) CDRb1, CDRb2 и CDRb3, и где

 - CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «X₁GHDY» с SEQ ID NO: 78, где X₁ представляет собой любую

25 аминокислоту, предпочтительно S или P, более предпочтительно P, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 78 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой,

30 - CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «F_cYGX₁P» с SEQ ID NO: 81, где X₁ представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно H, V, A или T, предпочтительно T, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 81 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной или двумя аминокислотными

35 заменами, более предпочтительно одной аминокислотной заменой, и где предпочтительно, когда CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной

последовательности «F_cYGX₁P» SEQ ID NO: 81, аминокислотная последовательность FR3-b включает в аминокислотном положении 66 аминокислоту 66C,

- CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «CASRAX₁TGELFF» с SEQ ID NO: 82, где X₁ представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно D или N, более предпочтительно D, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 82 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными заменами, предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой,

Как указано в настоящем документе выше, в некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность CDRb2 включает в положении 57 аминокислоту 57C, эта аминокислота предпочтительно образует дисульфидный мостик с цистеином, предпочтительно присутствующим в положении 66 аминокислотной последовательности FR3b. Соответственно, в предпочтительных вариантах осуществления, когда аминокислотная последовательность CDRb2 включает в положении 57 аминокислоту 57C, тогда аминокислотная последовательность FR3-b предпочтительно включает в положении 66 аминокислоту 66C и наоборот. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность FR3b, таким образом, предпочтительно включает аминокислотную замену в этом положении 66, соответственно, в некоторых сходных вариантах осуществления аминокислотная последовательность FR3b включает аминокислотную замену I66C.

В некоторых вариантах осуществления CDRa1 в контексте настоящего изобретения содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 55.

В одном варианте осуществления CDRa2 в контексте настоящего изобретения содержит или состоит из аминокислотной последовательности:

«IYSSQDX₁» с SEQ ID NO: 74, где X представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно Q, V или S, более предпочтительно Q, или SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 74 или SEQ ID NO: 6 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, например, одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной аминокислотной заменой, предпочтительно CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности «IYSSQDX₁» с SEQ ID NO: 74, где X₁ представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно Q, V или S, более предпочтительно Q, или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 74 по меньшей мере одной

аминокислотной заменой, например, одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной аминокислотной заменой.

В некоторых вариантах осуществления CDRa2 в контексте настоящего изобретения содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 56, 57 и 59, предпочтительно SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 56.

В некоторых вариантах осуществления CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, предпочтительно SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах осуществления CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности:

- «FNNNP» с SEQ ID NO: 13, или

- «F_cYGX₁P» с SEQ ID NO: 81, где X₁ представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно H, V, A или T, более предпочтительно T, и где предпочтительно, когда CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности F_cYGX₁P» с SEQ ID NO: 81, аминокислотная последовательность FR3-b включает в аминокислотном положении 66 аминокислоту 66C, или

аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 13 или 81 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, например, одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной аминокислотной заменой.

В некоторых вариантах осуществления CDRb2 в контексте настоящего изобретения содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66 и 70, предпочтительно SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 65, и при этом предпочтительно, когда CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66 или 70, аминокислотная последовательность FR3-b предпочтительно включает в аминокислотном положении 66 аминокислоту 66C.

В одном варианте осуществления CDRb3 в контексте настоящего изобретения содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 71.

В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению содержит

а) первую полипептидную цепь, содержащую первый вариабельный домен, содержащий три определяющие комплементарность области (CDR): CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

- 5 - CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5,
- CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и
- CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, предпочтительно SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, более предпочтительно SEQ ID NO: 35 и 38, например SEQ ID NO: 35, и где

(б) вторую полипептидную цепь, включающую второй вариабельный домен, включающий три определяющие комплементарность области (CDR) CDRb1, CDRb2 и CDRb3, и

- 15 - CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
- CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и
- CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок содержит

а) первую полипептидную цепь, включающую первый вариабельный домен, включающий три определяющие комплементарность области (CDR): CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

- 25 - CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 55, предпочтительно SEQ ID NO: 55,
- CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 56, 57 и 59, предпочтительно SEQ ID NO: 56 и 59, более предпочтительно SEQ ID NO: 56,
- 30 - CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35,

35 (б) вторую полипептидную цепь, включающую второй вариабельный домен, включающий три определяющие комплементарность области (CDR) CDRb1, CDRb2 и CDRb3, и где

- CDRb1 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62,
- CDRb2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66 и 70, предпочтительно SEQ ID NO: 65, и где предпочтительно, когда CDRb2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66 или 70, аминокислотная последовательность FR3-b предпочтительно включает в аминокислотном положении 66 аминокислоту 66C, и
- CDRb3 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 71, предпочтительно SEQ ID NO: 71.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, включающим варианты аминокислотных последовательностей CDR, раскрытых в контексте настоящего изобретения, обычно варианты CDRa1, CDRa2, CDRa3, CDRb1, CDRb2 и/или CDRb3, такие варианты могут включать по меньшей мере одну, например, четыре, три, две или одну, предпочтительно одну, две или три аминокислотные замены, при этом предпочтительное число аминокислотных замен предпочтительно зависит от длины соответствующей CDR.

В некоторых вариантах осуществления CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, отличающейся от раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей CDRa2 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, или только одной аминокислотной заменой, где указанная аминокислотная замена предпочтительно находится в положении 56 или 65, более предпочтительно в положении 65.

В некоторых вариантах осуществления CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, отличающейся от раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей CDRa2 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, или только одной аминокислотной заменой, где указанная аминокислотная замена предпочтительно находится в положении 56 или 65, более предпочтительно в положении 65.

В некоторых вариантах осуществления CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, отличающейся от раскрытых в настоящем

документе аминокислотных последовательностей CDRa3 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, или только одной аминокислотной заменой, где указанная аминокислотная замена предпочтительно находится в любом из аминокислотных положений 105, 106, 107, 108, 109, 113, 114, 115, 116 и 117.

В некоторых вариантах осуществления CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, отличающейся от раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей CDRb1 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, например, одной аминокислотной заменой, где указанная аминокислотная замена предпочтительно находится в любом из аминокислотных положений 27, 28, 29, 37 и 38, более предпочтительно 27 и 38.

В некоторых вариантах осуществления CDRb2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, отличающейся от раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей CDRb2 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, или только одной аминокислотной заменой, где указанная аминокислотная замена предпочтительно находится в положении 56.

В некоторых вариантах осуществления CDRb3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, отличающейся от раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей CDRb3 по меньшей мере одной аминокислотной заменой, предпочтительно одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными заменами, более предпочтительно одной или двумя аминокислотными заменами, или только одной аминокислотной заменой, где указанная аминокислотная замена предпочтительно находится в любом из аминокислотных положений 105, 106, 107, 108, 109, 113, 114, 115, 116, 117.

Аминокислотные замены, упомянутые в настоящем документе выше, соответствуют определению, приведенному в разделе «Определения», предпочтительно аминокислотные замены являются консервативными аминокислотными заменами. Как будет понятно специалистам в данной области, первый вариабельный домен, включающий аминокислотные последовательности CDR, как определено в настоящем документе, и второй вариабельный домен, включающий аминокислотные последовательности CDR, как определено в настоящем документе, образуют вместе антигенсвязывающий участок, при этом указанный антигенсвязывающий участок

связывается с антигенным пептидом MAGE-A, включающим или состоящим из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» с SEQ ID NO: 1, в комплексе с белком МНС. Три определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3 являются производными от переменного домена альфа-цепи TCR.

Соответственно, как будет понятно специалистам в данной области, в некоторых вариантах осуществления первый переменный домен также может называться переменным доменом альфа. По аналогии, три определяющие комплементарность области (CDR) CDRb1, CDRb2 и CDRb3 являются производными от переменного домена бета-цепи указанного TCR, и поэтому, как будет понятно специалистам в данной области, второй переменный домен может также называться переменным доменом бета. В частности, первый переменный домен, включающий аминокислотные последовательности каркасной области переменного домена альфа и CDR переменной области альфа, как определено в контексте изобретения, такие как последовательность (FR1-a)-(CDRa1)-(FR2-a)-(CDRa2)-(FR3-a)-(CDRa3)-(FR4-a), может называться переменным доменом альфа и/или второй переменный домен, включающий аминокислотные последовательности каркасной области переменного домена бета и CDR переменной области бета, как определено в контексте настоящего изобретения, такие как последовательность (FR1-b)-(CDRb1)-(FR2-b)-(CDRb2)-(FR3-b)-(CDRb3)-(FR4-b), может называться переменным доменом бета.

В некоторых вариантах осуществления CDR могут быть привиты в последовательность каркасной области антитела. Соответственно, в одном примере CDR, как они определены в контексте первого переменного домена, могут быть привиты к переменному домену легкой цепи, первый переменный домен, таким образом, включает или состоит из последовательностей (FR1-L)-(CDRa1)-(FR2-L)-(CDRa2)-(FR3-L)-(CDRa3)-(FR4-L) и может называться переменным доменом легкой цепи. В том же примере CDR, как они определены в контексте второго переменного домена, могут быть привиты к переменному домену тяжелой цепи, второй переменный домен, таким образом, включает или состоит из последовательностей (FR1-H)-(CDRb1)-(FR2-H)-(CDRb2)-(FR3-H)-(CDRb3)-(FR4-H) и может быть назван переменным доменом тяжелой цепи. Однако специалистам в данной области техники будет понятно, что CDR, как они определены в контексте первого переменного домена, могут быть привиты к переменному домену тяжелой цепи, и что CDR, как они определены в контексте второго переменного домена, могут быть привиты к переменному домену легкой цепи, и вышеизложенные соображения применяются по правилу *mutatis mutandis* (с заменой того, что подлежит замене).

В контексте настоящего изобретения CDR антигенсвязывающих белков по изобретению отличаются от CDR нативного и родительского TCR R7P1D5, как раскрыто в WO 2017/158103, по меньшей мере в аминокислотной последовательности CDRa3 указанного родительского TCR R7P1D5. Как будет понятно специалистам в данной области техники, CDRa3, как определено в настоящем документе выше, не включает или не состоит из аминокислотной последовательности «CAEYSSASKIIF» (SEQ ID NO: 7), которая представляет собой CDRa3 родительского TCR R7P1D5.

В одном варианте осуществления первый переменный домен и второй переменный домен, как определено в настоящем документе в контексте антигенсвязывающих белков по изобретению, могут включать аминокислотную замену в положении 44 в соответствии с нумерацией IMGT. В предпочтительном варианте осуществления указанная аминокислота в положении 44 заменена другой подходящей аминокислотой для улучшения спаривания. В конкретных вариантах осуществления, предпочтительно в тех, в которых указанный антигенсвязывающий белок представляет собой TCR, указанная аминокислотная замена улучшает, например, спаривание цепей (то есть спаривание α - и β -цепей или спаривание γ и δ в предпочтительном варианте осуществления, одна или обе аминокислоты, присутствующие в положении 44 в первом переменном домене (v_144) и аминокислота, присутствующая в положении 44 во втором переменном домене (v_244), заменяются на пары аминокислот v_144/v_244 , выбранных из группы пар аминокислот, состоящей из v_144D/v_244R , v_144R/v_244D , v_144E/v_244K , v_144K/v_244E , v_144D/v_244K , v_144K/v_244D , v_144R/v_244E , v_144E/v_244R , v_144L/v_244W , v_144W/v_244L , v_144V/v_244W , v_144W/v_244V .

Соответственно, в еще одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок может дополнительно включать одну из предпочтительных пар замещений (v_144/v_244), выбранных из группы, состоящей из v_1Q44D/v_2Q44R , v_1Q44R/v_2Q44D , v_1Q44E/v_2Q44K , v_1Q44K/v_2Q44E , v_1Q44D/v_2Q44K , v_1Q44K/v_2Q44D , v_1Q44E/v_2Q44R , v_1Q44R/v_2Q44E , v_1Q44L/v_2Q44W , v_1Q44W/v_2Q44L , v_1Q44V/v_2Q44W , и v_1Q44W/v_2Q44V ; v_1W44D/v_2Q44R , v_1W44R/v_2Q44D , v_1W44E/v_2Q44K , v_1W44K/v_2Q44E , v_1W44D/v_2Q44K , v_1W44K/v_2Q44D , v_1W44E/v_2Q44R , v_1W44R/v_2Q44E , v_1W44L/v_2Q44W , v_1W44L/v_2Q44L , v_1W44V/v_2Q44W , и v_1W44L/v_2Q44V ; v_1H44D/v_2Q44R , v_1H44R/v_2Q44D , v_1H44E/v_2Q44K , v_1H44K/v_2Q44E , v_1H44D/v_2Q44K , v_1H44K/v_2Q44D , v_1H44E/v_2Q44R , v_1H44R/v_2Q44E , v_1H44L/v_2Q44W , v_1H44W/v_2Q44L , v_1H44V/v_2Q44W , и v_1H44W/v_2Q44V ; v_1K44D/v_2Q44R , v_1K44R/v_2Q44D , v_1K44E/v_2Q44K , v_1K44K/v_2Q44E , v_1K44D/v_2Q44K , v_1K44K/v_2Q44D , v_1K44E/v_2Q44R , v_1K44R/v_2Q44E , v_1K44L/v_2Q44W , v_1K44W/v_2Q44L , v_1K44V/v_2Q44W , и v_1K44W/v_2Q44V ; v_1E44D/v_2Q44R , v_1E44R/v_2Q44D , v_1E44E/v_2Q44K , v_1E44K/v_2Q44E , v_1E44D/v_2Q44K , v_1E44K/v_2Q44D , v_1E44E/v_2Q44R , v_1E44R/v_2Q44E , v_1E44L/v_2Q44W , v_1E44W/v_2Q44L , v_1E44V/v_2Q44W , и v_1E44W/v_2Q44V ; v_1Q44D/v_2R44 , v_1Q44R/v_2R44D ;

v_1Q44E/v_2R44K ; v_1Q44K/v_2R44E ; v_1Q44D/v_2R44K ; v_1Q44K/v_2R44D ; v_1Q44E/v_2R44 ;
 v_1Q44R/v_2R44E ; v_1Q44L/v_2R44W ; v_1Q44W/v_2R44L ; v_1Q44V/v_2R44W ; и v_1Q44W/v_2R44V ;
 v_1W44D/v_2R44 ; v_1W44R/v_2R44D ; v_1W44E/v_2R44K ; v_1W44K/v_2R44E ; v_1W44D/v_2R44K ;
 v_1W44K/v_2R44D ; v_1W44E/v_2R44 ; v_1W44R/v_2R44E ; v_1W44L/v_2R44W ; v_1W44/v_2R44L ;
5 v_1W44V/v_2R44W ; и v_1W44/v_2R44V ; v_1H44D/v_2R44 ; v_1H44R/v_2R44D ; v_1H44E/v_2R44K ;
 v_1H44K/v_2R44E ; v_1H44D/v_2R44K ; v_1H44K/v_2R44D ; v_1H44E/v_2R44 ; v_1H44R/v_2R44E ;
 v_1H44L/v_2R44W ; v_1H44W/v_2R44L ; v_1H44V/v_2R44W ; и v_1H44W/v_2R44V ; v_1K44D/v_2R44 ;
 v_1K44R/v_2R44D ; v_1K44E/v_2R44K ; v_1K44/v_2R44E ; v_1K44D/v_2R44K ; v_1K44/v_2R44D ;
 v_1K44E/v_2R44 ; v_1K44R/v_2R44E ; v_1K44L/v_2R44W ; v_1K44W/v_2R44L ; v_1K44V/v_2R44W ; и
10 v_1K44W/v_2R44V ; v_1E44D/v_2R44 ; v_1E44R/v_2R44D ; v_1E44/v_2R44K ; v_1E44K/v_2R44E ;
 v_1E44D/v_2R44K ; v_1E44K/v_2R44D ; v_1E44R/v_2R44E ; v_1E44L/v_2R44W ; v_1E44W/v_2R44L ;
 v_1E44V/v_2R44W ; и v_1E44W/v_2R44V ; v_1Q44D/v_2K44R ; v_1Q44R/v_2K44D ; v_1Q44E/v_2K44K ;
 v_1Q44K/v_2K44E ; v_1Q44D/v_2K44K ; v_1Q44K/v_2K44D ; v_1Q44E/v_2K44R ; v_1Q44R/v_2K44E ;
 v_1Q44L/v_2K44W ; v_1Q44W/v_2K44L ; v_1Q44V/v_2K44W ; and v_1Q44W/v_2K44V ; v_1W44D/v_2K44R ;
15 v_1W44R/v_2K44D ; v_1W44E/v_2K44K ; v_1W44K/v_2K44E ; v_1W44D/v_2K44K ; v_1W44K/v_2K44D ;
 v_1W44E/v_2K44R ; v_1W44R/v_2K44E ; v_1W44L/v_2K44W ; v_1W44/v_2K44L ; v_1W44V/v_2K44W ; и
 v_1W44/v_2K44V ; v_1H44D/v_2K44R ; v_1H44R/v_2K44D ; v_1H44E/v_2K44K ; v_1H44K/v_2K44E ;
 v_1H44D/v_2K44K ; v_1H44K/v_2K44D ; v_1H44E/v_2K44R ; v_1H44R/v_2K44E ; v_1H44L/v_2K44W ;
 v_1H44W/v_2K44L ; v_1H44V/v_2K44W ; и v_1H44W/v_2K44V ; v_1K44D/v_2K44R ; v_1K44R/v_2K44D ;
20 v_1K44E/v_2K44K ; v_1K44/v_2K44E ; v_1K44D/v_2K44K ; v_1K44/v_2K44D ; v_1K44E/v_2K44R ;
 v_1K44R/v_2K44E ; v_1K44L/v_2K44W ; v_1K44W/v_2K44L ; v_1K44V/v_2K44W ; и v_1K44W/v_2K44V ;
 v_1E44D/v_2K44R ; v_1E44R/v_2K44D ; v_1E44/v_2K44K ; v_1E44K/v_2K44E ; v_1E44D/v_2K44K ;
 v_1E44K/v_2K44D ; v_1E44/v_2K44R ; v_1E44R/v_2K44E ; v_1E44L/v_2K44W ; v_1E44W/v_2K44L ;
 v_1E44V/v_2K44W ; и v_1E44W/v_2K44V .

25 В вышеизложенном, например, « v_1Q44R/v_2Q44D » означает, что, например, в первом переменном домене Q44 заменен на R, а во втором переменном домене Q44 заменен на D. Дополнительные замены и описание можно найти в патентной заявке США № 2018-0162922.

30 Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что CDR, которые первоначально были получены из альфа- и бета-переменных доменов TCR, могут быть использованы в антигенсвязывающих белках, которые имеют форматы, отличные от нативных TCR. Например, в экспериментальной части авторы настоящего изобретения использовали CDR переменных доменов альфа- и бета-цепи TCR в формате TCER™, как подробно описано в настоящем документе ниже и как показано в
35 примерах (т. е., в примере 6).

Кроме того, авторы изобретения использовали CDR, как они определены в контексте настоящего изобретения, в одноцепочечных конструкциях TCR, таких как

биспецифический TCR, включающий scTCR, или стабилизированный Fab scTCR, включающий первый полипептид с $V_H(\text{CD3})$ - C_{H1} -Вальфа- L_z -Vбета и второй полипептид с $V_L(\text{CD3})$ - C_L , где $V_H(\text{CD3})$, $V_L(\text{CD3})$, Вальфа и Vбета являются такими, как определено выше, и L_z представляет собой линкер, состоящий из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGGGGSGGSGGSGGSGGGS с SEQ ID NO: 108 и C_{H1} представляет собой константный домен тяжелой цепи, и C_L представляет собой константный домен легкой цепи (пример 4).

Соответственно, специалисты в данной области понимают эти эксперименты как доказательство того принципа, что CDR, определенные в контексте настоящего изобретения, могут быть использованы в различных антигенсвязывающих белках по изобретению и, таким образом, в различных форматах, как раскрыто в настоящем документе. Специалистам в данной области будет понятно, что характеристики связывания антигенсвязывающих белков по изобретению, продемонстрированные в контексте одного формата связывания антигена, предпочтительно по меньшей мере сохраняются при изменении формата антигенсвязывающего белка (то есть по меньшей мере аминокислотных последовательностей CDR первого и второго переменного домена, предпочтительно аминокислоты первого и второго переменных доменов идентичны).

Как уже упоминалось выше, связывающая способность CDR в контексте данного изобретения может быть обеспечена в каркасе антитела. Например, аминокислотные последовательности CDR, определенные в контексте данного изобретения, возможно, включающие дополнительные 3, 2 или 1 N и/или C терминальные каркасные остатки, могут быть непосредственно введены в аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой/легкой цепи антитела. Более конкретно, домены CDRa1, CDRa2 и CDRa3, определенные в контексте настоящего изобретения, могут быть привиты к переменной аминокислотной последовательности тяжелой цепи, CDRb1, CDRb2 и CDRb3, определенные в контексте настоящего изобретения, могут быть введены в аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи, или наоборот.

Как будет также понятно, в некоторых вариантах осуществления, в антителе переменный домен легкой цепи антитела может быть заменен первым переменным доменом, как определено в контексте изобретения, а переменный домен тяжелой цепи может быть заменен вторым переменным доменом, как определено в контексте настоящего изобретения, или наоборот.

Однако в предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок дополнительно включает каркасные области альфа-цепи и каркасные области бета-

цепи.

В одном варианте осуществления указанный первый вариабельный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, предпочтительно FR1-а, FR2-а, FR3-а и FR4-а, выбранных из группы, состоящей из FR1-а, FR2-а, FR3-а и FR4-а, где

- FR1-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT» с SEQ ID NO: 83 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 83,
- FR2-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «LYWYKQEPGAGAGLQLLTY» с SEQ ID NO: 84 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 84,
- FR3-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF» с SEQ ID NO: 85 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 85',
- FR4-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «GSGTRLSIRP» с SEQ ID NO: 86 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 86, и

указанный второй вариабельный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, предпочтительно FR1-б, FR2-б, FR3-б и FR4-б, выбранных из группы, состоящей из FR1-б, FR2-б, FR3-б и FR4-б, и где

- FR1-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI» с SEQ ID NO: 87 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 87,
- FR2-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «LFWYRQTMMRGLELLIY» с SEQ ID NO: 88 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 88
- FR3-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «IDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF» с SEQ ID NO: 89 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 89, или
- FR4-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «GEGSRLTVL» с SEQ с ID NO: 90 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 90.

В одном варианте осуществления указанный первый переменный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, предпочтительно FR1-а, FR2-а, FR3-а и FR4-а, выбранных из группы, состоящей из FR1-а, FR2-а, FR3-а и FR4-а, где

- 5 - FR1-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT» SEQ ID NO: 83 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере, на 90 % идентичной SEQ ID NO: 83;
- FR2-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «LYWYKQEPGAGAGLQLLTY» с SEQ ID NO: 84 или аминокислотной
- 10 последовательности, по меньшей мере на 90 % идентичной SEQ ID NO: 84,
- FR3-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF» с SEQ ID NO: 85 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90 % идентичной SEQ ID NO: 85;
- 15 - FR4-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «GSGTRLSIRP» с SEQ ID NO: 86 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90 % идентичной SEQ ID NO: 86;

и

указанный второй переменный домен дополнительно включает одну или более

20 каркасных областей, предпочтительно FR1-б, FR2-б, FR3-б и FR4-б, выбранных из группы, состоящей из FR1-б, FR2-б, FR3-б и FR4-б, и где

- FR1-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI» с SEQ ID NO: 87 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90 % идентичной SEQ ID NO: 87;
- 25 - FR2-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «LFWYRQTM MRGLELLIY» с SEQ ID NO: 88 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90 % идентичной SEQ ID NO: 88;
- FR3-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF» с SEQ ID NO: 89 или
- 30 аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90 % идентичной SEQ ID NO: 89; или
- FR4-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «GEGSRLTVL» с SEQ с ID NO: 90 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90 % идентичной SEQ ID NO: 90.

35

В одном варианте осуществления указанный первый переменный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, предпочтительно FR1-а,

FR2-а, FR3-а и FR4-а, выбранных из группы, состоящей из FR1-а, FR2-а, FR3-а и FR4-а, где

- FR1-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT» с SEQ ID NO: 83 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 83;
- FR2-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «LYWYKQEPGAGAGLQLLTY» с SEQ ID NO: 84 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 84,
- FR3-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF» с SEQ ID NO: 85 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 85;
- FR4-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «GSGTRLSIRP» с SEQ ID NO: 86 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 86;

и

указанный второй переменный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, предпочтительно FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b, выбранных из группы, состоящей из FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b, и где

- FR1-b включает или состоит из аминокислотной последовательности «DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI» с SEQ ID NO: 87 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 87;
- FR2-b включает или состоит из аминокислотной последовательности «LFWYRQTMMRGLELLIY» с SEQ ID NO: 88 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 88;
- FR3-b включает или состоит из аминокислотной последовательности «IDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF» с SEQ ID NO: 89 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 89; или
- FR4-b включает или состоит из аминокислотной последовательности «GEGSRLTVL» с SEQ ID NO: 90 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 90.

Таким образом, антигенсвязывающие белки по изобретению предпочтительно дополнительно включают константный домен, например, константный домен альфа и/или константный домен бета, или константный домен гамма и/или дельта, как описано выше в настоящем документе. Предпочтительно константные домены альфа и бета и/или константные домены гамма и дельта включают дополнительные мутации, которые

не представлены в нативных TCR, для улучшения спаривания двух трансгенных цепей, то есть альфа- и бета-цепи. Например, положение 48 в TRAC и положение 57 в TRBC1 или TRBC2 могут быть заменены остатками цистеина. Другие примеры таких модификаций описаны выше. Примерами константных доменов альфа и константных доменов бета в составе антигенсвязывающих белков по изобретению, являются SEQ ID NO: 8 (константный домен альфа-цепи TCR R7P1D5) и SEQ ID NO: 15 (константный домен бета-цепи TCR R7P1D5).

В одном варианте осуществления антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению включают молекулу TCR, как определено в настоящем документе выше, например, молекулу, включающую по меньшей мере один переменный домен альфа и один переменный домен бета (альфа/бета TCR) или молекулу, включающую по меньшей мере один переменный домен гамма или переменный домен дельта. Другими словами, такие TCR являются гетеродимерными молекулами, а именно альфа/бета и гамма/дельта гетеродимерами.

Для использования в адоптивной клеточной терапии (АКТ) альфа/бета- или гамма/дельта-гетеродимерные TCR могут быть трансфицированы в виде полноразмерных цепей, имеющих как цитоплазматические, так и трансмембранные домены, в Т-клетки пациента. Константные домены могут включать подходящие мутации, то есть дисульфидные связи, для улучшения спаривания желаемых трансгенных альфа/бета- или гамма/дельта-цепей и уменьшения спаривания эндогенных альфа/бета- или гамма/дельта-цепей с соответствующими трансгенными цепями. Таким образом, антигенсвязывающие белки по изобретению предпочтительно дополнительно включают константный домен, например, константный домен альфа и/или константный домен бета, как описано выше в настоящем документе. Предпочтительно константные домены альфа и бета включают дополнительные мутации, которые не представлены в нативных TCR, для улучшения спаривания двух цепей, то есть альфа- и бета-цепей или гамма- и дельта-цепей, соответственно. Например, положение 48 в TRAC и положение 57 в TRBC1 или TRBC2 заменены остатками цистеина. Примерами константных доменов альфа и константных доменов бета в составе антигенсвязывающих белков по изобретению, являются SEQ ID NO: 8 (константный домен альфа-цепи TCR R7P1D5) и SEQ ID NO: 15 (константный домен бета-цепи TCR R7P1D5).

В предпочтительном варианте осуществления TCR включает альфа-цепь, включающую переменный домен альфа, включающий CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи, и дополнительно включает константный домен альфа; и бета-цепь, включающую переменный домен бета, включающий CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи, CDR3 бета-цепи, и дополнительно включает константный домен

бета. В еще одном предпочтительном варианте осуществления вариабельный домен альфа включает три определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где CDRa1 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, CDRa2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, а CDRa3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, предпочтительно из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, более предпочтительно из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 35 и 38, такой как SEQ ID NO: 35; и вариабельный домен бета включает три определяющие комплементарность области (CDR) CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRb1 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, CDRb2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и CDRb3 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

В предпочтительном варианте осуществления TCR включает альфа-цепь, включающую вариабельный домен альфа, включающий CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи, и дополнительно включает константный домен альфа; и бета-цепь, включающую вариабельный домен бета, включающий CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи, CDR3 бета-цепи, и дополнительно включает константный домен бета. В еще одном предпочтительном варианте осуществления вариабельный домен альфа включает три определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где CDRa1 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, CDRa2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, а CDRa3 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35, и вариабельный домен бета включает три определяющие комплементарность области (CDR) CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRb1 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, CDRb2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, а CDRb3 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

В другом предпочтительном варианте осуществления TCR включает альфа-цепь, включающую вариабельный домен альфа, включающий CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи, и дополнительно включает константный домен альфа; и бета-цепь, включающую вариабельный домен бета, включающий CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи, CDR3 бета-цепи, и дополнительно включает константный домен бета. В еще одном предпочтительном варианте осуществления вариабельный домен альфа включает три определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где CDRa1 включает или состоит из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 5, CDRa2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, а CDRa3 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38, и переменный домен бета включает три определяющие комплементарность области (CDR) CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRb1 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, CDRb2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, а CDRb3 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

В другом предпочтительном варианте осуществления переменные домены TCR альфа и бета дополнительно включают каркасные области альфа и каркасные области бета, соответственно.

В одном варианте осуществления указанный первый переменный домен альфа дополнительно включает одну или более каркасных областей, предпочтительно FR1-а, FR2-а, FR3-а и FR4-а, выбранных из группы, состоящей из FR1-а, FR2-а, FR3-а и FR4-а, где FR1-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT» с SEQ ID NO: 83, FR2-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «LYWYKQEPGAGAGLQLLTY» с SEQ ID NO: 84, FR3-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «KQDQRLTVLLNKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF» с SEQ ID NO: 85, и FR4-а включает или состоит из аминокислотной последовательности «GSGTRLSIRP» SEQ ID NO: 86, и

указанный второй переменный домен бета дополнительно включает одну или более каркасных областей, предпочтительно FR1-б, FR2-б, FR3-б и FR4-б, выбранных из группы, состоящей из FR1-б, FR2-б, FR3-б и FR4-б, и где FR1-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI» с SEQ ID NO: 87, FR2-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «LFWYRQTMMRGLELLIY» с SEQ ID NO: 88, FR3-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «IDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF» с SEQ ID NO: 89, или FR4-б включает или состоит из аминокислотной последовательности «GEGSRLTVL» с SEQ ID NO: 90.

В другом предпочтительном варианте осуществления TCR, включающие любой из вышеописанных переменных доменов, дополнительно включают константный домен альфа, включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 или последовательности, по меньшей мере на 85 %, 90 % или 95 % идентичной SEQ ID NO: 8; и бета-константный домен, включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или последовательности, по меньшей мере на 85 %, 90 % или 95 % идентичной SEQ ID NO: 15.

Варианты антигенсвязывающих белков, как описано в настоящем документе, предусмотрены и явно указаны с использованием формулировки «по меньшей мере на 85 % идентичны референтной последовательности», как определено в настоящем документе выше в разделе «Определения». Например, последовательность FR1-a, FR2-a, FR3-a и FR4-a и FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b может отличаться от референтных последовательностей SEQ ID NO:83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO: 86 SEQ ID NO:87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, в зависимости от ситуации, по меньшей мере одной аминокислотной заменой (заменами), в частности, по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой (заменами) и/или заменой (заменами) на канонические остатки. В частности, последовательности FR1-a, FR2-a, FR3-a и FR4-a и FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b первого и второго вариабельного домена могут отличаться от референтных последовательностей SEQ ID NO:83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90 только консервативной аминокислотной заменой (заменами).

Модификации и изменения могут быть внесены в аминокислотную последовательность антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению, а также в соответствующие последовательности ДНК, соответственно, и все равно приведут к получению функционального антигенсвязывающего белка или полипептида с желательными характеристиками. Модификации могут быть внесены в первый или второй вариабельный домен, в частности, в каркасные области или в каждый из CDR или во все CDR, входящие в первый и/или второй вариабельный домен.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что при использовании каркасной области родительского TCR R7P1D5 специфические аминокислотные замены в каркасной области антигенсвязывающих белков дают благоприятный эффект.

В частности, аминокислотные замены S19A или S19V, предпочтительно S19V, были решающими для экспрессии растворимой одноцепочечной конструкции TCR, в частности, при добавлении к CDRa2 аминокислотной последовательности, включающей во втором аминокислотном положении Y, то есть аминокислотой 57 согласно IMGT является Y (57Y). Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что аминокислотные замены A48K и L50P в FR2-a, M46P, M47G в FR2-b по отдельности или в комбинации увеличивают выход экспрессии растворимых антигенсвязывающих белков по изобретению. Авторы также показали, что I54F в FR2-b увеличивает выход экспрессии растворимых антигенсвязывающих белков и, в частности, в дополнение к аминокислотной последовательности CDRb3, включающей D в положении 109 согласно IMGT, увеличивает стабильность растворимых антигенсвязывающих белков. Кроме того, авторы обнаружили, что замена I54F в FR2-b значительно улучшает специфичность растворимых антигенсвязывающих белков.

Соответственно, в одном варианте осуществления каркасные области антигенсвязывающих белков по изобретению включают по меньшей мере одну аминокислотную замену, предпочтительно одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или 10, более предпочтительно от 1 до 5, от 2 до 5, например 3 или 4 аминокислотные замены, выбранные из группы аминокислотных замен, включающей:

- аминокислотную замену в положении 19 в FR1-a, где указанная аминокислотная замена предпочтительно представляет собой S19A, S19V, более предпочтительно S19V,
- аминокислотную замену в положении 48 и/или 50 в FR2-a, где указанная аминокислотная замена в положении 48 предпочтительно представляет собой A48K, а указанная аминокислотная замена в положении 50 предпочтительно представляет собой L50P,
- аминокислотную замену в положении 46, 47 и/или 54 в FR2-b, где указанная аминокислотная замена в положении 46, 47 и 54 предпочтительно представляет собой M46P, M47G и I54F, соответственно, где предпочтительно указанная аминокислота в положении 54 представляет собой I54F, когда аминокислотная последовательность CDRb3, как определено выше, включает в положении 109 аминокислоту 109D,
- аминокислотную замену в положении 66 в FR3-b, где указанная аминокислотная замена в положении 66 предпочтительно представляет собой I66C и где предпочтительно указанная аминокислота в положении 66 представляет собой 66C, когда аминокислотная последовательность CDRb2, как определено выше, включает в положении 57 аминокислоту 57C,

и где положения замен приведены в соответствии с номенклатурой IMGT, и где, факультативно, указанная аминокислотная замена приводится по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующей аминокислотной последовательности каркасной области родительского TCR TCR R7P1D5.

В предпочтительном варианте осуществления каркасные области антигенсвязывающих белков по изобретению включают аминокислотные замены S19V, A48K и I54F или S19V, A48K, предпочтительно S19V, A48K и I54F, где положения замен приведены в соответствии с номенклатурой IMGT. В одном варианте осуществления указанная комбинация аминокислотных замен благоприятно дополнительно сочетается с CDRb3, включающим или состоящим из аминокислотной последовательности «CASRAX₁TGELFF» с SEQ ID NO: 82, где X₁ представляет собой D, или, согласно нумерации IMGT, где аминокислота CDRb3 включает в положении 109 аминокислоту 109D. В еще одном предпочтительном варианте осуществления каркасные области антигенсвязывающих белков по изобретению дополнительно включают

аминокислотную замену I66C, где предпочтительно FR3-b включает аминокислотную замену I66C, когда аминокислотная последовательность CDRb2, как определено выше, включает в положении 57 аминокислоту 57C.

Соответственно, в одном варианте осуществления, указанный первый 5
вариабельный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, предпочтительно все каркасные области, выбранные из группы, состоящей из FR1-a, FR2-a, FR3-a и FR4-a, где

- FR1-a включает или состоит из аминокислотной последовательности
«EDVEQSLFLSVREGDSVINCTYT» с SEQ ID NO: 91 или аминокислотной
10 последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 91, где предпочтительно указанная аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная SEQ ID NO: 91, включает аминокислоту 19V (подчеркнуто в SEQ ID NO: 91),

- FR2-a включает или состоит из аминокислотной последовательности
15 «LYWYKQEPGKGLQLLTY» с SEQ ID NO: 92 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 92, где предпочтительно указанная аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная SEQ ID NO: 92, включает аминокислоту 48K (подчеркнуто в SEQ ID NO: 92) и, факультативно, аминокислотную замену в положении 50,
20 предпочтительно L50P,

- FR3-a включает или состоит из аминокислотной последовательности
«KQDQRLTVLLNKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF» с SEQ ID NO: 85 или
аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 85,

- FR4-a включает или состоит из аминокислотной последовательности
25 «GSGTRLSIRP» с SEQ ID NO: 86 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 86, и
указанный второй вариабельный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, предпочтительно каркасных областей, выбранных из группы, состоящей из FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b, и где
30

- FR1-b включает или состоит из аминокислотной последовательности
«DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI» с SEQ ID NO: 87 или аминокислотной
последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 87,

- Fr2-b включает или состоит из аминокислотной последовательности
35 «LFWYRQTMMRGLELLFY» с SEQ ID NO: 93 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 93, где предпочтительно указанная аминокислотная последовательность, по меньшей

мере на 85 % идентичная SEQ ID NO: 93, включает аминокислоту 54F и, факультативно, аминокислотную замену в положении 46 и/или 47, где указанная аминокислотная замена в положении 46 и/или 47 предпочтительно представляет собой M46P и/или M47G, соответственно,

- 5 - FR3-b включает или состоит из аминокислотной последовательности «IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF» с SEQ ID NO: 89 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 89, или из аминокислотной последовательности «CDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF» с SEQ ID NO: 94 или
- 10 аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 94, где предпочтительно указанная аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная SEQ ID NO: 94 включает аминокислоту 66C, и где FR3-b предпочтительно включает или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 94,
- 15 включающей аминокислоту 66C, когда аминокислотная последовательность CDRb2, как определено выше, включает в положении 57 аминокислоту 57C,
- FR4-b включает или состоит из аминокислотной последовательности «GEGSRLTVL» с SEQ ID NO: 90 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 90.

20 Варианты антигенсвязывающих белков, как описано в настоящем документе, предусмотрены и явно указаны с использованием формулировки «по меньшей мере на 85 % идентичны референтной последовательности», как определено в настоящем документе выше в разделе «Определения». Например, последовательность FR1-a, FR2-a, FR3-a и FR4-a и FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b может отличаться от референтных

25 последовательностей SEQ ID NO:91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO:93 и SEQ ID NO: 89 или SEQ ID NO:94, SEQ ID NO: 90, в зависимости от ситуации, по меньшей мере одной аминокислотной заменой (заменами), в частности, по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой (заменами) и/или заменой (заменами) на канонические остатки. В частности,

30 последовательности FR1-a, FR2-a, FR3-a и FR4-a и FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b первого и второго переменного домена могут отличаться от референтных последовательностей SEQ ID NO:91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO:93 и SEQ ID NO: 89 или SEQ ID NO:94, SEQ ID NO: 90 только консервативной аминокислотной заменой (заменами).

35 Модификации и изменения могут быть внесены в аминокислотную последовательность антигенсвязывающего белка по изобретению, а также в соответствующие последовательности ДНК, кодирующие их, и все равно приведут к

получению функционального антигенсвязывающего белка или полипептида с желательными характеристиками.

Соответственно, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, включающему

- (i) первую полипептидную цепь, включающую первый вариабельный домен, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDM
KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP'

SEQ ID NO: 118,

'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDM
KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFTSESKIIFGSGTRLSIRP'

SEQ ID NO: 119,

'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDM
KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFNSESKIIFGSGTRLSIRP'

SEQ ID NO: 120,

'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDM
KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFSSASKIIFGSGTRLSIRP'

SEQ ID NO: 121,

'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDM
KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEATSESKIIFGSGTRLSIRP'

SEQ ID NO: 122, предпочтительно SEQ ID NO: 118 и SEQ ID NO: 121, более предпочтительно SEQ ID NO: 118, или аминокислотную последовательность,

выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 118-122, и где указанная аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная

аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 118-122, предпочтительно содержит аминокислотную

последовательность CDRa1 с SEQ ID NO: 5, CDRa2 с SEQ ID NO: 6 и CDRa3 с SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, в случае SEQ ID NO: 118-122, соответственно,

- (ii) вторую полипептидную цепь, включающую второй вариабельный домен, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичную SEQ ID NO: 11, где указанная аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, предпочтительно включает аминокислотную

последовательность CDRb1, CDRb2 и CDRb3 с SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, или

- (iii) первую полипептидную цепь, включающую первый вариабельный домен, включающий аминокислотную последовательность «
 5 'EDVEQSLFLSVREGDSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQ
 KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' «
 с SEQ ID NO: 151 или
 'EDVEQSLFLSVREGDSVINCTYTESSTLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQ
 KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' с
 10 SEQ ID NO: 152, предпочтительно или аминокислотную последовательность,
 по меньшей мере на 85 % идентичную аминокислотной последовательности
 SEQ ID NO: 151 или 152, и где предпочтительно аминокислотная
 последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 151, предпочтительно включает
 15 аминокислотную последовательность CDRa1 с SEQ ID NO: 5, CDRa2 с SEQ
 ID NO: 56 и CDRa3 с SEQ ID NO: 35, и где предпочтительно аминокислотная
 последовательность по меньшей мере на 85 % идентична аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 152 предпочтительно включает
 аминокислотную последовательность CDRa1 с SEQ ID NO: 55, CDRa2 с SEQ
 20 ID NO: 56 и CDRa3 с SEQ ID NO: 35 и предпочтительно дополнительно
 включает аминокислоты 19V и/или 48K, и
- iv) вторую полипептидную цепь, включающую второй вариабельный домен, включающий аминокислотную последовательность
 25 DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLE_{YF}YGT
 P_CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF_{AS}SRANTGELFFGEGSR
 LTVL» с SEQ ID NO: 149 или
 «DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLE_{YF}YGT
 P_CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF_{AS}RADTGELFFGEGS
 30 RLTVL» с SEQ ID NO: 150, и где предпочтительно аминокислотная
 последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 149, предпочтительно включает
 аминокислотную последовательность CDRb1 с SEQ ID NO: 62, CDRb2 с SEQ
 ID NO: 65 и CDRb3 с SEQ ID NO: 14, и где предпочтительно аминокислотная
 последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная аминокислотной
 35 последовательности SEQ ID NO: 150, включает аминокислотную
 последовательность CDRb1 с SEQ ID NO: 62, CDRb2 с SEQ ID NO: 65 и

CDRb3 с SEQ ID NO: 71, и предпочтительно дополнительно включает аминокислоту 54F и/или 66C.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент либо биспецифическое антитело или его фрагмент, либо Т-клеточный рецептор (TCR) или его фрагмент, либо биспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) или его фрагмент. Антитело и TCR и соответствующие фрагменты определены в настоящем документе выше в разделе «Определения».

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок имеет человеческое происхождение, под которым понимается, что он образован из человеческого антигенного локуса и поэтому включает человеческие последовательности, в частности, человеческие последовательности TCR или антитела.

В одном варианте осуществления первый полипептид и второй полипептид связаны друг с другом, в частности, посредством ковалентной связи.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой растворимый белок.

«Ковалентная связь», «линкерная последовательность» или «полипептидный линкер» соответствуют определениям, приведенным выше в разделе «Определения» (см. «Линкер»).

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок дополнительно включает одно или более из следующих:

- (i) один или более дополнительных участков связывания антигена;
- (ii) трансмембранную область, факультативно включающую цитоплазматическую сигнальную область;
- (iii) диагностическое средство;
- (iv) терапевтическое средство или
- (v) модифицирующий ФК фрагмент.

Как известно специалистам в данной области, сайт связывания антигена, например, в контексте антител, обычно образован 6 CDR, которые связываются с антигеном.

В контексте настоящего изобретения один или более дополнительных антигенсвязывающих сайтов, упомянутых в пункте (i) выше в настоящем документе, предпочтительно выбирается из сайта связывания, который связывается с антигеном, при этом указанный антиген выбирается из группы, состоящей из антигенов CD3 (таких как цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ), CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD94, CD90, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D,

GITR, FcγRc, TCRα/β и TCRγ/δ, HLA-DR, или с антигеном эффекторной клетки, предпочтительно CD3, TCRα/β или CD28, более предпочтительно CD3 и TCRα/β.

«CD3» и «CD28» определены в настоящем документе выше в разделе «Определения».

5 В некоторых вариантах осуществления один из одного или более дополнительных антигенсвязывающих сайтов, указанных в пункте (i), способен связывать молекулу специфического рецептора Т-клетки, и/или молекулу специфического рецептора натуральной клетки-киллера (NK-клетки). В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок образует комплекс с Т-клеточным ко-рецептором CD3.

10 В предпочтительном варианте осуществления один из одного или более дополнительных антигенсвязывающих сайтов, указанных в пункте (i), способен связывать TCRα/β.

В некоторых вариантах осуществления специфический рецептор Т-клетки представляет собой Т-клеточный ко-рецептор CD3.

15 В некоторых вариантах осуществления специфический рецептор Т-клетки представляет собой CD28, CD134, 4-1 BB, CD5 или CD95.

«CD134», «4-1 BB», «CD5», «CD95» и «молекула специфического рецептора NK-клетки» определены в настоящем документе выше в разделе «Определения». Термины «трансмембранная область», «цитоплазматическая сигнальная область»,
20 «диагностическое средство», «терапевтическое средство» и «модифицирующий ФК фрагмент» определены в настоящем документе выше в разделе «Определения».

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по изобретению ковалентно присоединены, непосредственно или через расщепляемый или нерасщепляемый линкер, к по меньшей мере одному ингибитору роста.
25 Антигенсвязывающий белок, к которому присоединен такой по меньшей мере один ингибитор роста, может также называться конъюгатом.

Способ получения таких конъюгатов, например, иммуноконъюгатов, описано в патентной заявке WO2004/091668 или публикациях Hudecz, F., Methods Mol. Biol. 298: 209-223 (2005) и Kirin et al., Inorg Chem. 44 (15): 5405-5415 (2005), и специалисты в
30 данной области могут перенести его на получение антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, к которым присоединен такой по меньшей мере один ингибитор роста.

«Линкер» в контексте присоединения по меньшей мере одного ингибитора роста означает химическое соединение, содержащее ковалентную связь или цепь атомов,
35 которые ковалентно присоединяет полипептид к лекарственному фрагменту.

Конъюгаты могут быть приготовлены методами *in vitro*. Для того чтобы связать лекарство или пролекарство с антителом, используется связывающая группа.

Подходящие связывающие группы хорошо известны в данной области и включают дисульфидные группы, тиозфирные группы, лабильные к кислотам группы, фотоллабильные группы, лабильные к пептидазам группы и лабильные к эстеразам группы. Конъюгирование антигенсвязывающего белка по изобретению с

5 цитотоксическими средствами или ингибиторами роста может быть осуществлено с использованием различных бифункциональных агентов связывания белков, включая, среди прочего, N-сукцинимидилпиридилдитиобутират (SPDB), 4-[(5-нитро-2-пиридинил)дитио]-2,5-диоксо-1-пирролидиниловый эфир масляной кислоты (нитро-SPDB), 4-(пиридин-2-илдисульфанил)-2-сульфомасляную кислоту (сульфо-SPDB), N-

10 сукцинимидил-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидозфиров (такие как диметиладипимидата гидрохлорид), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (например, бис(п-

15 азидобензоил)гександиамин), бис-дiazониевые производные (например, бис(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (например, толуол-2,6-диизоцианат) и бифункциональные соединения фтора (например, 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицина может быть получен, как описано в работе Vitetta et al (1987).

Меченная углеродом 1-

20 изотиоцианатобензилметилдиэтилентриаминопентауксусная кислота (MX-DTPA) является образцовым хелатирующим агентом для конъюгации радионуклеотида с антителом (WO 94/11026).

Линкер может быть «расщепляемым линкером», способствующим высвобождению цитотоксического средства или ингибитора роста в клетке. Например, может быть

25 использован кислотнo-лабильный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, эстераза-лабильный линкер, фотоллабильный линкер или дисульфид-содержащий линкер (см., например, патент США № 5,208,020). Линкер может быть также «нерасщепляемым линкером» (например, SMCC-линкер), что может привести к лучшей переносимости в некоторых случаях.

30 В качестве альтернативы можно получить слитый белок, включающий антитело по изобретению и цитотоксический или ингибирующий рост полипептид, с помощью рекомбинантных методов или пептидного синтеза. Длина ДНК может включать соответствующие участки, кодирующие обе части конъюгата, либо прилегающие друг к другу, либо разделенные участком, кодирующим линкерный пептид, который не

35 нарушает желаемые свойства конъюгата.

Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению также могут быть использованы в опосредованной ферментами терапии предшественниками

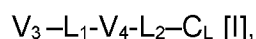
лекарственных средств, путем конъюгирования полипептида с ферментом, активирующим про-лекарство, который превращает про-лекарство (например, химиотерапевтическое средство пептидил, см., например, заявку WO 81/01145) в активное противораковое лекарство (см., например, WO 88/07378 и патент США № 4 975 278).

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению дополнительно включает одно или более из следующего: фермент, цитокин (например, человеческий IL-2, IL-7 или IL-15), наноноситель или нуклеиновую кислоту.

В одном предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок является биспецифическим. Биспецифический антигенсвязывающий белок в настоящем документе также называется «биспецифической молекулой».

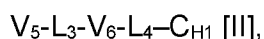
Многие различные биспецифические форматы описаны в данной области техники и описаны выше в настоящем документе в разделе «Определение» под определением термина «форматы». Способы получения белков различных форматов также известны в данной области и цитируются в соответствующих разделах, и, таким образом, специалисты в данной области техники могут легко использовать CDR или переменные домены, как определено в контексте настоящего изобретения, в описанных здесь форматах. Получение антигенсвязывающих белков, таких как scTCR или растворимые биспецифические связывающие белки, такие как TCER™, также раскрыто в разделе примеров данного документа. Специалистам в данной области будет понятно, что переменные домены легкой и тяжелой цепи могут быть в параллельной ориентации и переменные домены альфа и бета могут быть в параллельной ориентации, как это имеет место в формате DVD, или что переменные домены легкой и тяжелой цепи могут быть в перекрестной ориентации и переменные домены альфа и бета могут быть в перекрестной ориентации, как это имеет место, например, в формате CODV.

Соответственно, изобретение также относится к антигенсвязывающему белку, включающему две полипептидные цепи, образующие два антигенсвязывающих участка (A и B), где первая полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой:



где V_3 представляет собой третий переменный домен; V_4 представляет собой четвертый переменный домен; L_1 и L_2 представляют собой линкеры; L_2 может присутствовать или отсутствовать; C_L представляет собой константный домен легкой цепи или его часть и может присутствовать или отсутствовать;

и где вторая полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой:



где V_5 представляет собой пятый переменный домен; V_6 представляет собой шестой переменный домен; L_3 и L_4 представляют собой линкеры; L_4 может присутствовать или отсутствовать; C_{n1} представляет собой константный домен 1 тяжелой цепи или его часть и может присутствовать или отсутствовать; и где

- 5 V_3 или V_4 представляет собой первый переменный домен, как определено в настоящем документе выше, и V_5 или V_6 представляет собой второй переменный домен, как определено в настоящем документе выше, или
 V_5 или V_6 представляет собой первый переменный домен, как определено в контексте настоящего изобретения, и V_3 или V_4 представляет собой второй переменный домен,
- 10 как определено в настоящем документе выше, и где
 V_3 представляет собой первый переменный домен и V_5 представляет собой второй переменный домен, как определено в настоящем документе выше, и V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_6 представляет собой переменный домен тяжелой цепи, или V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и
- 15 V_6 представляет собой переменный домен легкой цепи, или,
 V_3 представляет собой второй переменный домен и V_5 представляет собой первый переменный домен, как определено в настоящем документе выше, и V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_6 представляет собой переменный домен тяжелой цепи или V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и
- 20 V_6 представляет собой переменный домен легкой цепи, или
 V_3 представляет собой первый переменный домен и V_6 представляет собой второй переменный домен, как определено в настоящем документе выше, и V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_5 представляет собой переменный домен тяжелой цепи или V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и
- 25 V_5 представляет собой переменный домен легкой цепи, или
 V_3 представляет собой второй переменный домен и V_6 представляет собой первый переменный домен, как определено в настоящем документе выше, и V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_5 представляет собой переменный домен тяжелой цепи или V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и
- 30 V_5 представляет собой переменный домен легкой цепи,
 V_4 представляет собой первый переменный домен и V_5 представляет собой второй переменный домен, как определено в настоящем документе выше, и V_3 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_6 представляет собой переменный домен тяжелой цепи или V_3 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и
- 35 V_6 представляет собой переменный домен легкой цепи, или
 V_4 представляет собой второй переменный домен и V_5 представляет собой первый переменный домен, как определено в настоящем документе выше, и V_3 представляет

собой переменный домен легкой цепи и V_6 представляет собой переменный домен тяжелой цепи или V_3 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и V_6 представляет собой переменный домен легкой цепи,

и где переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи вместе образуют один антигенсвязывающий сайт В, и где первый и второй переменный домен, как определено выше в настоящем документе, образуют один антигенсвязывающий сайт А. Определение линкерам L_1 , L_2 , L_3 , L_4 дано выше в настоящем документе в разделе «определения». Однако в некоторых вариантах осуществления некоторые длины линкеров могут быть предпочтительными для конкретного формата. При этом знания, касающиеся длины линкеров и их аминокислотных последовательностей, относятся к общему уровню техники, и линкеры, а также линкерные и аминокислотные последовательности для различных форматов являются частью уровня техники и раскрыты в цитированных выше изобретениях.

Специалистам в данной области будет понятно, что антигенсвязывающий сайт А, образованный первым и вторым переменным доменом, как определено выше в настоящем документе, специфически связывается с комплексом пептида MAGE-A/MHC, как описано в данном документе в контексте настоящего изобретения.

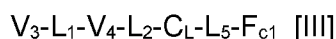
В предпочтительном варианте V_3 представляет собой первый переменный домен, а V_6 представляет собой второй переменный домен, как определено в контексте настоящего изобретения, и V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_5 представляет собой переменный домен тяжелой цепи или

V_3 представляет собой первый переменный домен и V_6 представляет собой второй переменный домен, как определено в контексте настоящего изобретения, и V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и V_5 представляет собой переменный домен легкой цепи.

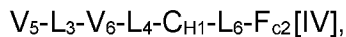
В одном варианте осуществления полипептид формулы [I] дополнительно содержит на С-конце полипептида формулы [I] линкер (L_5) и F_c -домен или его часть и/или, где полипептид формулы [II] дополнительно содержит на С-конце полипептида формулы [II] линкер (L_6) и F_c -домен или его часть.

F_c -домен соответствует определению, приведенному выше в настоящем документе в разделе «Определения».

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок включает две полипептидные цепи, которые образуют два сайта связывания антигена (А и В), отличающийся тем, что одна полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой [III]:



и одна полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой [IV]:



где $V_3, L_1, V_4, L_2, CL, V_5, L_3, V_6, L_4, C_{H1}$ определены выше в настоящем документе, и где L_5 и L_6 представляют собой линкеры, которые присутствуют или отсутствуют, и где F_{c1} и F_{c2} представляют собой F_c -домены, и где F_{c1} и F_{c2} одинаковые или разные, предпочтительно разные. F_c -домен соответствует определению, приведенному выше в настоящем документе в разделе «Определения».

В одном варианте осуществления F_{c1} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113 (впадина), а F_{c2} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112 (выступ), или наоборот,

более предпочтительно F_{c1} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, когда V_4 или V_3 представляет собой переменный домен тяжелой цепи, и, соответственно, F_{c2} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, когда V_5 или V_6 представляет собой переменный домен легкой цепи, или

F_{c1} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, когда V_4 или V_3 представляет собой переменный домен легкой цепи, и, соответственно, F_{c2} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, когда V_5 или V_6 представляет собой переменный домен тяжелой цепи.

В одном варианте осуществления переменный домен тяжелой цепи (V_H) и переменный домен легкой цепи (V_L) вместе образуют один сайт связывания B, который связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD3 (например, CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ), CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD94, CD90, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, Fc ϵ RI, TCR α/β и TCR γ/δ , HLA-DR и/или связываются с эффекторной клеткой.

В дополнительном варианте осуществления переменный домен тяжелой цепи (V_H) и переменный домен легкой цепи (V_L) образуют вместе один сайт связывания, который связывается с молекулой специфического рецептора Т-клетки, и/или молекулой специфического рецептора натуральной клетки-киллера (NK-клетки), где молекула специфического рецептора Т-клетки и специфического рецептора натуральной клетки-киллера (Nk-клетки) определены в настоящем документе выше в разделе «определение».

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154 или переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной

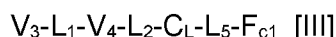
последовательности SEQ ID NO: 153 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 156, или переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 157 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 158, или переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 159 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 160, или переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 162, или переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 164.

предпочтительно, переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154 или переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 156, или переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 159 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 160, или переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 162, или переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 164, более предпочтительно переменный домен легкой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 159 и переменный домен тяжелой цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 160.

Как видно из примеров, автор настоящего изобретения продемонстрировал в качестве доказательства принципа использование CDR, определенных в контексте настоящего изобретения, в частности переменных доменов, определенных в настоящем документе выше, в формате TCER™ (Пример).

Соответственно, в одном предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок включает две полипептидные цепи, которые образуют два

сайта связывания антигена, где одна полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой [III]:



и одна полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой [IV]:



где L_2 , C_L , L_5 и L_4 , C_{H1} , L_6 отсутствуют и

где V_3 , L_1 , V_4 , V_5 , L_3 , V_6 определены в настоящем документе выше,

предпочтительно V_3 представляет собой первый переменный домен и V_6 представляет собой второй переменный домен, как определено в контексте настоящего изобретения, и V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_5 представляет собой переменный домен тяжелой цепи, или предпочтительно V_3 представляет собой первый переменный домен и V_6 представляет собой второй переменный домен, как определено в контексте настоящего изобретения, и V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и V_5 представляет собой переменный домен легкой цепи, и

предпочтительно L_1 и L_3 включают или состоят из аминокислотной последовательности «GGGSGGGGGG» (SEQ ID NO:96), и

предпочтительно F_{c1} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113 и F_{c2} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, или наоборот,

более предпочтительно F_{c1} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, когда V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи, и, соответственно, F_{c2} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, когда V_5 представляет собой переменный домен легкой цепи, или

более предпочтительно F_{c1} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, когда V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи, и, соответственно, F_{c2} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, когда V_5 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и

переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи вместе образуют один антигенсвязывающий сайт, который предпочтительно связывается с антигеном, как определено в настоящем документе выше, предпочтительно CD3, TCR α/β или CD28, более предпочтительно CD3 или TCR α/β ,

и где первый и второй переменный домен образуют один антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с антигенным пептидом MAGE-A, как определено в контексте настоящего изобретения.

Антигенсвязывающий белок этого варианта осуществления может быть назван биспецифическим TCR или F_c-содержащим биспецифическим TCR/mAb диателом. Антигенсвязывающий белок этого варианта осуществления может также называться TCER™.

- 5 «TCER™» представляют собой биспецифические Т-клеточные рецепторы (TCR), которые представляют собой растворимые антигенсвязывающие белки, включающие два антигенсвязывающих домена, первый и второй вариабельный домен, как определено в контексте изобретения, и еще один антигенсвязывающий домен, который образован вариабельным доменом тяжелой и легкой цепи антитела, также называемый рекрутером, например, вариабельные легкие и вариабельные тяжелые домены, направленные против CD3 или направленные против TCRα/β.

В одном предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, такой как TCER™, содержит

- один первый полипептид формулы V₃-L₁-V₄-L₂-C_L-L₅-F_{c1} [III] с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 135):

EDVEQSLFLSVREGDSVINCTYT**DSSST**LYWYKQEPGKGLQLLTYI**SSQDSK**QDQRLT
VLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF**CAEMTSESKI**IFGSGTRLISIRP**GGGSGGGG**EVQLVQ
SGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTSYVMHWVRQAPGGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQ
GRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVHYCARGSYDYEGFVYWGGQTLTVTS**SEPKSS**
20 **DKHTCP**PCAPP**PA**VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**ASIEKTI**SKAKGQP
REPQVCTLPPSRDELTKNQVSL**SCAVKGF**YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

где L₂, C_L, L₅ отсутствуют и который состоит из V₃ (вариабельный домен альфа-цепи зрелого TCR) с последовательностью SEQ ID NO: 138 (включая CDRα1, CDRα2, CDRα3 с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 35, выделено жирным шрифтом), L₁ (подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 96, V₄ (анти-TCRαβ VH) с последовательностью SEQ ID NO: 160 и F_{c1} (выделено курсивом и подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 113; и

- 30 - один второй полипептид формулы V₅-L₃-V₆-L₄-C_{H1}-L₆-F_{c2} [IV] с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 136):

QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSVMHWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIK**GGGSGGGG**DAGVIQS
PRHEVTEMGQEVTLRCKPI**PGHDY**LFWYRQTMMRGLELLFY**FCYGT**PCDDSGMPEDRFSA
35 KMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF**CASRADTGELFF**GEGRSLTVL**EPKSSDKHTCP**PCA
PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI**SKAKGQPREPQVYTLPPC**

RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

где L_4 , C_{H1} , L_6 отсутствуют и который включает V_5 (анти-TCR $\alpha\beta$ VL) с последовательностью SEQ ID NO: 159, L_3 (подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 96, V_6 (вариабельный домен бета, производный от TCR) с последовательностью SEQ ID NO: 150 (с CDRa1, CDRa2, CDRa3 с SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 71, выделено жирным шрифтом) и F_{c2} (выделено курсивом и подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 112, где последовательности F_{c1} и F_{c2} включают аминокислотную замену цистеина на серин (S выделено жирным шрифтом), поскольку нет необходимости связывания легкой цепи через указанный цистеин, аминокислотные замены шарнирной области IgG1, чтобы они напоминали шарнир IgG2 для отмены F_c -гамма-рецепторного взаимодействия (PVA выделено жирным шрифтом в положениях 233–235 и 331S), аминокислотную замену N297Q (Q выделено жирным шрифтом) для удаления сайта N-гликозилирования внутри F_c -части для отмены F_c -гамма-рецепторного взаимодействия и, кроме того, мутацию впадины (Y349C, T366S, L368A и Y407V) в случае F_{c1} и мутацию выступа (S354C и T366W) в случае F_{c2} . Соответственно, в одном предпочтительном варианте осуществления F_{c1} имеет последовательность SEQ ID NO: 113 и F_{c2} имеет последовательность SEQ ID NO: 112.

В другом предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, такой как TCERTM, включает один первый полипептид формулы V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{c1} [III] с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO:136):

QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSVMHWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLGSGVPSRF
 SGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGGGSGGGGDAGVIQS
 PRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSA
 KMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSRLTVLEPKSSDKTHTCPPCPA
 PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC
RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

где L_2 , C_L , L_5 отсутствуют и который включает V_3 (анти-TCR $\alpha\beta$ VL) с последовательностью SEQ ID NO: 159, L_1 (подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 96, V_4 (вариабельный домен бета, производный от TCR) с последовательностью SEQ ID NO: 150 (включая CDRb1, CDRb2, CDRb3 с последовательностями SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO: 71, выделено жирным шрифтом) и F_{c1} (выделено курсивом и подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 112; и один второй полипептид формулы V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_6 - F_{c2} [IV] с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 137):

EDVEQSLFLSVREGDSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLT
 VLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGSGGGGEVQLVQ
 SGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQ
 GRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVHYCARGSYDYEGFVYWGQGLTVTSSEPKSS
 5 DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQP
REPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

где L_4 , C_{H1} , L_6 отсутствуют и который включает V_5 (вариабельный домен альфа,
 10 производный от зрелого TCR) с последовательностью SEQ ID NO: 151 (включая CDRa1,
 CDRa2, CDRa3 с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 35, выделено жирным
 шрифтом), L_3 (подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 96, V_6 (анти-TCR $\alpha\beta$ VH)
 с последовательностью SEQ ID NO: 160 и F_{c2} (выделено курсивом и подчеркнуто) с
 последовательностью SEQ ID NO: 113;

15 где последовательность F_{c1} и F_{c2} содержит аминокислотную замену цистеина на серин
 (S выделено жирным шрифтом), поскольку нет необходимости в соединении легкой
 цепи через указанные аминокислотные замены цистеина шарнирной области IgG1,
 чтобы они напоминали шарнир IgG2, чтобы исключить F_c -гамма-рецепторное
 взаимодействие (PVA выделено жирным шрифтом в положениях с 233 по 235 и 331S),
 20 аминокислотную замену N297Q (Q выделено жирным шрифтом) для удаления сайта N-
 гликозилирования в F_c -части для отмены F_c -гамма-рецепторного взаимодействия и,
 кроме того, мутацию впадины (Y349C, T366S, L368A и Y407V) в случае F_{c2} и мутацию
 выступа (S354C и T366W) в случае F_{c1} . Соответственно, в одном предпочтительном
 варианте осуществления F_{c1} имеет последовательность SEQ ID NO: 112 и F_{c2} имеет
 25 последовательность SEQ ID NO: 113.

В другом предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок,
 такой как TCERTM, содержит один первый полипептид формулы V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{c1} [III]
 с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO:131):

EDVEQSLFLSVREGDSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLT
 30 VLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGSGGGGDIQMTQS
 PSSLSASVGDRVITICRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSG
 TDYTLTISSLQPEDIATYFCQQGQTLPWTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN
 35 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

где L_2 , C_L , L_5 отсутствуют и который включает V_3 (вариабельный домен альфа, производный от зрелого TCR) с последовательностью SEQ ID NO: 151 (включая CDRa1, CDRa2, CDRa3 с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 35, выделено жирным шрифтом), L_1 (подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 96, V_4 (анти-TCR $\alpha\beta$ VL) с последовательностью SEQ ID NO: 153 и F_{c1} (выделено курсивом и подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 112; и

и один второй полипептид формулы V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_6 - F_{c2} [IV] с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 130):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVST
 YAQKFQDRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSWDWYFDWVGQGLTLVT
 VSSGGGSGGGGDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWRQTMMRGLELLFY
FCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSR
 LTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK
 TISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

где L_4 , C_{H1} , L_6 отсутствуют и который включает V_5 (анти-TCR $\alpha\beta$ VL) с последовательностью SEQ ID NO: 154, L_3 (подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 96, V_6 (вариабельный домен бета, производный от TCR) с последовательностью SEQ ID NO: 151 (включая CDRb1, CDRb2, CDRb3 с последовательностями SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 71, выделено жирным шрифтом) и F_{c2} (выделено курсивом и подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 113,

где последовательность F_{c1} и F_{c2} содержит аминокислотную замену цистеина на серин (S выделено жирным шрифтом), поскольку нет необходимости в соединении легкой цепи через указанные аминокислотные замены цистеина шарнирной области IgG1, чтобы они напоминали шарнир IgG2, чтобы исключить F_c -гамма-рецепторное взаимодействие (PVA выделено жирным шрифтом в положениях с 233 по 235 и 331S), аминокислотную замену N297Q (Q выделено жирным шрифтом) для удаления сайта N-гликозилирования в F_c -части для отмены F_c -гамма-рецепторного взаимодействия и, кроме того, мутацию впадины (Y349C, T366S, L368A и Y407V) в случае F_{c2} и мутацию выступа (S354C и T366W) в случае F_{c1} . Соответственно, в одном предпочтительном варианте осуществления F_{c1} имеет последовательность SEQ ID NO: 112 и F_{c2} имеет последовательность SEQ ID NO: 113.

В другом предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, такой как TCERTM, содержит один первый полипептид формулы V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{c1} [III] с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 133):

EDVEQSLFLSVREGDSVINCTYTE**SSSTY**LYWYKQEPGKGLQLLTY**YSSQDQKQDQRLT**
 VLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF**CAEMTSESKI**IFGSGTRLSIRPGGGSGGGGDIQMTQS
 PSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSG
 TDYTLTISSLQPEDIATYFCQQGQTLPWTFGQGTKVEI**KEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPS**
 5 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

где L_2 , C_L , L_5 отсутствуют и который включает V_3 (вариабельный домен альфа, производный от зрелого TCR) с последовательностью SEQ ID NO: 152 (включая CDRa1, CDRa2, CDRa3 с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 35, выделено жирным шрифтом), L_1 (подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 96, V_4 (анти-TCR $\alpha\beta$ VL) с последовательностью SEQ ID NO: 154 и F_{c1} (выделено курсивом и подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 112; и

15 один второй полипептид формулы V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_6 - F_{c2} [IV] с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 130):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVST
 YAQKFQDRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDWVGQGLTVT
 VSSGGGSGGGGDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFY
 20 **FCYGT**PCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF**CASRADT**GELFFGEGSR
 LTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK
 TISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP,

25 где L_4 , C_{H1} , L_6 отсутствуют и который включает V_5 (анти-TCR $\alpha\beta$ VL) с последовательностью SEQ ID NO: 154, L_3 (подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 96, V_6 (вариабельный домен бета, производный от TCR) с последовательностью SEQ ID NO: 151 (включая CDRb1, CDRb2, CDRb3 с последовательностями SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 71, выделено жирным шрифтом) и F_{c2} (выделено курсивом и подчеркнуто) с последовательностью SEQ ID NO: 113,

30 где последовательность F_{c1} и F_{c2} содержит аминокислотную замену цистеина на серин (S выделено жирным шрифтом), поскольку нет необходимости в соединении легкой цепи через указанные аминокислотные замены цистеина шарнирной области IgG1, чтобы они напоминали шарнир IgG2, чтобы исключить F_c -гамма-рецепторное взаимодействие (PVA выделено жирным шрифтом в положениях с 233 по 235 и 331S), аминокислотную замену N297Q (Q выделено жирным шрифтом) для удаления сайта N-гликозилирования в F_c -части для отмены F_c -гамма-рецепторного взаимодействия и,

кроме того, мутацию впадины (Y349C, T366S, L368A и Y407V) в случае F_{c2} и мутацию выступа (S354C и T366W) в случае F_{c1} . Соответственно, в одном предпочтительном варианте осуществления F_{c1} имеет последовательность SEQ ID NO: 112 и F_{c2} имеет последовательность SEQ ID NO: 113.

- 5 В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, включающему
- i) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 127 и второй полипептид формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из
 - 10 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 128,
 - ii) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 127 и второй полипептид формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из
 - 15 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130,
 - iii) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 131 и второй полипептид формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из
 - 20 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133 и второй полипептид формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130,
 - v) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 135 и второй полипептид формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из
 - 25 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136,
 - vi) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137 и второй полипептид формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из
 - 30 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136,
 - vii) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139 и второй полипептид формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из
 - 35 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136,
 - viii) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 131 и второй полипептид

формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 142,

ix) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133 и второй полипептид

5 формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 142,

x) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 131 и второй полипептид

10 формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136,

xi) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133 и второй полипептид

формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136,

15 xii) первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133 и второй полипептид

формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 166,

предпочтительно от iii) до xi), более предпочтительно iii) и iv).

20 В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, включающему первый полипептид формулы

$V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 131 и второй полипептид формулы

$V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130; или настоящее изобретение

25 относится к антигенсвязывающему белку, включающему первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133 и второй полипептид формулы

$V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130; или настоящее изобретение

30 относится к антигенсвязывающему белку, включающему первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 135 и второй полипептид формулы

$V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136; или настоящее изобретение

35 относится к антигенсвязывающему белку, включающему первый полипептид формулы $V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137 и второй полипептид формулы

$V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136; или настоящее изобретение

относится к антигенсвязывающему белку, включающему первый полипептид формулы

$V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}$ [III], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139 и второй полипептид формулы $V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}$ [IV], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136.

Также может быть желательно модифицировать антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению в отношении эффекторной функции, например чтобы усилить или уменьшить антигензависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC) антигенсвязывающего белка. Это может быть достигнуто путем введения одной или нескольких аминокислотных замен в F_c -области антигенсвязывающего белка, которые в настоящем документе также называются F_c -вариантами в контексте антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. Альтернативно или дополнительно в F_c -область может быть введен цистеиновый остаток (остатки), чтобы могла образоваться междоцепочечная дисульфидная связь в этой области. Образованный таким образом гетеродимерный антигенсвязывающий белок может обладать улучшенной или уменьшенной способностью к интернализации и/или повышенным комплемент-опосредованным клеточным лизисом и/или антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) (Caron PC. et al. 1992; and Shopes B. 1992).

Другой тип аминокислотной модификации антигенсвязывающего белка по изобретению может быть полезен для изменения исходной картины гликозилирования антигенсвязывающего белка, то есть путем удаления одного или нескольких углеводных фрагментов, присутствующих в антигенсвязывающем белке, и/или добавления одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые не присутствуют в антигенсвязывающем белке. Присутствие любой из трипептидных последовательностей аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, создает потенциальный сайт гликозилирования. Добавление или удаление сайтов гликозилирования в антигенсвязывающем белке удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования).

Другой тип модификации включает удаление последовательностей, определенных либо *in silico*, либо экспериментально, как потенциально приводящих к продуктам деградации или гетерогенности препаратов антигенсвязывающего белка. В качестве примера можно привести деамидирование остатков аспарагина и глутамина, которое может происходить в зависимости от таких факторов, как pH и обнажение поверхности. Остатки аспарагина особенно чувствительны к деамидированию, прежде всего, когда они находятся в последовательности Asn-Gly, и в меньшей степени в других

дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala. Когда такой участок деамидирования, в частности Asn-Gly, присутствует в антигенсвязывающем белке по изобретению, по этой причине может быть желательно удалить этот участок, обычно путем консервативной замены, для удаления одного из вовлеченных остатков. Такие замены в последовательности с целью удаления одного или более вовлеченных остатков также охватываются настоящим изобретением.

Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное присоединение гликозидов к антигенсвязывающему белку. Преимущество таких процедур состоит в том, что они не требуют производства антигенсвязывающего белка в клетке-хозяине, обладающей возможностью N- или O-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого способа связывания, сахар (сахара) может быть присоединен (присоединены) к (а) аргинину и гистидину; (б) свободным карбоксильным группам; (в) свободным сульфгидрильным группам, таким как сульфгидрильные группы цистеина; (г) свободным гидроксильным группам, таким как гидроксильные группы серина, треонина или гидроксипролина; (д) ароматическим остаткам, таким как ароматические остатки фенилаланина, тирозина или триптофана; или (е) амидной группе глутамина. Такие способы описаны, например, в заявке WO 87/05330.

Удаление любых углеводных остатков, присутствующих на антигенсвязывающем белке, может осуществляться химически или ферментативно. Химическое дегликозилирование требует воздействия на антигенсвязывающий белок соединением трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентным соединением. Такая обработка приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя антигенсвязывающий белок нетронутым. Химическое дегликозилирование описано Sojahn H. et al. (1987) и Edge, A.S. et al. (1981). Ферментативное расщепление углеводных остатков на антителах может быть достигнуто с помощью различных эндо- и экзо-гликозидаз, как описано Thotakura, N.R. et al. (1987).

Другой тип ковалентной модификации антигенсвязывающего белка включает связывание антигенсвязывающего белка с одним из различных небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, с использованием способа, описанного в патентах США №№ 4 640 835; 4 496 689; 4 301 144; 4 670 417; 4 791 192 или 4 179 337.

В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой TCR. В одном конкретном варианте осуществления TCR представляет собой человеческий TCR. Соответственно, в одном варианте осуществления указанный первый вариабельный домен находится в α или γ цепи TCR; и/или указанный второй вариабельный домен находится в β или δ цепи TCR. В одном

варианте осуществления указанный TCR является альфа-бета гетеродимером и включает последовательность константного домена альфа-цепи TRAC и последовательность константного домена бета-цепи TRBC1 или TRBC2.

Последовательность константного домена альфа-цепи TRAC и константный домен бета-цепи TRBC1 или TRBC2 в дальнейшем также будут называться последовательностями константного домена TCR. В одном варианте осуществления последовательности константного домена TCR получают из любого подходящего вида, такого как любое млекопитающее, например человек, крыса, обезьяна, кролик, осел или мышь, предпочтительно человек. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления последовательности константного домена TCR могут быть слегка модифицированы, например введением гетерологичных последовательностей, предпочтительно мышиных, что может повысить экспрессию и стабильность TCR. Кроме того, могут быть введены дополнительные стабилизирующие мутации, известные из уровня техники (например, WO 2018/104407, PCT/EP2018/069151, WO 2011/044186, WO 2014/018863), такие как замена неблагоприятных аминокислот в переменных областях и/или введение дисульфидного мостика между константными доменами TCR и удаление неспаренного цистеина.

В частности, последовательности константного домена TCR могут быть модифицированы путем усечения или замены для удаления нативной дисульфидной связи между Cys4 экзона 2 TRAC и Cys2 экзона 2 TRBC1 или TRBC2. Последовательность (последовательности) константного домена альфа и/или бета цепи также может быть модифицирована путем замены остатков цистеина на Thr 48 TRAC и Ser 57 TRBC1 или TRBC2, причем указанные цистеины образуют дисульфидную связь между константными доменами альфа и бета цепей TCR. TRBC1 или TRBC2 могут дополнительно включать мутацию цистеина в аланин в положении 75 константного домена и мутацию аспарагина в аспартовую кислоту в положении 89 константного домена. Константный домен может дополнительно или альтернативно содержать другие мутации, замены или делеции относительно нативных последовательностей TRAC и/или TRBC1/2. Понятие TRAC и TRBC1/2 охватывает природные полиморфные варианты, например, от N до K в положении 4 TRAC (Bragado et al In: Immunol. 1994 Feb;6(2):223-30).

В одном варианте осуществления TCR является химерным.

«Химерный TCR» в настоящем документе относится к TCR, в котором цепи TCR включают последовательности от нескольких видов. Предпочтительно, TCR в контексте настоящего изобретения может включать α -цепь, состоящую из человеческой переменной области α -цепи и, например мышиной константной области α -цепи мышиного TCR.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению представляет собой одноцепочечный TCR (scTCR) или одноцепочечное биспецифическое антитело. В этом варианте осуществления первый полипептид и второй полипептид ковалентно связаны друг с другом, где ковалентная связь является такой, как определено в настоящем документе выше в разделе «Определение».

scTCR может включать полипептид вариабельной области первой цепи TCR (например, альфа-цепи) и полипептид всей (полноразмерной) второй цепи TCR (например, бета-цепи), или наоборот. Кроме того, scTCR может дополнительно включать один или более линкеров, которые соединяют два или более полипептидов вместе. Линкер может быть, например, пептидом, который соединяет две одиночные цепи, как описано в настоящем документе. Также предметом изобретения является такой scTCR по изобретению, который слит с человеческим цитокином, таким как IL-2, IL-7 или IL-15.

В одном варианте осуществления указанный одноцепочечный TCR имеет один из одноцепочечных форматов, выбранных из группы, состоящей из Вальфа-L₁-Vбета, Vбета-L₁-Вальфа, Вальфа-Ca-L₁-Vбета, Вальфа-Cb-L₁-Vбета, Вальфа-L₁-Vбета-Cb, Вальфа-L₁-Vбета-Ca, Вальфа-Ca-L₁-Vбета-Cb, Вальфа-Cb-L₁-Vбета-Ca, предпочтительно Вальфа-L₁-Vбета, Vбета-L₁-Вальфа, где Вальфа представляет собой первый вариабельный домен, как определено в настоящем документе выше, и где Vбета представляет собой второй вариабельный домен, как определено в настоящем документе выше, Ca и Cb представляют собой альфа- и бета-константные области TCR, которые присутствуют или отсутствуют соответственно, а L₁ представляет собой линкер, который присутствует или отсутствует и определен в настоящем документе выше в разделе «определения».

В одном варианте осуществления такой одноцепочечный TCR может дополнительно включать по меньшей мере один дополнительный вариабельный домен, предпочтительно один или два дополнительных вариабельных домена, либо C-, либо N-терминально связанных.

В одном варианте осуществления такой дополнительный вариабельный домен может быть связан с помощью дополнительного линкера L_k. В одном предпочтительном варианте осуществления линкер L_k представляет собой линкер, как определено в настоящем документе выше, или C_{H1}-шарнирную последовательность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114.

Изобретение также включает частицы, экспонирующие антигенсвязывающие белки по изобретению, в частности TCR, и включение указанных частиц в библиотеку частиц. Такие частицы включают, но не ограничиваются ими, фаги, дрожжи, рибосомы или клетки млекопитающих. Способ получения таких частиц и библиотек известен в

данной области (см., например, заявки WO2004/044004; WO01/48145, публикацию Chervin et al. (2008) J. Immuno. Methods 339.2: 175-184).

Кроме того, авторы настоящего изобретения продемонстрировали в примерах, в частности в примере 3, что антигенсвязывающие белки настоящего изобретения связывают целевой антиген, то есть антигенный пептид MAGE-A в комплексе с белком МНС, предпочтительно в комплексе с HLA-A*02, с высокой специфичностью, то есть, антигенсвязывающие белки специфически связываются с идентифицированным эпитопом.

Соответственно, антигенсвязывающие белки настоящего изобретения специфически связываются с антигенным пептидом MAGE-A, включающим или состоящим из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» с SEQ ID NO: 1, где указанный антигенный пептид находится в комплексе с белком МНС, предпочтительно в комплексе с HLA-A*02. Более конкретно, в одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с эпитопом, включающим или состоящим по меньшей мере из трех или по меньшей мере из четырех аминокислотных позиций антигенного пептида MAGE-A с SEQ ID NO: 1, предпочтительно по меньшей мере 3, по меньшей мере из 4 аминокислотных позиций, более предпочтительно по меньшей мере из 3, например 3 или 4, наиболее предпочтительно из 3, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных позиций 1, 5, 7 и 8 или 1, 3, 5, 7 и 8, в частности 1, 5 и 7, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Определение точного эпитопа может несколько отличаться в зависимости от используемого способа и выбранных значений отсечения. Благодаря свойству связываться преимущественно с аминокислотными позициями 1, 5 и 7 антигенсвязывающие белки по изобретению не связываются в значительной степени с подобными пептидами NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223 и ODC-001.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок настоящего изобретения не связывается в значительной степени с вариантом антигенного пептида MAGE-A, включающим или состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере одно из положений 1, 5 и 7, по меньшей мере одно из положений 1, 5, 7 и 8 или по меньшей мере одно из положений 1, 3, 5, 7 и 8 замещено, предпочтительно замещено на аланин.

«Не связывается в значительной степени» в контексте антигенсвязывающих белков по изобретению, в частности TCR или их фрагментов, или биспецифических TCR и их фрагментов, таких как антигенсвязывающие белки, экспрессируемые Т-клетками, означает, как правило в функциональном анализе, например в анализе активации TCR, таком как высвобождение IFN-гамма, описанном выше, ответ, такой как сигнал, который детектируется, например для вариантов антигенного пептида, который составляет

менее 30 %, менее 25 %, менее 20 %, менее 15 %, предпочтительно менее 30 % от ответа, то есть сигнала, полученного для пептида MAGE-A, состоящего из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» из SEQ ID NO: 1, предпочтительно в тех же экспериментальных условиях. «Не связывается в значительной степени» в контексте антигенных пептидных вариантов и в контексте антигенсвязывающих белков по изобретению, в частности растворимых антигенсвязывающих белков по изобретению, означает, обычно в анализе связывания, например, в биослойной интерферометрии, что значение K_D , определенное для варианта антигенного пептида, увеличено более чем в 3 раза, более чем в 3,5 раза, более чем в 4 раза, более чем в 4,5 раза, более чем в 5 раз, предпочтительно более чем в 3 раза, например от 3 до 10 раз, по сравнению со значением K_D , определенным для пептида MAGE-A, состоящего из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» с SEQ ID NO: 1, предпочтительно в тех же экспериментальных условиях, где сигнал, полученный для вариантов антигенного пептида, предпочтительно является фоновым сигналом, где варианты антигенного пептида или пептид MAGE-A находятся в комплексе с молекулой МНС.

Согласно вышеизложенному, в одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению, в частности растворимый антигенсвязывающий белок, связан с описанным в настоящем документе выше вариантом антигенного пептида MAGE-A в комплексе с белком МНС, предпочтительно в комплексе с HLA-A*02, с аффинностью, которая снижена по сравнению с аффинностью к конкретному антигену, то есть к антигенному пептиду MAGE-A, описанному в контексте изобретения, в комплексе с белком МНС, предпочтительно в комплексе с HLA-A*02, и где соответствующее значение K_D для комплекса вариантов антигенного пептида MAGE-A увеличено более чем в 3 раза, более чем в 3,5 раза, более чем в 4 раза, более чем в 4,5 раза, более чем в 5 раз, предпочтительно более чем в 3 раза, например от 3 до 10 раз. Термины «аффинность» и « K_D » определены в настоящем документе выше в разделе «Определения».

Белки МНС, в частности белки МНС класса I и HLA-A*02, соответствуют определению, приведенному в настоящем документе выше в разделе «Определения».

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению характеризуется как аффинно зрелый антигенсвязывающий белок, который способен специфически и, факультативно, селективно связывать комплекс антигенного пептида MAGE-A/МНС.

Антигенсвязывающие белки настоящего изобретения специфически связываются с комплексом антигенного пептида MAGE-A, как указано выше, в частности, с эпитопом с SEQ ID NO: 1, как определено в настоящем документе выше, и

могут различать свою соответствующую мишень, то есть антигенный пептид MAGE-A, от других, подобных пептидов, с которыми они не связываются в значительной степени.

Понятие «специфичность» или «специфически связывается» означает способность антигенсвязывающего белка отличать целевую пептидную последовательность, с которой он связывается («эпитоп»), от подобных эпитопов, пептидов или белков, то есть антигенсвязывающий белок «специфически связывается» с первым антигеном, если он не обладает значительной перекрестной реактивностью со вторым.

«Подобные пептиды» в контексте настоящего изобретения могут также называться «нецелевые» и относятся к пептидам, длина которых обычно составляет от 8 до 16 аминокислот. Подобные пептиды в контексте настоящего изобретения, как правило, представлены МНС. Кроме того, подобные пептиды в контексте настоящего изобретения включают или состоят из аминокислотной последовательности, которая сходна с аминокислотной последовательностью антигенного пептида MAGE-A, в частности, пептиды, которые по сравнению с эпитопом антигенного пептида MAGE-A включают эпитоп, в котором некоторые или все аминокислоты идентичны и/или сходны по биохимическим/биофизическим характеристикам аминокислот с аминокислотами, составляющими эпитоп соответствующего пептида MAGE-A. Благодаря такому сходству последовательностей, подобные пептиды могут быть связаны антигенсвязывающим белком, в этом сценарии, если, например, подобный пептид представлен белком МНС и, таким образом, связан антигенсвязывающим белком, например TCR, способность данного антигенсвязывающего белка, например TCR, связываться с подобным пептидом не приведет к желаемому ответу Т-клеток, но может привести к нежелательным реакциям. Такие нежелательные реакции могут быть «внеопухолевыми» побочными эффектами, например, перекрестная реактивность специфического TCR, который перекрестно реагировал с пептидом в здоровых тканях, как сообщается в публикации Lowdell *et al.*, *Cytotherapy*, от 4 декабря 2018 года, страница 7. Подобные пептиды в контексте настоящего изобретения были выбраны из базы данных, например, связанных с HLA-A*02 пептидов, представленных нормальными тканями (база данных XPRESIDENT), на основании, например, высокого сходства последовательности с MAG-003 (поиск сходства по BLAST). В связи с этими нежелательными реакциями антигенсвязывающие белки настоящего изобретения сконструированы таким образом, чтобы избежать связывания с подобными пептидами, в частности, с подобными пептидами, перечисленными в настоящем документе ниже.

Соответственно, подобные пептиды в контексте настоящего изобретения выбраны из списка, состоящего из пептида RABGAP1L-001, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, AXIN1-001, состоящего из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 24, ANO5-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 25, TPX2-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 26, SYNE3-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 27, MIA3-001, состоящего из аминокислотной
 5 последовательности SEQ ID NO: 28, HERC4-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 29, PSME2-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 30, HEATR5A-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 31, CNOT1-003, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 32, TEP1-003, состоящего из аминокислотной
 10 последовательности SEQ ID NO: 33, PITPNM3-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 34, ZFc-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 129, INTS4-002, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 171, SAMH-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 172, PPP1CA-006, состоящего из аминокислотной
 15 последовательности SEQ ID NO: 173, RPL-007, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 174, SETD1A-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 175, NOMAP-1-0320, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 176, NOMAP-1-1223, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 177 и ODC-001, состоящего из аминокислотной
 20 последовательности SEQ ID NO: 178, COL6A3-010, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 179, FAM115A-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 180, PHTF2-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 181 и RPP1-001, состоящего из аминокислотной
 последовательности SEQ ID NO: 181.

25 В одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по изобретению, в
 частности TCR или их фрагменты или биспецифические TCR и их фрагменты, такие как
 экспрессированные Т-клетками антигенсвязывающие белки, не связываются или не
 связываются в значительной степени по меньшей мере с 1, например по меньшей мере
 с 2, по меньшей мере с 3, по меньшей мере с 4, по меньшей мере с 5, например с 1, 2,
 30 3, 4, 5, предпочтительно по меньшей мере с 3 или 3 или всеми подобными пептидами,
 выбранными из списка, состоящего из RABGAP1L-001, AXIN1-001, ANO5-001, TPX2-001,
 SYNE3-001, MIA3-001, HERC4-001, PSME2-001, HEATR5A-001, CNOT1-003, TEP1-003,
 PITPNM3-001, предпочтительно HEATR5A-001, HERC4-001 и CNOT1-003, когда
 указанный подобный пептид находится в комплексе с белком MHC, предпочтительно в
 35 комплексе с HLA-A*02. Это является важным преимуществом в контексте настоящего
 изобретения, поскольку связывание с подобными пептидами, то есть нецелевыми,
 может увеличить риск побочных эффектов, соответственно тот факт, что

антигенсвязывающие белки по изобретению не реагируют перекрестно с перечисленными здесь подобными пептидами, делает его перспективным противораковым средством.

«Не связываются в значительной степени» может также быть сформулировано как «не вступают в перекрестную реакцию» в контексте подобных пептидов и в контексте антигенсвязывающих белков изобретения, в частности TCR или их фрагментов или биспецифических TCR и их фрагментов, таких как экспрессированные Т-клетками антигенсвязывающие белки, и в данном случае эта формулировка относится, например, к функциональному ответу, который измеряется в функциональном анализе для антигенсвязывающего белка, на подобный пептид/MHC по сравнению с MAGE-A, и где ответ антигенсвязывающего белка на подобные пептиды/MHC составляет менее 30 %, менее 20 %, менее 10 %, менее 5 %, например, 8 %, 6 %, 5 %, предпочтительно 5 % от ответа того же антигенсвязывающего белка на комплекс антигенного пептида MAGE-A/MHC в тех же экспериментальных условиях. В одном примере ответ представляет собой функциональный ответ Т-клеток, экспрессирующих указанный антигенсвязывающий белок, и определяется с помощью анализа высвобождения IFN-гамма, как описано в настоящем документе выше и как описано в примере 3 и на Фигуре 5 в контексте подобных пептидов.

Кроме того, в одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению, в частности растворимый антигенсвязывающий белок по изобретению, не связывается или не связывается в значительной степени по меньшей мере с одним подобным пептидом, например по меньшей мере с 2, по меньшей мере с 3, по меньшей мере с 4, по меньшей мере с 5, например с 1, 2, 3, 4, 5, предпочтительно по меньшей мере с 3 или 3 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы пептидов, состоящей из RABGAP1L-001, AXIN1-001, ANO5-001, TPX2-001, SYNE3-001, MIA3-001, HERC4-001, PSME2-001, HEATR5A-001, CNOT1-003, TERP1-003, PITPNM3-001, INTS4-002, SAMH-001, PPP1CA-006, RPL-007, SETD1A-001, NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223, ODC-001, COL6A3-010, FAM115A-001, PHTF2-001 и RPP1-001, предпочтительно CNOT1-003, SYNE3-001, TPX2-001, PSME2-001, более предпочтительно SYNE3-001, TPX2-001, PSME2-001, когда указанный подобный пептид находится в комплексе с белком MHC, предпочтительно в комплексе с HLA-A*02.

В одном примере антигенсвязывающий белок изобретения, в частности растворимый антигенсвязывающий белок изобретения, не связывается или не связывается в значительной степени с INTS4-002, SAMH-001, PPP1CA-006, RPL-007, SETD1A-001, NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223 и ODC-001, например INTS4-002, SAMH-001, PPP1CA-006, RPL-007, SETD1A-001 или NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223, ODC-001, COL6A3-010, FAM115A-001, PHTF2-001 и RPP1-001, например PPP1CA-006, RPL-007 и

SETD1A-001, когда указанный подобный пептид находится в комплексе с белком MHC, предпочтительно в комплексе с HLA-A*02.

«Не связывается в значительной степени» в контексте подобных пептидов и в контексте антигенсвязывающих белков, таких как растворимые антигенсвязывающие белки по изобретению, в данном документе характеризуется сниженной аффинностью, большими скоростями диссоциации и/или более низкими сигналами связывания, в частности, большими скоростями диссоциации и/или более низкими сигналами связывания. Например, в контексте настоящего изобретения антигенсвязывающий белок дает ответ на связывание по меньшей мере с одним комплексом подобного пептида/MHC, которая составляет менее 50 %, менее 45 %, менее 40 %, менее 30 %, менее 20 %, менее 10 %, менее 5 %, менее 4 % или менее 3 % от ответа на связывание того же антигенсвязывающего белка с комплексом антигенного пептида MAGE-A/MHC в тех же экспериментальных условиях и при той же концентрации антигенсвязывающего белка и/или, например, в контексте настоящего изобретения антигенсвязывающий белок связывается с по меньшей мере одним комплексом подобного пептида/MHC с аффинностью, которая снижена по сравнению с аффинностью к конкретному антигену, то есть к комплексу антигенного пептида MAGE-A/MHC, как описано в настоящем документе, и где соответствующее значение K_D для соответствующего подобного пептида увеличено в 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 раз, предпочтительно в 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100 раз, предпочтительно в от 20 до 100 раз, более предпочтительно в от 30 до 100 раз, например в от 40 до 100 раз, обычно в от 40 до 50 раз. Например, когда антигенсвязывающий белок связывается с комплексом MAG-003/MHC с K_D 1 нМ и антигенсвязывающий белок связывается с комплексом, например, RABGAP1L-001/MHC с K_D 100 нМ, тогда антигенсвязывающий белок связывается с RABGAP1L-001/MHC с K_D , увеличенным в 100 раз, и, таким образом, с аффинностью, уменьшенной в 100 раз. В этих примерах ответ на связывание, константы диссоциации и аффинность связывания предпочтительно измеряют с помощью биослойной интерферометрии, как описано, например, в примерах 4 и 5. В некоторых других примерах антигенсвязывающий белок связывается по меньшей мере с одним комплексом подобного пептида/MHC с аффинностью, которая снижена по сравнению с аффинностью в отношении специфического антигена, то есть комплекса антигенного пептида MAGE-A/MHC, как описано в настоящем документе, где соответствующее значение K_D для CNOT1-003, INTS4-002 и SAMH-001 увеличено более чем в 1000 раз, для COL6A3-010, PHTF2-001, RPP1-001 и FAM115A-001 увеличено более чем в 500 раз по сравнению с аффинностью к специфическому антигену, то есть к комплексу антигенного пептида MAGE-A/MHC,

когда, например, значения K_D как правило измеряли с помощью бислойной интерферометрии, как описано в примере 5.

В другом примере антигенсвязывающий белок, такой как 114-iso1-BMA(36) или 114-iso2-UCHT1(17), дает реакцию связывания с ODC-001, NOMAP-1-0320 и NOMAP-1-1223 в комплексе МНС, которая составляет менее 5 %, менее 4 %, менее 3 %, менее 2 %, например менее 1,5 %, при измерении методом биослойной интерферометрии, как описано в примере 5.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению специфически связывается с антигенным пептидом MAGE-A, включающим или состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и молекулы HLA, предпочтительно HLA-A*02, со значением K_D , которое составляет ≤ 100 мкМ, ≤ 50 мкМ, ≤ 30 мкМ, ≤ 25 мкМ, ≤ 1 мкМ, ≤ 500 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, предпочтительно от 50 пМ до 100 мкМ, от 50 пМ до 10 мкМ, от 50 пМ до 1 мкМ, более предпочтительно от 50 пМ до 500 нМ, от 50 пМ до 100 нМ, от 50 пМ до 50 нМ и от 50 пМ до 10 нМ. Соответственно, антигенсвязывающий белок по изобретению имеет сродство (K_D) к антигенному пептиду MAGE-A, включающему или состоящему из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 в комплексе с молекулой HLA, предпочтительно HLA-A*02, которое составляет ≤ 200 нМ, ≤ 150 нМ, ≤ 120 нМ, 110 нМ, предпочтительно ≤ 100 нМ, в частности от 50 пМ до 100 нМ, от 100 пМ до 100 нМ, от 1 нМ до 100 нМ. « K_D » и «аффинность» соответствуют определениям, приведенным выше в разделе «Определения».

Методы измерения аффинности, такие как K_D , известны специалистам в данной области и включают, например, поверхностный плазмонный резонанс и биослойную интерферометрию. Как известно специалистам в данной области, экспериментальные условия, используемые для таких экспериментов, такие как используемый буфер, концентрация белка, могут влиять на результаты.

В сходном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению, в частности TCR или его фрагмент или биспецифический TCR или его фрагмент, такой как экспрессированные Т-клетками антигенсвязывающие белки, имеет аффинность (K_D) к комплексу антигенного пептида MAGE-A, включающего или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и молекулы HLA, предпочтительно HLA-A*02, которая составляет ≤ 100 мкМ, ≤ 50 мкМ, ≤ 30 мкМ, ≤ 25 мкМ, ≤ 1 мкМ, предпочтительно ≤ 25 мкМ, например, от 500 нМ до 100 мкМ, от 500 нМ до 50 мкМ, от 500 нМ до 25 мкМ.

В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению является растворимым. Растворимые антигенсвязывающие белки могут включать, например, без ограничения, антитело или его фрагмент, или биспецифическое антитело или его фрагмент, фрагмент TCR или биспецифический

TCR, или scTCR. В сходном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, который предпочтительно является растворимым, связывается с комплексом антигенного пептида MAGE-A, включающего или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и молекулы HLA, предпочтительно HLA-A*02, со значением K_D , которое составляет ≤ 100 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 1 нМ, например от 10 пМ до 100 нМ, от 10 пМ до 50 нМ, от 10 пМ до 10 нМ, в частности от 50 пМ до 100 нМ, от 100 пМ до 50 нМ, от 100 пМ до 10 нМ.

Соответственно, в одном примере антигенсвязывающие белки по изобретению экспрессируются, например, в форме растворимого TCER™, описанного выше, и проводится анализ их аффинности связывания с мономерами HLA-A*02/MAG-003. Обычно измерения проводят, например, с использованием системы Octet RED384 и, как правило, настроек, рекомендованных производителем. В нескольких словах, кинетику связывания, как правило, измеряли при 30°C и, например, при скорости встряхивания 1000 об/мин, используя, например, PBS, 0,05 % Tween-20, 0,1 % BSA в качестве буфера. Антигенсвязывающие белки либо загружали на биосенсоры, такие как FAB2G или AHC, либо анализировали в растворе.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по изобретению обладают повышенной аффинностью, факультативно, по сравнению с референтным белком.

Под «референтным белком» в данном документе понимается белок, с которым сравнивается антигенсвязывающий белок по изобретению. В одном варианте осуществления референтный белок направлен против той же мишени, то есть антигенного пептида MAGE-A в комплексе с белком MHC, что и присутствующий белок, более предпочтительно упомянутый референтный белок имеет тот же формат, что и антигенсвязывающий белок, с которым его сравнивают. В одном конкретном варианте осуществления референтный белок имеет тот же формат, что и антигенсвязывающий белок, с которым его сравнивают, и референтный белок содержит CDR или переменные домены альфа и бета родительского TCR R7P1D5.

Как раскрыто в настоящем документе, антигенсвязывающие белки по изобретению распознают и/или связываются с комплексом антигенного пептида MAGE-A, включающего или состоящего из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» с SEQ ID NO: 1 и молекулы HLA, предпочтительно HLA-A*02. Таким образом, MAG-003 и молекула HLA присутствуют в главном комплексе гистосовместимости (MHC) класса I, и связывание антигенсвязывающего белка с указанным комплексом может вызвать иммунный ответ при связывании. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок настоящего изобретения вызывает иммунный ответ, который усилен по сравнению с иммунным ответом, вызываемым референтным белком.

Соответственно, в одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению индуцирует иммунный ответ, предпочтительно, если иммунный ответ характеризуется повышением уровней интерферона (IFN) γ . Соответственно, в одном примере иммунный ответ может характеризоваться с помощью значения EC_{50} , которое предпочтительно определяют в анализе высвобождения IFN-гамма.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок имеет значение EC_{50} [нМ], предпочтительно определенное по высвобождению IFN-гамма, которое ниже, чем EC_{50} референтного белка, предпочтительно антигенсвязывающий белок имеет значение EC_{50} [нМ], которое в 2 раза, предпочтительно в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 раз ниже, например, от 2 до 9 раз ниже, чем EC_{50} [нМ] референтного белка, и где значение EC_{50} представляет собой полумаксимальную концентрацию высвобождения IFN-гамма [нМ], определяемую на клетках, экспрессирующих MHC, предпочтительно HLA-A*02, предпочтительно нагруженных антигенным пептидом SEQ ID NO: 1. В одном примере, упомянутое значение EC_{50} определяют, как правило, с помощью ИФА, например, после совместного культивирования электропорированных CD8⁺ Т-клеток с T2 клетками, нагруженными серийными разведениями антигенного пептида MAGE-A, предпочтительно антигенного пептида MAGE-A с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно референтный белок имеет тот же формат, что и антигенсвязывающий белок, с которым он сравнивается, и референтный белок включает CDR или переменные домены альфа и бета родительского TCR R7P1D5, при этом значение EC_{50} предпочтительно было определено в тех же экспериментальных условиях.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок имеет значение EC_{50} , предпочтительно определенное с помощью анализа высвобождения IFN-гамма или анализа высвобождения LDH, для клеток, презентующих комплекс MAGE-A/MHC, которое составляет менее 100 нМ, менее 50 нМ, менее 10 нМ, менее 900 пМ, менее 500 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 150 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 20 пМ, менее 10 пМ, например от 0,1 нМ до 20 нМ, например от 0,5 нМ до 15 нМ, от 0,8 нМ до 12 нМ, от 0,8 нМ до 10 нМ, от 0,8 нМ до 10 нМ или, например от 1 пМ до 150 пМ, от 1 до 100 пМ, от 1 до 50 пМ, от 1 до 20 пМ, от 1 до 20 пМ.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой TCR и имеет значение EC_{50} , предпочтительно определенное с помощью анализа высвобождения IFN-гамма, для клеток, презентующих комплекс MAGE-A/MHC, которое составляет менее 12 нМ, менее 10 нМ, менее 9 нМ, менее 8 нМ, менее 6 нМ, менее 4 нМ, например от 0,1 нМ до 20 нМ, например от 0,5 нМ до 15 нМ, от 0,8 нМ до 12 нМ, от 0,8 нМ до 10 нМ, от 0,8 нМ до 10 нМ, от 0,8 нМ до 10 нМ.

В данном варианте осуществления значение EC_{50} определяют с использованием CD8+ Т-клеток (20 000 клеток/лунка), экспрессирующих различные антигенсвязывающие белки по изобретению, и путем определения уровней высвобождаемого IFN-gamma при совместном культивировании с T2-клетками (20 000 клеток/лунка), нагруженными серией разведений MAG-003 (SEQ ID NO: 1).

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой растворимую молекулу, такую как TCER™, и имеет значение EC_{50} для клеток, представляющих комплекс MAGE-A/MHC, которое составляет менее 200 пМ, менее 150 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 20 пМ, менее 10 пМ, от 1 пМ до 150 пМ, от 1 до 100 пМ, от 1 до 50 пМ, от 1 до 20 пМ, от 1 до 20 пМ. В данном варианте осуществления EC_{50} определяют с использованием CD8+ Т-клеток (20 000 клеток/лунка), экспрессирующих различные антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению, и путем определения уровней высвобожденного LDH при совместном культивировании с линиями опухолевых клеток, представляющими MAG-003 на эндогенных уровнях, предпочтительно клеточной линией является Hs695T, которая представляет на своей поверхности около 1071 пептидов MAG-003 в комплексе с белком MHC, предпочтительно клеточной линией является NCI-H1755, которая представляет на своей поверхности около 3918 из пептидов MAG-003 в комплексе с белком MHC, или предпочтительно клеточной линией является U2OS, которая представляет на своей поверхности около 125 пептидов MAG-003 в комплексе с белком MHC.

Антигенсвязывающие белки настоящего изобретения имеют высокий профиль безопасности.

«Профиль безопасности» в настоящем документе относится к способности отличать опухолевые клетки от клеток здоровой ткани, и это часто определяется путем определения окна безопасности.

Под «окном безопасности» или «терапевтическим окном» в настоящем документе понимается фактор, который сравнивает полумаксимальную концентрацию соединения, необходимую для индукции 100 % цитотоксичности в линии опухолевых клеток, с полумаксимальной концентрацией соединения, необходимой для индукции 100 % цитотоксичности для клеток здоровой ткани. Если для представляющего интерес антигенсвязывающего белка значение EC_{50} , определенное для линии опухолевых клеток, составляет 1 пМ, а значение EC_{50} , определенное, например, для первичных клеток, составляет 1000 пМ, тогда окно безопасности равно 1000, так как EC_{50} для линии опухолевых клеток в 1000 раз меньше, чем EC_{50} для первичных клеток.

В одном варианте осуществления EC_{50} антигенсвязывающего белка для клеток, представляющих комплекс MAGE-A/MHC, что на ≥ 100 , ≥ 500 , ≥ 1000 , ≥ 2000 , ≥ 3000 , $\geq$

4000, ≥ 5000 , ≥ 6000 , ≥ 8000 , ≥ 10000 превышает значение EC50 для здоровых клеток, например, значение EC50 для клеток, представляющих комплекс MAGE-A/MHC, выше, чем значение EC₅₀ для здоровых клеток на значения в от 500 до 12000 раз, предпочтительно от 1000 до 10000 раз.

5 Под «клетками, представляющими комплекс MAGE-A/MHC» здесь понимается клетка, которая представляет на своей поверхности комплекс пептида MAGE-A/MHC, при этом число копий указанного комплекса MAGE-A/MHC обычно можно определить известными в данной области методами. В одном варианте осуществления комплекс MAGE-A/MHC представляет собой клетку-мишень, например раковую клетку, где рак
10 является таким, как определено ниже в разделе «Терапевтические методы и способы применения». В контексте настоящего изобретения комплекс пептида MAGE-A/MHC чрезмерно представлен на поверхности клеток, представляющих комплекс MAGE-A/MHC, в частности раковой клетки, по сравнению с уровнями указанного комплекса на поверхности клеток нормальных (здоровых) тканей. Под «чрезмерно представленным»
15 подразумевается, что комплекс MAGE-A/MHC присутствует на уровне, по меньшей мере в 1,2 раза превышающем уровень представления в здоровой ткани; предпочтительно, по меньшей мере в 2 раза и более предпочтительно в 5-10 раз превышающем уровень представления в здоровой ткани или клетках.

В одном варианте осуществления клетка, представляющая комплекс MAGE-A/MHC, имеет число копий комплекса MAGE-A/MHC более 50, более 80, более 100,
20 более 120, более 150, более 300, более 400, более 600, более 800, более 1000, более 1500, более 2000, предпочтительно число копий MAGE-A/MHC от 50 до 2000, например, от 80 до 2000, например, от 100 до 2000, например, от 120 до 2000.

«Число копий» в настоящем документе относится к числу комплексов MAGE-A/MHC, как определено в контексте настоящего изобретения, которые присутствуют на
25 поверхности клетки, такой как MAGE-A/MHC-презентирующая клетка, например раковая клетка или здоровая клетка. Число копий белка может быть определено различными известными из уровня техники методами, включая FACS-анализ больных клеток с флуоресцентно мечеными антигенсвязывающими белками.

30 Понятие «здоровые клетки» в данном случае относится к клеткам, которые не являются раковыми клетками, здоровые клетки в настоящем документе относятся предпочтительно к клеткам ткани, окружающей клетки, представляющим MAGE-A/MHC, к клеткам ткани, окружающей раковые клетки, представляющим комплекс MAGE-A/MHC. Однако в некоторых случаях и здоровые клетки могут экспрессировать и представлять
35 на своей поверхности комплекс MAGE-A/MHC. Как правило, в здоровых клетках в контексте настоящего изобретения, как будет понятно специалистам в данной области,

комплекс MAGE-A/MHC присутствует в меньшем количестве (числе копий), чем в раковой клетке.

Здоровые клетки предпочтительно выбирают из группы, состоящей из астроцитов, ГАМК-нейронов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток микрососудов сердца, хондроцитов, эндотелиальных клеток коронарной артерии, эндотелиальных клеток микрососудов дермы, мезенхимальных стволовых клеток, эпителиальных клеток носа, мононуклеарных клеток периферической крови, гладкомышечных клеток легочной артерии, предпочтительно ГАМК-нейронов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток микрососудов сердца, хондроцитов, эндотелиальных клеток коронарной артерии, эпителиальных клеток носа, мононуклеарных клеток периферической крови, гладкомышечных клеток легочной артерии.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок имеет значение EC₅₀ для клеток, представляющих комплекс MAGE-A/MHC, которое ≥ 1000 , ≥ 15000 , ≥ 9000 раз превышает значение EC₅₀ для здоровых клеток, предпочтительно здоровых клеток, выбранных из группы, состоящей из астроцитов, ГАМК-нейронов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток микрососудов сердца, хондроцитов, эндотелиальных клеток коронарной артерии, эндотелиальных клеток микрососудов дермы, мезенхимальных стволовых клеток, эпителиальных клеток носа, мононуклеарных клеток периферической крови, легочных фибробластов, гладкомышечных клеток трахеи, эпидермальных кератиноцитов, эпителиальных клеток коры почек и гладкомышечных клеток легочной артерии, предпочтительно астроцитов, ГАМК-нейронов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток микрососудов сердца, хондроцитов, эндотелиальных клеток коронарной артерии, эндотелиальных клеток микрососудов дермы, мезенхимальных стволовых клеток, эпителиальных клеток носа, мононуклеарных клеток периферической крови и гладкомышечных клеток легочной артерии, более предпочтительно из ГАМК-нейронов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток микрососудов сердца, хондроцитов, эндотелиальных клеток коронарной артерии, эпителиальных клеток носа, мононуклеарных клеток периферической крови, гладкомышечных клеток легочной артерии.

В одном предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок имеет значение EC₅₀ для клеток, представляющих комплекс MAGE-A/MHC, которое ≥ 9000 или ≥ 10000 раз превышает значение EC₅₀ для здоровых клеток, где здоровые клетки предпочтительно выбраны из группы, состоящей из iPSC-производных астроцитов, ГАМК-ергических вставочных нейронов, iPSC-производных кардиомиоцитов, остеобластов, легочных фибробластов, гладкомышечных клеток трахеи, эпидермальных кератиноцитов и эпителиальных клеток коры почек.

Соответственно, в одном варианте осуществления здоровые клетки имеют число копий комплекса MAGE-A/MHC менее 50, менее 20, менее 10, предпочтительно менее 10 копий комплекса MAGE-A/MHC, более предпочтительно число копий комплекса MAGE-A/MHC от 0 до 10.

5 В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок имеет значение EC50 для клеток, представляющих комплекс MAGE-A/MHC, которое на ≥ 100 , ≥ 500 , ≥ 1000 , ≥ 2000 , ≥ 3000 , ≥ 4000 , ≥ 5000 , ≥ 6000 выше, чем значение EC50 для подобных клеток, представляющих пептид/MHC, например, ЕС 50 для клеток, представляющих комплекс MAGE-A/MHC, на 500-12000, предпочтительно на 1000-12000 выше чем значение ЕС 50 для подобных клеток, представляющих пептид/MHC.

Определение «подобного пептида» дано в настоящем документе выше.

Таким образом, клетка, представляющая подобный пептид/MHC – это клетка, которая представляет на своей клеточной поверхности комплекс подобного пептида/MHC. В одном варианте осуществления клетки, представляющие подобный пептид/MHC, имеют число копий подобного пептида/MHC более 10, более 20, более 40, более 50, более 80, более 100, более 120, более 150, более 300, более 400, более 500, более 800, предпочтительно число копий подобного пептида/MHC от 50 до 1000, например от 50 до 8000, например от 50 до 500, например от 100 до 500.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, которые способны вызывать регрессию опухоли *in vivo*, конкретнее, полную регрессию в испытанных условиях. Антигенсвязывающие белки были получены и оценены в различных дозах против ксенотрансплантатов измеряемой опухоли HS695T, имплантированных самкам мышей NOG, привитых человеческими МКПК (см. пример 7). TCER™, нацеленный на MAG-003 (SEQ ID NO: 127 и 130, группа 3; SEQ ID NO: 135 и 136, группа 4) вызывал полную ремиссию опухоли Hs695T у всех мышей начиная с 18-го дня и до конца 25-дневного исследования по сравнению с исходными уровнями 86 мм³ (группа 3) и 80 мм³ (группа 4) в день рандомизации.

Соответственно, в одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок настоящего изобретения ингибирует или уменьшает рост опухоли, более конкретно, антигенсвязывающий белок настоящего изобретения уменьшает средний объем опухоли более чем на 80 %, более чем на 85 %, более чем на 90 %, более чем на 92, более чем на 94, более чем на 96, более чем на 98, более чем на 99 %, например на 95 %–100 %, 96 %–100 %, 98 %–100 %, например на 98 %, 99 % или 100 %, предпочтительно на 100 %, при этом указанная опухоль представляет собой рак, как определено ниже в разделе «Терапевтические методы и способы применения». В одном примере антигенсвязывающий белок вызывает полную ремиссию раковой опухоли, где

рак является таким, как определено в настоящем документе ниже, например, человеческая опухолевая клеточная линия HS695T.

В одном варианте осуществления период полувыведения ($T_{1/2}$) антигенсвязывающего белка по изобретению составляет от 6 до 7 дней, например 6 или 7 дней.

Как видно из примеров, в частности из примера 1 и Фигуры 1, нативные TCR, такие как нативный TCR R7P1D5, не могут быть экспрессированы в растворимом формате ни в дрожжах, ни в клетках CHO. В противоположность этому, антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению, в частности молекулы TCER™, предпочтительно описанные в настоящем документе предпочтительные молекулы TCER™, не только растворимы, но также могут экспрессироваться в клетках CHO в виде транзитной экспрессии в количествах > 10 мг/л (клеточная культура), > 20 мг/л или даже 40 мг/л. Соответственно, в одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению может быть экспрессирован в клетке-хозяине с высокими выходами, где предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку CHO и где предпочтительно выход составляет более 10, более 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45 мг/л (клеточная культура), например от 5 до 50, от 5 до 45, от 5 до 40, от 5 до 35, от 10 до 35, от 10 до 30, от 10 до 25, от 10 до 20 мг/л (клеточная культура). В одном примере антигенсвязывающий белок был экспрессирован в транзитно трансфицированных клетках CHO-S, где клетки культивировали при T=0 с плотностью 4×10^6 /мл при 37°C в среде GE Healthcare™ в общем объеме 320 мл. Через один день добавляли питательный раствор (CellBoost 7a и b) и снижали температуру до 32°C. Клетки и, таким образом, антигенсвязывающий белок собирали по истечении общего времени культивирования 12 дней и трех подпиток в итоге.

Как видно из примеров далее, авторы изобретения продемонстрировали, например в примерах 4 и 5, что антигенсвязывающие белки по изобретению обладают повышенной стабильностью по сравнению с референтным белком, например, по сравнению с антигенсвязывающим белком, включающим CDR нативного TCR R7P1D5 и предпочтительно каркасные области указанного нативного TCR R7P1D5.

Соответственно, в одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по изобретению обладают повышенной стабильностью, необязательно по сравнению с референтным белком. В контексте настоящего изобретения улучшенная стабильность относится, например, к повышенной физической стабильности в условиях теплового стресса. Таким образом, недавно разработанные антигенсвязывающие белки по изобретению могут лучше выдерживать стрессовые условия, особенно тепловой стресс, чем референтный антигенсвязывающий белок.

Понятие «стабильность» в контексте настоящего изобретения относится к физической стабильности, которая может быть оценена качественно и/или количественно с помощью различных аналитических методов, которые описаны в данной области техники и рассмотрены, например, в публикациях Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc, New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). В контексте настоящего изобретения эти методы относятся, в частности, к оценке формирования агрегатов (например, с помощью эксклюзионной хроматографии, путем измерения мутности и/или визуального осмотра). Для измерения стабильности образец, включающий антигенсвязывающий белок по изобретению, может быть протестирован в исследовании стабильности, в котором образец подвергается в течение выбранного периода времени воздействию стрессовых условий с последующим количественным и, факультативно, качественным анализом показателей химической и физической стабильности с использованием адекватной аналитической методики.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по изобретению являются физически стабильными, например при воздействии стрессовых условий в течение определенного периода времени, например при воздействии в течение, например, 14 дней температуры 40°C.

«Физическая стабильность» в контексте настоящего изобретения в основном относится к антигенсвязывающему белку, не имеющему признаков агрегации, преципитации и/или денатурации.

Методами определения физической стабильности являются, например, эксклюзионная хроматография (ЭХ), метод динамического рассеяния света (DLS), метод светоблокировки (LO), и например, метод визуального осмотра для определения цвета и прозрачности.

«Отсутствие признаков агрегации» означает, например, что в образце, включающем антигенсвязывающий белок, после воздействия стрессовых условий, например температуры 40°C в течение 14 дней в буфере, таком как PBS, содержание мономеров составляет более 80 %, более 86 %, более 88 %, более 90 %, более 92 %, более 94 %, более 96 %, более 97 %, более 98 %, более 99 %, например содержание мономеров составляет от 94 % до 99 %, от 95 % до 99 %, от 96 % до 99 %, от 97 % до 99 % при измерении методом ЭХ, например ЭХ-ВЭЖХ, в буфере, например PBS.

Соответственно, в одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки настоящего изобретения характеризуются пониженной агрегацией при воздействии стрессового состояния по сравнению, например, с референтным белком.

Для эксклюзионной хроматографии (ЭХ) разница в 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, предпочтительно в 1 % или 2 %, например 2 %, содержания мономера считается значимо отличающейся в контексте изобретения в испытанных условиях в зависимости от используемой колонки, рабочего давления и скорости буфера.

- 5 Это означает, что когда референтный антигенсвязывающий белок имеет содержание мономера 96 %, а антигенсвязывающий белок по изобретению имеет содержание мономера 97 %, содержание мономера в антигенсвязывающем белке по изобретению значимо отличается и, таким образом, значимо увеличено по сравнению с референтным антигенсвязывающим белком при измерении в тех же условиях.
- 10 В одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению обладают пониженной агрегацией при воздействии стрессового состояния, в частности антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению имеют агрегацию менее 10 %, менее 4 %, менее 3 %, менее 2 %, когда агрегаты, индуцированные стрессом, измеряются до и после воздействия указанного стрессового
- 15 условия.

Нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева

- Еще один объект изобретения относится к изолированной последовательности нуклеиновой кислоты, включающей или состоящей из последовательности, кодирующей
- 20 антигенсвязывающий белок по изобретению, как определено в настоящем документе выше.

Как правило, указанная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК или РНК, которая может быть включена в любой подходящий вектор, такой как плаزمид, космид, эписома, искусственная хромосома, фаг или вирусный вектор.

- 25 Термины «вектор», «клонированный вектор» и «вектор экспрессии» означают носитель, с помощью которого последовательность ДНК или РНК (например, чужеродный ген) может быть введена в клетку-хозяина, чтобы трансформировать хозяина и способствовать экспрессии введенной последовательности (например, транскрипции и трансляции).

- 30 Таким образом, еще один объект изобретения относится к вектору, включающему нуклеиновую кислоту по изобретению.

- Такие векторы могут включать регуляторные элементы, такие как промотор, энхансер, терминатор и тому подобное, чтобы вызвать или направить экспрессию указанного полипептида при введении субъекту. Примеры промоторов и энхансеров,
- 35 используемых в векторе экспрессии для клеток животных, включают ранний промотор и энхансер SV40 (Mizukami T. et al. 1987), промотор и энхансер LTR вируса лейкоза мышей

Молони (Kuwana Y et al. 1987), промотор (Mason JO et al. 1985) и энхансер (Gillies SD et al. 1983) тяжелой цепи иммуноглобулина и тому подобное.

Можно использовать любой вектор экспрессии для клетки животного при условии, что ген, кодирующий константную область человеческого антитела, может быть встроен и экспрессирован. Примеры подходящих векторов включают pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4 (Miyaji H et al. 1990) и тому подобное. Другие примеры плазмид включают реплицирующиеся плазмиды, включающие точки начала репликации, или интегративные плазмиды, такие как например pUC, pcDNA, pBR и подобные.

Другие примеры вирусных векторов включают аденовирусные, ретровирусные, герпесвирусные и AAV векторы. Такие рекомбинантные вирусы могут быть получены методами, известными в данной области, например, путем трансфекции упаковочных клеток или путем транзитной трансфекции вспомогательными плазмидами или вирусами. Типичные примеры клеток для упаковки вирусов включают клетки PA317, PsiCRIP, GPenv+, 293 и так далее. Подробные протоколы получения таких дефектных по репликации рекомбинантных вирусов можно найти, например, в заявках WO95/14785, WO96/22378, патентах США №№ 5 882 877, 6 013 516, 4 861 719, 5 278 056 и заявке WO94/19478.

Понятие «вирусный вектор» относится к векторной конструкции нуклеиновой кислоты, которая включает по меньшей мере один элемент вирусного происхождения, обладает способностью упаковываться в вирусную векторную частицу и кодирует по меньшей мере экзогенную нуклеиновую кислоту. Вектор и/или частица могут быть использованы для переноса любых нуклеиновых кислот в клетки *in vitro* или *in vivo*. В данной области известны многочисленные формы вирусных векторов.

Понятие «вирион» используется для обозначения одной инфекционной вирусной частицы. «Вирусный вектор», «вирусная векторная частица» и «вирусная частица» также относятся к полной вирусной частице с ее ДНК или РНК ядром и белковой оболочкой в том виде, в котором она существует вне клетки. Например, вирусный вектор может быть выбран из аденовирусов, поксвирусов, альфавирусов, аренавирусов, флавивирусов, рабдовирусов, ретровирусов, лентивирусов, герпесвирусов, парамиксовирусов или пикорнавирусов.

Вирусы могут относиться как к вирусам природного происхождения, так и к искусственным вирусам. Вирусы в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения могут представлять собой оболочечные или безоболочечные вирусы. Парвовирусы (такие как AAV) являются примерами безоболочечных вирусов. В предпочтительном варианте осуществления вирусы могут

5 быть оболочечными вирусами. В предпочтительных вариантах осуществления вирусы могут быть ретровирусами и, в частности, лентивирусами. Белки оболочки вирусов, которые могут способствовать вирусной инфекции эукариотических клеток, могут включать полученные из ВИЧ-1 лентивирусные векторы (LV), псевдотипированные гликопротеинами (GP) оболочки вируса везикулярного стоматита (VSV-G),
 10 модифицированного эндогенного кошачьего ретровируса (RD114TR) и модифицированного вируса лейкоза гиббона (GALVTR). Эти белки оболочки могут эффективно способствовать проникновению других вирусов, таких как парвовирусы, включая адено-ассоциированные вирусы (AAV), демонстрируя тем самым свою
 15 широкую эффективность. Например, могут быть использованы другие белки вирусной оболочки, включая env MLV 4070 вируса мышинного лейкоза Молони (например, описанного в публикации Merten et al., J. Virol. 79: 834-840, 2005; содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), RD114 env, химерный белок оболочки RD114pro или RDpro (который представляет собой химеру RD114-HIV, которая
 20 была сконструирована путем замены последовательности расщепления R-пептида RD114 последовательностью расщепления матрицы/капсида ВИЧ-1 (MA/CA), например, как описано в публикации Bell et al. Experimental Biology and Medicine 2010; 235: 1269–1276; содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), GP64 env бакуловируса (например, как описано в публикации Wang et al. J. Virol.
 25 81: 10869-10878, 2007; содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки) или GALV env (например, как описано в публикации Merten et al., J. Virol. 79: 834-840, 2005; содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), или их производные.

25 Еще один объект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, которая была трансформирована, трансдуцирована или трансфицирована нуклеиновой кислотой и/или вектором в соответствии с изобретением.

30 Понятие «трансформация» изначально относится к естественно происходящему процессу переноса генов в клетку-хозяина, который включает в себя поглощение генетического материала, такого как нуклеиновые кислоты, например ДНК или РНК, клеткой через клеточную мембрану, в результате чего клетка-хозяин экспрессирует введенный ген или последовательность для производства желаемого вещества, обычно белка или фермента, кодируемого введенным геном или последовательностью. Существует два типа трансформации: естественная трансформация и искусственная или индуцированная трансформация. Искусственный или индуцированный метод
 35 трансформации осуществляется в лабораторных условиях и обычно называется трансфекцией.

Клетка-хозяин, которая получает и экспрессирует чужеродные нуклеиновые кислоты, такие как ДНК или РНК, в процессе трансформации, является «трансформированной».

5 Понятие «трансфекция» относится к способу переноса генов, включающему создание пор на клеточной мембране клетки-хозяина, что позволяет клетке-хозяину принять чужеродный генетический материал. Обычно трансфекция относится к трансформации эукариотических клеток, таких как клетки насекомых или млекопитающих. Химическая трансфекция включает использование, например, фосфата кальция, катионных полимеров или липосом. Нехимические методы трансфекции обычно включают электропорацию, сонопорацию, импалефекцию, оптическую трансфекцию или гидродинамическую доставку. Трансфекция на основе частиц использует метод генной пушки, когда наночастица является средством переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, или используется другой метод, называемый магнитофекцией. Нуклеофекция и использование теплового шока являются другими развитыми успешными методами трансфекции. Клетка-хозяин, получившая чужеродные нуклеиновые кислоты с помощью метода трансфекции, является «трансфицированной».

Понятие «трансдукция» обычно понимается как перенос чужеродных нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК, в клетку с помощью вируса или вирусного вектора. Клетка-хозяин, которая получает и экспрессирует чужеродные нуклеиновые кислоты, такие как ДНК или РНК, с помощью вируса или вирусного вектора, является «трансдуцированной».

В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть трансдуцированы с использованием методов, описанных в заявке США 20190216852, содержание которой во всей его полноте включено в настоящий документ посредством ссылки.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть использованы для получения рекомбинантного антигенсвязывающего белка по изобретению в подходящей системе экспрессии.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть использованы для получения рекомбинантного антигенсвязывающего белка по изобретению в подходящей системе экспрессии.

Понятие «система экспрессии» означает клетку-хозяина и совместимый вектор в подходящих условиях, например для экспрессии белка, кодируемого чужеродной ДНК, переносимой вектором и введенной в клетку-хозяина.

35 Обычные системы экспрессии включают клетки-хозяева и плазмидные векторы *E. coli*, клетки-хозяева насекомых и бакуловирусные векторы, клетки-хозяева и векторы млекопитающих. Другие примеры клеток-хозяев включают, среди прочего,

прокариотические клетки (такие как бактерии) и эукариотические клетки (такие как клетки дрожжей, клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений и так далее). Конкретные примеры включают *E. coli*, дрожжи *Kluuyveromyces* или *Saccharomyces*, линии клеток млекопитающих (например, клетки Vero, CHO, 3T3, COS и так далее), а также первичные или перевиваемые культуры клеток млекопитающих (например, полученные из лимфобластов, фибробластов, эмбриональных клеток, эпителиальных клеток, нервных клеток, адипоцитов и так далее). Примеры также включают клетки мыши SP2/0-Ag14 (ATCC CRL1581), клетки мыши P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL1580), клетки CHO, в которых ген дигидрофолатредуктазы (далее «ген DHFR») (Urlaub G et al; 1980) является дефектным, клетки крысы YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL1662, далее «клетка YB2/0») и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления, клетка YB2/0 может быть предпочтительной, поскольку активность ADCC химерных или гуманизированных антител усиливается при экспрессии в этой клетке.

Изобретение также относится к клетке-хозяину, включающей антигенраспознающую структуру в соответствии с настоящим изобретением. В частности, клетка-хозяин по изобретению включает нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в настоящем документе выше. Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, например растительной, животной, грибковой или водорослевой или может быть прокариотической клеткой, например бактерией или простейшим. Клетка-хозяин может быть культивированной клеткой или первичной клеткой, то есть выделенной непосредственно из организма, например человека. Клетка-хозяин может быть адгезивной клеткой или суспензионной клеткой, то есть клеткой, растущей в суспензии. Для целей получения антигенсвязывающего белка, такого как рекомбинантный TCR, полипептид или белок, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку млекопитающего. Наиболее предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку человека. Хотя клетка-хозяин может относиться к любому типу клеток, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой лейкоцит периферической крови (PBL) или моноклеарную клетку периферической крови (МКПК). Более предпочтительно клетка-хозяин представляет собой Т-клетку. Т-клетка может быть любой Т-клеткой, например, культивированной Т-клеткой, например первичной Т-клеткой или Т-клеткой из культивированной линии Т-клеток, например Jurkat, SupT1 и так далее, или Т-клеткой, полученной от млекопитающего, предпочтительно Т-клеткой или предшественником Т-клетки от человека-пациента. Если Т-клетки получены от млекопитающего, они могут быть получены из многочисленных источников, включая кровь, костный мозг, лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости, но не

ограничиваясь ими. Т-клетки также могут быть обогащены или очищены. Т-клетка предпочтительно представляет собой человеческую Т-клетку. Более предпочтительно, Т-клетка представляет собой Т-клетку, выделенную из человека. Т-клетка может быть любым типом Т-клетки и может быть любой стадии развития, включая, без ограничений, CD4-положительные и/или CD8-положительные, CD4-положительные хелперные Т-клетки, например Th1 и Th2 клетки, CD8-положительные Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), опухолевые инфильтрирующие клетки (TILs), Т-клетки памяти, наивные Т-клетки и тому подобное. Предпочтительно Т-клетка представляет собой CD8-положительную Т-клетку или CD4-положительную Т-клетку. Клетка-хозяин предпочтительно является опухолереактивной Т-клеткой, специфичной к MAGEA4 и/или MAGEA8-экспрессирующим опухолевым клеткам.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления изобретение относится к клетке-хозяину, включающей антигенсвязывающий белок по изобретению, который определен в настоящем документе выше, или нуклеиновую кислоту, или вектор по изобретению, где указанная клетка-хозяин предпочтительно представляет собой а) лимфоцит, такой как Т-лимфоцит или клетка-предшественник Т-лимфоцита, например CD4- или CD8-положительная Т-клетка, или б) клетку для рекомбинантной экспрессии, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO).

В частности, для экспрессии некоторых антигенсвязывающих белков по изобретению вектор экспрессии может быть либо такого типа, в котором ген, кодирующий первый полипептид, такой как тяжелая цепь или альфа-цепь антитела, и ген, кодирующий второй полипептид, такой как легкая цепь или бета-цепь антитела, существуют в отдельных векторах, либо такого типа, в котором оба гена существуют в одном векторе (тандемный тип). В отношении легкости конструирования вектора экспрессии антигенсвязывающего белка, легкости введения в клетки животных и баланса между уровнями экспрессии Н- и L-цепей антител в клетках животных предпочтительным является вектор экспрессии гуманизированных антител тандемного типа (Shitara K et al. al. J Immunol Methods. 1994 Jan. 3; 167(1-2):271-8). Примеры вектора экспрессии гуманизированных антител тандемного типа включают pKANTEX93 (заявка WO 97/10354), pEE18 и тому подобное.

В одном варианте осуществления такие рекомбинантные клетки-хозяева могут быть использованы для производства по меньшей мере одного антигенсвязывающего белка по изобретению.

Способы получения антигенсвязывающих белков по изобретению

Настоящее изобретение также относится к способу получения антигенсвязывающего белка, как определено выше в настоящем документе, который включает

- а. предоставление подходящей клетки-хозяина,
- б. обеспечение генетической конструкции, включающей кодирующую последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок по изобретению,
- в. введение указанной генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяина, и
- г. экспрессию указанной генетической конструкции в указанной подходящей клетке-хозяине, и, факультативно,
- д. отбор клеток, которые экспрессируют и/или секретируют указанное антитело.

10 Антисгенсвязывающий белок по изобретению соответствует определению, приведенному выше в соответствующем разделе.

«Генетическая конструкция» в настоящем документе обозначает нуклеиновые кислоты, которые позволяют экспрессировать кодирующую область в хозяине, и, таким образом, относится к нуклеиновым кислотам, таким как векторы, описанные в настоящем документе выше, или РНК.

В одном варианте осуществления способ может дополнительно включать этап презентации указанной антигенраспознающей структуры на клеточной поверхности указанной подходящей клетки-хозяина.

В других предпочтительных вариантах осуществления генетическая конструкция по пункту б) включает нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающие белки изобретения. Такие нуклеиновые кислоты определены в настоящем документе выше в разделе «Нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева».

В сходном варианте осуществления генетическая конструкция представляет собой экспрессионную конструкцию, включающую промоторную последовательность, функционально связанную с указанной кодирующей последовательностью.

В сходном варианте осуществления генетические конструкции вводят подходящему хозяину с помощью трансформации, трансдукции или трансфекции. Трансформация, трансдукция или трансфекция определены в приведенном выше разделе настоящего документа.

Желательно, чтобы система трансфекции для введения генетической конструкции в упомянутую соответствующую клетку-хозяина представляла собой ретровирусную или лентивирусную векторную систему, как описано выше в разделе «Нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева». Такие системы хорошо известны квалифицированному специалисту.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает выделение и очистку антигенсвязывающего белка из клетки-хозяина и, факультативно, восстановление антигенсвязывающего белка в Т-клетке.

Антигенсвязывающий белок по изобретению может быть получен любой методикой, известной в данной области, такой как, без ограничения, любая химическая, биологическая, генетическая или ферментативная методика, взятая отдельно или в комбинации.

5 В некоторых конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки имеют антитело или иммуноглобулиноподобный каркас.

Стандартные методики получения полипептидов, таких как антитела или их фрагменты и TCR или их фрагменты, известны в данной области техники, и эти методики могут быть перенесены специалистами в данной области на
10 антигенсвязывающие белки настоящего изобретения. Например, они могут быть синтезированы известным твердофазным методом, в частности, с использованием коммерчески доступного аппарата для синтеза пептидов (например, производства компании Applied Biosystems, Фостер-Сити, шт. Калифорния, США) и в соответствии с инструкциями производителя. Альтернативно, антигенсвязывающие белки по
15 изобретению, такие как антитела или их фрагменты и TCR или их фрагменты, могут быть синтезированы методиками рекомбинантной ДНК, известными в данной области. Например, фрагменты могут быть получены как продукты экспрессии ДНК после внедрения последовательностей ДНК, кодирующих желаемый (поли)пептид, в векторы экспрессии и введения таких векторов в подходящих эукариотических или
20 прокариотических хозяев, которые будут экспрессировать желаемый полипептид, из которых они могут быть впоследствии выделены с использованием известных методик.

В одном примере, то есть в случае биспецифических молекул TCER™, ДНК-последовательности, кодирующие различные комбинации VH и VL и переменных альфа (Vальфа) и переменных бета (Vбета), а также последовательности,
25 кодирующие линкеры, могут быть получены, например, методом генного синтеза. Полученные последовательности ДНК могут быть клонированы в рамке считывания в векторы экспрессии, кодирующие шарнирную область, домены C_{H2} и C_{H3}, полученные, например, из человеческого IgG4 [регистрационный номер: K01316] и IgG1 регистрационный номер: P01857], соответственно, и могут быть подвергнуты
30 дальнейшему конструированию. Конструирование может быть проведено для включения мутаций типа выступ-во-впадину в C_{H3}-домены с дополнительной стабилизацией межцепочечной дисульфидной связью и без нее; для удаления сайта N-гликозилирования в C_{H2} (например, мутации N297Q); для введения молчащих мутаций гена F_c или для введения, с целью дополнительной стабилизации, дисульфидной связи
35 в VL и VH, соответственно, в соответствии с методами, описанными Reiter et al. (Stabilization of the Fv Fragments in Recombinant Immunotoxins by Disulfide Bonds

Engineered into Conserved Framework Regions. *Biochemistry*, 1994, 33, 5451 – 5459); для введения мутаций, повышающих стабильность или технологичность.

Антигенсвязывающие белки по изобретению целесообразно выделять из культуральной среды с помощью процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, хроматография на белке А-сефарозе, белке L-сефарозе, белке G-сефарозе, гидроксилапатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

В одном варианте осуществления восстановление экспрессированных антигенсвязывающих белков или полипептидов относится к проведению хроматографии на белке А, хроматографии на белке L, хроматографии на смоле Kappaselect и/или эксклюзионной хроматографии, предпочтительно хроматографии на белке L и/или эксклюзионной хроматографии, более предпочтительно хроматографии на белке L и эксклюзионной хроматографии.

Способы получения антигенсвязывающих белков по изобретению с использованием рекомбинантных ДНК и методов трансфекции генов хорошо известны в данной области (см. Morrison SL. et al. (1984) и патентные документы США №№ 5 202 238 и 5 204 244).

Кроме того, способы получения гуманизированных антител на основе общепринятых методик рекомбинантной ДНК и трансфекции генов хорошо известны в данной области (см., например, Riechmann L. et al. 1988; Neuberger MS. et al. 1985), и их можно легко применить для получения антигенсвязывающих белков по изобретению.

В одном примере векторы для экспрессии рекомбинантных антигенсвязывающих белков по изобретению были сконструированы как моноцистронные, например под контролем HCMV-производных промоторных элементов, рUC19-производных. Плазмидную ДНК амплифицировали, например, в *E.coli* в соответствии со стандартными методиками культивирования и впоследствии очищали с помощью имеющихся в продаже наборов (Macherey & Nagel). Очищенную плазмидную ДНК использовали для транзитной трансфекции, например, клеток CHO-S в соответствии с инструкциями производителя (система ExpiCHO™; Thermo Fisher Scientific) или с помощью систем электропорации (MaxCyte STX). Трансфицированные CHO-клетки культивировали, например, в течение 6–14 дней при температуре, например, 32 °C – 37 °C, с добавлением подпитки ExpiCHO™ Feed или Cellboost 7a и 7b (GE Healthcare™) от одного до двух раз.

Супернатант кондиционированных клеток осветляли, например, путем фильтрации (0,22 мкм), с использованием, например, набора Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid (Sartorius). Биспецифические антигенсвязывающие белки очищали, используя, например, систему FPLC Äkta Pure 25 L (GE Lifesciences), оборудованную для последовательного проведения аффинной и эксклюзионной хроматографии на одной

линии. Аффинная хроматография проводилась, например, на колонках с белком А или L (GE Lifesciences) в соответствии со стандартными протоколами аффинной хроматографии. Например, эксклюзионную хроматографию проводили непосредственно после элюции (рН 2,8) с аффинной колонки для получения высокочистого мономерного белка, с использованием, например, колонки Superdex 200 pg 16/600 (GE Lifesciences) в соответствии со стандартными протоколами. Концентрацию белка определяли, например, на системе NanoDrop (Thermo Scientific) с использованием рассчитанных коэффициентов экстинкции в соответствии с предсказанными последовательностями белков. При необходимости концентрацию корректировали с помощью приборов Vivaspin (Sartorius). Наконец, очищенные молекулы хранили, например, в фосфатно-солевом буферном растворе с концентрацией около 1 мг/мл при температуре 2-8°C.

Качество очищенных биспецифических антигенсвязывающих белков определяли, например, с помощью ВЭЖХ-ЭХ на колонках MabPac SEC-1 (5 мкм, 4x300 мм), работающих, например, в 50 mM натрий-фосфатном растворе с рН 6,8, содержащем 300 mM NaCl, в системе УВЭЖХ Vanquish.

В одном конкретном варианте осуществления Т-клетка, как определено выше, обеспечивается на стадии а) и антигенсвязывающий белок представляет собой TCR или его фрагмент. Соответственно, антигенсвязывающий белок экспрессируется на клеточной поверхности Т-клетки. Таким образом, этот способ позволяет получить Т-клетку, экспрессирующую на своей поверхности антигенсвязывающий белок, такой как TCR, который специфичен к раковым клеткам, как определено в контексте изобретения.

Фармацевтические композиции

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, включающей антигенсвязывающий белок по изобретению, нуклеиновые кислоты по изобретению, вектор по изобретению или клетку-хозяина по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение также относится к антигенсвязывающему белку согласно данному изобретению для использования в качестве лекарственного средства. Изобретение также относится к фармацевтической композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Изобретение также относится к использованию антигенсвязывающего белка согласно изобретению и/или фармацевтической композиции по изобретению в производстве лекарственного средства.

Используемые здесь термины «фармацевтическая композиция» или «терапевтическая композиция» относятся к соединению или композиции, способной вызывать желаемый терапевтический эффект при правильном введении субъекту.

В некоторых вариантах осуществления субъект может также называться
5 пациентом.

Такие терапевтические или фармацевтические композиции могут включать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего белка по изобретению или антигенсвязывающего белка, включающего дополнительное терапевтическое средство, в смеси с фармацевтически или физиологически приемлемыми
10 вспомогательным веществом для приготовления лекарственных средств, выбранным для соответствия способу введения.

Антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению обычно поставляется в составе стерильной фармацевтической композиции, которая обычно включает фармацевтически приемлемый носитель.

15 «Фармацевтически» или «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным объектам и композициям, которые не вызывают неблагоприятной, аллергической или другой нежелательной реакции при введении млекопитающему, особенно человеку, в зависимости от конкретного случая. Фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество относится к нетоксичному
20 твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу или любого типа вспомогательному веществу для составления лекарственной формы.

«Фармацевтически приемлемый носитель» может также называться «фармацевтически приемлемым разбавителем» или «фармацевтически приемлемой средой-носителем» и может включать растворители, объемообразующие агенты, стабилизирующие агенты, дисперсионные среды, покрывающие агенты, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и тому подобное, которые физиологически совместимы. Соответственно, в одном варианте осуществления носитель представляет собой
30 водный носитель.

В другом аспекте водный носитель способен придавать улучшенные свойства при сочетании с антигенсвязывающим белком, описанным в настоящем документе, например, улучшенную растворимость, эффективность и/или улучшенные иммунотерапевтические свойства.

35 Форма фармацевтических композиций, способ введения, дозировка и режим дозирования, естественно, зависят от состояния, которое необходимо лечить, тяжести заболевания, возраста, веса и пола пациента, желаемой продолжительности лечения и

так далее. Эта фармацевтическая композиция может быть в любой подходящей форме (в зависимости от желаемого метода введения пациенту). Она может быть выполнена в форме единичной дозы, как правило, в герметичном контейнере и может быть представлена в составе набора. Такой набор обычно (хотя и не обязательно) включает инструкцию по применению. Он может включать множество указанных единичных лекарственных форм.

Дозировку обычно определяют, исходя из эмпирических соображений, например на основе длительности периода полувыведения. Частота введения может определяться и корректироваться в течение курса терапии и основываться на снижении количества раковых клеток, поддержании снижения количества раковых клеток, снижении пролиферации раковых клеток или уничтожении раковых клеток. В качестве альтернативы могут подойти лекарственные формы с устойчивым непрерывным высвобождением антигенсвязывающего белка. Различные лекарственные формы и устройства для достижения непрерывного высвобождения известны в данной области.

В одном варианте осуществления дозы антигенсвязывающих белков могут быть определены эмпирически у людей, которым вводилась одна или несколько доз препарата. Индивидуумам вводят возрастающие дозы антигенсвязывающего белка. Для оценки эффективности антигенсвязывающего белка можно следить за маркерами состояния раковых клеток. К ним относятся прямые измерения пролиферации и гибели раковых клеток с помощью FACS, других методов визуализации; улучшение состояния здоровья, оцениваемое такими измерениями, или повышение качества жизни, измеряемое принятыми тестами, или продление выживания. Специалисту в данной области будет очевидно, что доза будет зависеть от конкретного человека, стадии заболевания и применяемых ранее и параллельно методов лечения.

В частности, фармацевтические композиции содержат носители, которые фармацевтически приемлемы для лекарственной формы, пригодной для инъекций. Это могут быть, в частности, изотонические, стерильные, солевые растворы (мононатриевый или динатриевый фосфат, хлорид натрия, калия, кальция или магния и тому подобное или смеси таких солей) или сухие, особенно лиофилизированные композиции, которые после добавления, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического солевого раствора позволяют получить инъекционные растворы.

Для приготовления фармацевтических композиций эффективное количество антигенсвязывающего белка по изобретению может быть растворено или диспергировано в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Лекарственные формы, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии; композиции, включающие кунжутное

масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях лекарственная форма должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить с помощью шприца. Она должна
5 быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармацевтически приемлемых солей могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как
10 гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. При обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Антигенсвязывающий белок по изобретению может быть включен в композицию в
15 нейтральной или солевой форме с использованием фармацевтически приемлемых солей.

Стерильные инъекционные растворы готовятся путем введения активных соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, в установленном порядке, с
20 последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовятся путем введения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются
25 методики вакуумной сушки и лиофилизации, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из их раствора, предварительно стерильно отфильтрованного.

Также предполагается приготовление более концентрированных или высококонцентрированных растворов для прямого введения, где использование ДМСО
30 в качестве растворителя обеспечивает чрезвычайно быстрое проникновение с доставкой высоких концентраций активных агентов в небольшую область опухоли.

После составления растворы вводятся совместимым с лекарственной формой способом и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Композиции легко вводятся в различных лекарственных формах, таких как описанные
35 выше инъекционные растворы, но также могут использоваться капсулы с высвобождением лекарства и тому подобное.

Терапевтические способы и применения

Изобретатели продемонстрировали в примере 6 экспериментального раздела исследований *in vitro* для нескольких антигенсвязывающих белков по изобретению, в частности молекул TCER™ по изобретению, таких как растворимые молекулы TCER™ №114-iso0-UCHT1(17), №114-iso1-UCHT1(17), №114-iso2-UCHT1(17), №114-iso0-BMA031(36), №114-iso1-BMA031(36) и №114-iso2-BMA031(36), цитотоксическую активность этих молекул в отношении MAG-003 положительных линий раковых клеток, таких как Hs695T, A375 и U2OS. Кроме того, изобретатели показали, что указанная цитотоксическая активность высокоспецифична и ограничена MAG-003-положительными клетками, поскольку биспецифические антигенсвязывающие белки вызывали лишь незначительный лизис в клеточных линиях, экспрессирующих HLA-A*02, но не презентующих пептид MAG-003.

Кроме того, изобретатели продемонстрировали эффективность *in vivo* антигенсвязывающих белков по изобретению, таких как TCER™, нацеленных на MAG-003 (SEQ ID NO: 127 и 130, группа 3; SEQ ID NO: 135 и 136, группа 4), приводящих к полной ремиссии опухоли HS695T у мышей NOG, как подробно описано в примере 7 и как показано на Фигуре 11.

Как было продемонстрировано авторами изобретения, антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению полезны для генерации иммунного ответа у субъекта, предпочтительно пациента, при этом опухолевые клетки могут быть разрушены этим иммунным ответом. Можно ожидать, что иммунный ответ, возникающий в результате такой терапевтической вакцинации, будет высокоспецифичным против опухолевых клеток, поскольку пептид KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1) не представлен или не представлен чрезмерно в нормальных тканях в сопоставимом количестве копий, что предотвращает риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток пациента. Кроме того, как указано во вводной части данного описания, антигенсвязывающие белки по изобретению специфически связываются с KVLEHVVRV, в частности с эпитопом в указанном пептиде MAG-003, как определено в настоящем документе, и, таким образом, не распознают и не вступают в перекрестную реакцию с другими родственными пептидными антигенами (подобными пептидами), присутствующими на нормальных тканях, за счет перекрестной реактивности. Таким образом, антигенсвязывающие белки по изобретению являются пригодными для иммунотерапии.

Соответственно, антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению, в частности биспецифические антигенсвязывающие белки, такие как молекулы TCER™, могут быть использованы для лечения рака.

Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут быть использованы в терапевтических целях у людей и/или млекопитающих животных, отличных от человека, в частности у людей.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут связываться с опухолевыми клетками и уменьшать рост и/или уничтожать опухолевые клетки, представляющие комплекс пептида KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1)/МНС на своей клеточной поверхности. Предполагается, что антигенсвязывающий белок вводят в концентрации, способствующей связыванию в физиологических (например, *in vivo*) условиях.

Соответственно, в одном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие белки по изобретению могут быть использованы для иммунотерапии, направленной против опухолевых клеток различных тканей, таких как толстая кишка, легкие, молочная железа, предстательная железа, яичники, поджелудочная железа, почки и так далее. В другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки могут связываться с опухолевыми клетками и уменьшать их рост и/или уничтожать их.

Таким образом, данное изобретение относится к способу лечения или профилактики пролиферативного заболевания или расстройства, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка, нуклеиновой кислоты или вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением, как определено в настоящем документе выше в разделе «Антигенсвязывающий белок», «Нуклеиновые кислоты» или «Фармацевтические композиции».

В конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего пролиферативным заболеванием, включающему введение указанному субъекту Т-клеток, экспрессирующих на клеточной поверхности антигенсвязывающий белок по изобретению.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способу вызывания иммунного ответа у субъекта, страдающего пролиферативным заболеванием, включающему введение указанному субъекту композиции, включающей Т-клетки, экспрессирующие на клеточной поверхности антигенраспознающую конструкцию по изобретению.

В одном варианте осуществления иммунный ответ, упомянутый в указанном способе, представляет собой цитотоксический Т-клеточный ответ.

Изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам по изобретению, нуклеиновой кислоте по изобретению или вектору по изобретению, клетке-хозяину по

изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для использования в диагностике, профилактике и/или лечении пролиферативного заболевания.

Изобретение также относится к применению антигенсвязывающих белков по изобретению, нуклеиновой кислоты по изобретению или вектора по изобретению, клетки-хозяина по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению в производстве лекарственного средства для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания.

В одном варианте осуществления изобретение относится к использованию антигенсвязывающего белка, нуклеиновой кислоты или вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для лечения или профилактики пролиферативного заболевания или расстройства у субъекта.

В предпочтительных вариантах осуществления Т-клетки являются аутологичными для субъекта либо аллогенными для субъекта, предпочтительно аутологичными. Предпочтительно Т-клетки получают из опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов или моноклеарных клеток периферической крови. Предпочтительно Т-клетки вводятся в форме композиции. В одном предпочтительном сходном варианте осуществления указанная композиция дополнительно включает адъювант, где адъювант является таким, как определено в настоящем документе выше в разделе «Фармацевтическая композиция».

Понятие «субъект» или «индивидуум» используются взаимозаменяемо и могут означать, например, человека или млекопитающего, отличного от человека, предпочтительно человека.

В контексте изобретения понятие «лечить» или «лечение» относится к терапевтическому применению (то есть у субъекта, имеющего определенное заболевание) и означает обратное развитие, облегчение, подавление прогрессирования одного или нескольких симптомов такого расстройства или состояния. Таким образом, лечение относится не только к лечебным мероприятиям, которые приводят к полному излечению заболевания, но и к лечению, которое замедляет прогрессирование заболевания и/или продлевает выживание субъекта.

Под «предупреждением» подразумевается профилактическое использование (то есть у субъекта, предрасположенного к развитию данного заболевания).

В одном варианте осуществления «заболевание» или «расстройство» означает любое состояние, которое может извлечь пользу от лечения антигенсвязывающим белком по изобретению. В одном варианте осуществления это включает хронические и острые расстройства или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают субъекта к рассматриваемому расстройству.

Понятие «нуждающийся в лечении» относится как к субъекту, уже имеющему расстройство, так и к субъектам, у которых расстройство необходимо предупредить. Соответственно, в одном варианте осуществления субъект является пациентом.

5 «Пролиферативные заболевания», такие как рак, связаны с нерегулируемой и/или неадекватной пролиферацией клеток.

В одном воплощении пролиферативное расстройство или заболевание представляет собой, например, опухолевое заболевание, характеризующееся экспрессией MAGEA4 и/или MAGEA8 в раковой или опухолевой клетке указанного опухолевого заболевания.

10 Соответственно, особенно предпочтительным раком является MAGEA4- и/или MAGEA8-положительный рак.

В контексте настоящего изобретения рак считается «MAGEA4- и/или MAGEA8-положительным», если родственный пептид, например такой как пептид MAG-003, представлен в количестве >98 % всех случаев раковой опухоли в соответствии с 15 руководящими принципами NCI. По всем другим указанным в настоящем документе показаниям может быть выполнена биопсия, так как она является стандартом при лечении этих видов рака, и пептид может быть идентифицирован методом XPresident® и соответствующими способами (согласно публикациям заявок WO 03/100432; WO 2005/076009; WO 2011/128448; WO 2016/107740, патентов США №№ 7 811 828, 20 9 791 444 и заявки на патент США 2016/0187351, содержание каждой из которых во всей его полноте включено в настоящий документ посредством ссылки). В одном варианте осуществления рак легко анализируется (то есть диагностируется), например, с помощью антигенсвязывающего белка по изобретению. Методы идентификации антиген-экспрессирующего рака с использованием антигенсвязывающего белка 25 известны специалистам в данной области. Следует понимать, что термины «рак» и «карцинома» не используются здесь взаимозаменяемо, поскольку карцинома представляет собой специфический тип рака, появляющегося на коже или в тканях, выстилающих или покрывающих органы тела. Тем не менее, образцы тканей, используемые в Примере 11, получены от пациентов с опухолями и образцы относятся 30 к заболеванию пациента.

В одном варианте осуществления рак, который является MAGEA4- и/или MAGEA8- "положительным", то есть представляющим целевой пептид, выбран из группы, состоящей из рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рака печени, рака головы и шеи, рака кожи, почечно-клеточного рака, рака 35 головного мозга, рака желудка, колоректального рака, гепатоцеллюлярного рака, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, лейкоза, рака молочной железы,

карциномы клеток Меркеля, меланомы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря и желчных протоков, остеосаркомы и рака пищевода.

В одном варианте осуществления рак, который является MAGEA4- и/или MAGEA8-«положительным», то есть представляющим целевой пептид, выбран из группы, состоящей из рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рака печени, рака головы и шеи, рака кожи, рака желудка, колоректального рака, гепатоцеллюлярного рака, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, меланомы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря и желчных протоков и рака пищевода.

В другом варианте осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), предпочтительно аденокарциному – немелкоклеточный рак легкого или плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (SNSCLC); или мелкоклеточный рак легкого (SCLC). В другом варианте осуществления рак представляет собой рак кожи, предпочтительно меланому. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак головы и шеи, предпочтительно плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC). В другом варианте осуществления рак представляет собой рак печени, предпочтительно гепатоцеллюлярный рак (HCC). В другом варианте осуществления рак представляет собой рак пищевода, предпочтительно рак гастроэзофагеального перехода.

Одним из текстов, включающих руководство по лечению рака, является публикация Cancer, Principles and Practice of Oncology, 4th Edition, DeVita et al, Eds. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa. (1993). Соответствующий терапевтический подход выбирается в зависимости от конкретного типа рака и других факторов, таких как общее состояние пациента, как принято в соответствующей области. Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут быть использованы сами по себе или могут быть добавлены к терапевтической схеме с использованием других противораковых средств, обычно применяемых при лечении больного раком.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению можно вводить одновременно с, до или после различных лекарственных препаратов и методов лечения, широко применяемых при лечении рака, таких как, например, химиотерапевтические средства, нехимиотерапевтические, антинеопластические средства и/или лучевая терапия, предпочтительно химиотерапевтические средства.

«Диагноз» в настоящем документе относится к медицинской диагностике и означает определение того, какое заболевание или состояние объясняет симптомы и признаки, наблюдаемые у человека.

Конкретный уровень терапевтически эффективной дозы для каждого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая расстройство или заболевание, которое лечат, и тяжесть расстройства; активность используемого конкретного антигенсвязывающего белка; используемую конкретную композицию, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения, путь введения и скорость выведения используемого конкретного полипептида; продолжительность лечения; лекарственные препараты, используемые в комбинации или одновременно с используемым конкретным полипептидом; и других подобных факторов, хорошо известных в медицине. Однако следует понимать, что общее ежедневное или ежемесячное использование антигенсвязывающих белков, нуклеиновой кислоты или вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции по настоящему изобретению будет определяться лечащим врачом в рамках здравого медицинского суждения. Конкретный уровень терапевтически эффективной дозы для каждого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая расстройство или заболевание, которое лечат, и тяжесть расстройства; активность используемого конкретного антигенсвязывающего белка; используемую конкретную композицию, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения, путь введения и скорость выведения используемого конкретного полипептида; продолжительность лечения; лекарственные препараты, используемые в комбинации или одновременно с используемым конкретным полипептидом; и других подобных факторов, хорошо известных в медицине. Например, специалистам в данной области хорошо известно, что начальные дозы соединения ниже тех, которые необходимы для достижения желаемого терапевтического эффекта, и дозу постепенно увеличивают до достижения желаемого эффекта.

В одном варианте осуществления эффективность лечения антигенсвязывающим белком по изобретению оценивается *in vivo*, например, в мышинной модели рака, и путем измерения, например, изменения объема опухоли между группой лечения и контрольной группой.

Фармацевтические композиции, векторы, нуклеиновые кислоты и клетки по изобретению могут быть получены в существенно чистой форме, например, в которой присутствует по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % или 100 % по весу антигенсвязывающего белка одного типа.

Антигенсвязывающий белок по изобретению, нуклеиновая кислота по изобретению или вектор по изобретению, клетка-хозяин по изобретению или

фармацевтическая композиция по изобретению могут быть введены любым практически возможным способом.

В соответствии с описанием в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, предпочтительно лимфоциты, такие как Т-лимфоциты или клетки-предшественники Т-лимфоцитов, например, CD4- или CD8-положительные Т-клетки, наиболее предпочтительно Т-клетки, используются в описанных в настоящем документе вариантах медицинского применения или методах лечения.

Соответственно, клетки-хозяева по настоящему изобретению, предпочтительно Т-клетки, могут быть использованы в качестве активных ингредиентов терапевтической композиции. Таким образом, изобретение также обеспечивает способ уничтожения клеток-мишеней у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества клеток-хозяев, как определено выше, предпочтительно Т-клеток. В контексте данного способа клетки-хозяева, после введения субъекту предпочтительно вызывают иммунный ответ.

Способы по изобретению, в которых субъекту вводят клетки-хозяева или популяции клеток, предполагают, что клетки-хозяева могут быть аллогенными (от другого субъекта) или аутологичными для субъекта. Предпочтительно клетки являются аутологичными для субъекта.

В случае, если клетки-хозяева являются аллогенными и, таким образом, получены от другого субъекта, этот другой субъект является здоровым.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены в соответствии со способами, описанными в заявке на патент США 20190175650, заявке США № 16/271,393 и заявке США № 16/361,043, содержание которых включено в настоящий документ во всей их полноте посредством ссылки.

Под «здоровым» подразумевается, что субъект в целом здоров, предпочтительно имеет компетентную иммунную систему и, более предпочтительно, не страдает от какого-либо заболевания, которое можно легко проверить и обнаружить.

В конкретном примере клетка-хозяин представляет собой Т-клетку. Соответственно, в контексте настоящего изобретения, когда Т-клетки, как они определены выше, используются в качестве лекарственного средства, эти Т-клетки обычно отбирают у субъекта методом афереза. Затем Т-клетки генетически модифицируют для экспрессии антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению на их клеточной поверхности, затем генетически модифицированные Т-клетки наращивают, а затем повторно вводят субъекту. В этом примере антигенсвязывающий белок предпочтительно представляет собой TCR.

В другом подходе клетка-хозяин может быть стволовой клеткой, например, мезенхимальной стволовой клеткой, и сконструированной для экспрессии

антигенсвязывающего белка изобретения. В этом примере антигенсвязывающий белок представляет собой растворимый белок, такой как антитело, scTCR или растворимый антигенсвязывающий белок, как определено в настоящем документе, более предпочтительно биспецифический растворимый антигенсвязывающий белок, такой как TCER™, как описано в настоящем документе.

Соответственно, клетка-хозяин была трансформирована, трансдуцирована или трансфицирована нуклеиновой кислотой и/или вектором согласно изобретению, как описано выше в разделе «Нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева».

Когда клетка-хозяин трансформируется, трансдуцируется или трансфицируется для экспрессии антигенсвязывающего белка по изобретению, предпочтительно клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать антигенсвязывающий белок. Как только клетка-хозяин экспрессирует антигенсвязывающий белок по изобретению, клетку-хозяина можно уже называть активированной клеткой-хозяином.

Протоколы для такого так называемого адоптивного переноса Т-клеток хорошо известны в данной области. Обзоры можно найти в публикациях: Gattioni et al. и Morgan et al. (Gattinoni, L. et al., Nat.Rev.Immunol. 6 (2006): 383-393; Morgan, R. A. et al., Science 314 (2006): 126-129).

Для генерации Т-клеток *in vitro* может быть использован ряд способов. Например, аутологичные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты могут быть использованы для генерации ЦТЛ. Plebanski и соавт. (Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol 25 (1995): 1783-1787) для получения Т-клеток использовали аутологичные лимфоциты периферической крови (PLB). Кроме того, В-клетки могут использоваться для получения аутологичных Т-клеток.

Аллогенные клетки также могут быть использованы для получения Т-клеток, и метод подробно описан в патенте США № 6 805 861, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

В одном аспекте, вызванный TCR иммунный ответ или Т-клеточный ответ может относиться к пролиферации и активации эффекторных функций, индуцированных связыванием с комплексом MAG-003/MHC, *in vitro* или *in vivo*. Например, для цитотоксических Т-клеток, ограниченных MHC класса I, эффекторными функциями могут быть лизис пептид-импульсных, или обработанных предшественником пептида, или естественно пептид-презентирующих клеток-мишеней, секреция цитокинов, предпочтительно интерферона-гамма, TNF-альфа или IL-2, индуцированная пептидом, секреция эффекторных молекул, например, гранзимов или перфоринов, индуцированная пептидом, или дегрануляция.

Как описано выше, клетки-хозяева, такие как Т-клетки, экспрессирующие антигенсвязывающий белок по изобретению, специфически связывающийся с комплексом MAG-003/MHC, применимы в терапии. Таким образом, еще один аспект изобретения предусматривает активированные клетки-хозяева, которые можно

получить вышеописанными способами по изобретению.

Активированные клетки-хозяева, полученные вышеописанным методом, могут избирательно распознавать клетку-мишень.

«Клетка-мишень» в данном документе относится к MAGE-A/MHC-представляющей клетке, как определено выше в разделе «Антигенсвязывающие белки».

В одном варианте осуществления клетка-мишень предпочтительно представляет собой раковую клетку, где рак является таким, как определено в настоящем документе выше.

In vivo клетками-мишенями для CD8-положительных Т-клеток согласно настоящему изобретению могут быть клетки опухоли (которые иногда экспрессируют MHC класса II) и/или стромальные клетки, окружающие опухоль (опухолевые клетки) (которые иногда также экспрессируют MHC класса II; (Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006): 4163-4170).

Наборы

Наконец, изобретение также предоставляет наборы, включающие по меньшей мере один антигенсвязывающий белок по изобретению.

В одном варианте осуществления набор включает в себя

а) по меньшей мере один антигенсвязывающий белок по изобретению, как определено в настоящем документе выше в разделе «Антигенсвязывающие белки»,

б) факультативно, упаковочный материал и,

в) факультативно, этикетку или упаковочный листок-вкладыш внутри указанного упаковочного материала с информацией о том, что указанный антигенсвязывающий белок эффективен при лечении рака или при применении для лечения рака.

В сходном варианте осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий белок по изобретению содержится в однокамерном и/или многокамерном предварительно заполненном шприце/шприцах (например, в жидкостных шприцах и лиошприцах).

В одном варианте осуществления изобретение включает наборы для получения устройства для введения одной дозы.

Соответственно, в одном варианте осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий белок по изобретению, как указано в пункте а) набора по

изобретению, представляет собой высушенный антигенсвязывающий белок по изобретению, находящийся в первом контейнере. Кроме того, набор дополнительно содержит второй контейнер с водным составом.

Соответственно, в одном варианте осуществления, набор включает в себя

- 5 а) первый контейнер, включающий по меньшей мере один высушенный антигенсвязывающий белок по изобретению, как определено в настоящем документе выше в разделе «Антигенсвязывающие белки»,
- б) второй контейнер, включающий водный состав;
- в) факультативно, упаковочный материал и,
- 10 г) факультативно, этикетку или упаковочный листок-вкладыш внутри указанного упаковочного материала, который содержит информацию, что указанный антигенсвязывающий белок эффективен при лечении рака или при применении для лечения рака.

Водный состав обычно представляет собой водный раствор, включающий фармацевтически приемлемые носители, как определено в настоящем документе выше в разделе «Фармацевтические композиции».

В сходном варианте осуществления «первый контейнер» и «второй контейнер» относятся к камерам многокамерного предварительно заполненного шприца (например, лиошприца).

20 Рак является таким, как определено в настоящем документе выше в контексте изобретения.

В настоящей заявке понятие «и/или» представляет собой грамматическую связку, которую следует интерпретировать как указывающую на то, что может иметь место один или более случаев, которые она связывает. Например, формулировка «такие белки с нативной последовательностью могут быть приготовлены с использованием стандартных рекомбинантных и/или синтетических методов» означает, что белки с нативной последовательностью могут быть приготовлены с использованием стандартных рекомбинантных и синтетических методов или белки с нативной последовательностью могут быть приготовлены с использованием стандартных рекомбинантных методов, или белки с нативной последовательностью могут быть

25

30

приготовлены с использованием синтетических методов.

Кроме того, во всей настоящей заявке понятие «включающий (содержащий)» следует понимать как охватывающий все конкретно указанные признаки, а также необязательные, дополнительные, неуказанные признаки. Используемый в настоящем документе, понятие «включающий (содержащий)» также раскрывает вариант

35

осуществления, в котором не присутствуют никакие другие признаки, кроме конкретно упомянутых (то есть «состоящий из»).

Кроме того, форма единственного числа не исключает форму множественного числа. Тот факт, что определенные меры указаны во взаимно различных зависимых пунктах формулы изобретения, не означает, что сочетание этих мер не может быть использовано для получения преимущества.

- 5 Далее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на
сопроводительные фигуры и примеры. Вся литература и патентные документы,
приведенные в настоящем документе, включены во всей их полноте в настоящий
документ посредством ссылки. Хотя изобретение было проиллюстрировано и подробно
описано в последующем описании, примеры следует рассматривать как
10 иллюстративные или типичные, но не ограничивающие.

Описание последовательностей

SEQ ID NO:	Название	Последовательность аминокислот
1	MAG-003	KVLEHVVRV
2	Альфа-цепь TCR R7P1D5 – полной длины	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLIRPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
3	Альфа-цепь лидерного пептида TCR R7P1D5	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSR
4	Вариабельный домен альфа R7P1D5	GEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLIRP
5	CDRa1 R7P1D5	DSSSTY
6	CDRa2 R7P1D5	IFSNMDM
7	CDRa3 R7P1D5	CAEYSSASKIIF
8	R7P1D5 – константный домен альфа	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
9	Бета-цепь TCR R7P1D5 – полной длины	MGSWTLCCVSLCIVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTM MRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI QPSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
10	Бета-цепь лидерного пептида TCR R7P1D5	MGSWTLCCVSLCIVAKHT
11	Вариабельный домен бета R7P1D5	DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTM MRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI QPSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
12	R7P1D5 CDRb1	SGHDY
13	R7P1D5 CDRb2	FNNNVP
14	R7P1D5 CDRb3	CASRANTGELFF
15	Константный домен бета R7P1D5	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
16	Слитый белок Aga2p с scTv R7P1D5 и метками	MQLLRCSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSPTESTPYSLSTTTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPTTSKGGSPINTQYVFGGGGSDYKDDDDKGGGASGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLIRPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI QPSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVLAAA GGSGGEQKLISEEDL

17	Лидерная последовательность и Aga2p	MQLLRCFSIFSIVASVLAQELTTICEQIPSPTLESTPYSLST TTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPTTSKGGSPIN TQYVF
18	FLAG-метка плюс линкеры	GGGGSDYKDDDDKGGGAS
19	Одноцепочечные переменные домены R7P1D5 с линкером	GEDVEQSLFSLVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEP GAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADT QTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTG ELFFGEGSRLTVL
20	Линкер и метка Мус	AAAGGSGGEQKLISEEDL
21	CDRa2 мутант 1 (aF57Y)	IYSNMDM
22	scTv R7P1D5S (стабилизированный)	GEDVEQSLFSLVREGDSVINCTYTDSSSTLYWYKQEP GAGLQLLTYIYSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADT QTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTG ELFFGEGSRLTVL
23	RABGAP1L-001	FLLETVVRV
24	AXIN1-001	ILDEHVQRV
25	ANO5-001	IVMEHVFL
26	TPX2-001	KILEDVVG
27	SYNE3-001	KLLDLQVRV
28	MIA3-001	KVLDKVFRA
29	HERC4-001	KVLEILHRV
30	PSME2-001	KVLERVNAV
31	HEATR5A-001	KVLETLTV
32	CNOT1-003	KVLGIVVG
33	TEP1-003	AVEEHVSV
34	PITPNM3-001	SVLEKVTRA
35	CDRa3, мутант 1	CAEMTSESKIIF
36	CDRa3, мутант 2	CAEFTSESKIIF
37	CDRa3, мутант 3	CAEFNSESKIIF
38	CDRa3, мутант 4	CAEFSSASKIIF
39	CDRa3, мутант 5	CAEATSESKIIF
40	R7P1D5_aMTSE (R7P1D5 – вариант 1 альфа-цепи)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFSLVREGDSS VINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQ DQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKI IFGSGTRLSIRPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWS NKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFET DTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
41	R7P1D5_aFTSE (R7P1D5 – вариант 2 альфа-цепи)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFSLVREGDSS VINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQ DQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFTSESKII FGSGTRLSIRPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFAFANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

42	R7P1D5_aFNSE ((R7P1D5 – вариант 3 альфа-цепи)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTYLWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQ DQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFNSESII FGSGTRLIRPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
43	R7P1D5_aFSSA (R7P1D5 – вариант 4 альфа-цепи)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTYLWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQ DQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFSSASKII FGSGTRLIRPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
44	R7P1D5_aATSE (R7P1D5 – вариант 5 альфа-цепи)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTYLWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQ DQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEATSESKII FGSGTRLIRPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
45	NYESO1-001	SLLMWITQV
46	MAG-003_A1	AVLEHVVRV
47	MAG-003_A2	KALEHVVRV
48	MAG-003_A3	KVAEHVVRV
49	MAG-003_A4	KVLAHVVRV
50	MAG-003_A5	KVLEAVVRV
51	MAG-003_A6	KVLEHAVRV
52	MAG-003_A7	KVLEHVARV
53	MAG-003_A8	KVLEHVAV
54	MAG-003_A9	KVLEHVRA
55	CDRa1, мутант 1	ESSSTY
56	CDRa2, мутант 2	IYSSQDQ
57	CDRa2, мутант 3	IYSSQDV
58	75-NU(17)-R7P1D5#1 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTGYTMNWVR QAPGGGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDVAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCTYTDSSS TYLYWYKQEPGAGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIIFGSGTRLIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWRQTMMRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
59	CDRa2, мутант 4	IYSSQDS
60	75-NU(17)-R7P1D5#20 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTGYTMNWVR QAPGGGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDVAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCTYTDSSS TYLYWYKQEPGAGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKK

		DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFC YGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRADTGELFFGEGSRLTVL
61	75-NU(17)-R7P1D5#21 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGSDWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCTYTDSSS TYLYWYKQEPGAGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFC YGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRADTGELFFGEGSRLTVL
62	CDRb1, мутант 1	PGHDY
63	CDRb2, мутант 1	FCYGHP
64	CDRb2, мутант 2	FCYGVP
65	CDRb2, мутант 3	FCYGTP
66	CDRb2, мутант 4	FCYGAP
67	75-NU(17)-R7P1D5#29 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGSDWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSS TYLYWYKQEPGAGPQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
68	75-NU(17)-R7P1D5#30 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGSDWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCTYTDSSS TYLYWYKQEPGAGPQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
69	75-NU(17)-R7P1D5#31 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGSDWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSS TYLYWYKQEPGKGPQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHE

		VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
70	CDRb2 мутант 5	FCYGMF
71	CDRb3 мутант 1 (bN109D)	CASRADTGELFF
72	CDRa1 консенсусная - ACT + TCER	X ₁ SSSTY
73	CDRa2 консенсусная - ACT + TCER	IX ₁ SX ₂ X ₃ DX ₄
74	CDRa2 консенсусная p1 - TCER	IYSSQDX1
75	75-NU(17)-R7P1D5#32 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGGGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSVINCTYTDSSS TYLYWYKQEPGAGPQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
76	75-NU(17)-R7P1D5#2 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGGGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSVINCTYTDSSS TYLYWYKQEPGAGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
77	CDRa3 консенсусная ACT + TCER	CAEX ₁ X ₂ SX ₃ SKIIF
78	CDRb1 консенсусная - ACT + TCER	X ₁ GHDY
79	CDRb2 консенсусная - ACT + TCER	FX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ P
80	75-NU(17)-R7P1D5x (общий LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQK PGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDTYTLTISSLQ PEDIATYFCQQGQTLPTWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
81	CDRb2 консенсусная p3 - TCER	FCYGX ₁ P
82	CDRb3 консенсусная ACT + TCER	CASRAX ₁ TGELFF
83	FR1-a	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT
84	FR2-a	LYWYKQEPGAGLQLLTY
85	FR3-a	KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRADTQTGDSAIYF

86	FR4-a	GSGTRLSIRP
87	FR1-b	DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI
88	FR2-b	LFWYRQTMMRGLELLIY
89	FR3-b	IDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF
90	FR4-b	GEGSRLTVL
91	FR1-a (19V)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYT
92	FR2-a (48K)	LYWYKQEPGKGLQLLTY
93	FR2-b (54F)	LFWYRQTMMRGLELLFY
94	FR3-b (66C)	CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF
95	MUM-001	KLVEYIVKA
96	Предпочтительный линкер	GGGSGGGG
97	MAGEA4, доступный по регистр. номеру Uniprot P43358	MSSEQKSQHCCKPEEGVEAQEEALGLVGAQAPTTEEQEA AVSSSSPLVPGTLEEVPAESA GPPQSPQGASALPTTISFTCWQRPNEGSSSSQEEEGPST SPDAESLFREALSNKVDELAHF LLRKYRAKELVTKAEMLERVIKKNYKRCFPVIFGKASESLK MIFGIDVKEVDPASNTYTLV TCLGLSYDGLLGNNQIFPKTGLLIIVLGTIAMEGDSASEEEI WEELGVMGVYDGREHTVY GEPRKLLTQDWVQENYLEYRQVPGSNPARYEFLWGPRA LAETSYVKVLEHVVRVNARVRI AYPSSLREAALLEEEEGV
98	MAGEA8, доступный по регистр. номеру Uniprot P43361	MLLGQKSQRYKAEGLQAQGEAPGLMDVQIPTAEEQKA ASSSSTLIMGTLEEVTDSGSPS PPQSPEGASSSLTVTDSTLWSQSDEGSSSNEEEGPSTS PDPAHLESFLREALDEKVAELV RFLLRKYQIKEPVTKAEMLESVIKKNYKNHFPDIFSKASECM QVIFGIDVKEVDPAGHSYI LVTCLGLSYDGLLGDDQSTPKTGLLIIVLGMILMEGSRAP EAIWEALSVMGLYDGREHS VYWKLRKLLTQEWVQENYLEYRQAPGSDPVRYEFLWGP RALAETSYVKVLEHVVRVNARV RISYPSLHEEALGEEKGV
99	Линкер	TVAAP
100	Линкер	GGGS
101	Линкер	GGGS
102	Линкер	TVLRT
103	Линкер	TVSSAS
104	Линкер	GGGSGGGGS
105	Линкер	GGGGSAAA
106	Линкер	GGGSGGGGSGGGGS
107	Линкер	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGS
108	Линкер	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGS
109	Линкер	TVLSSAS
110	Линкер	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
111	native Fc amino acid sequence of IGHG1*01	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
112	Fc with knob mutation [S354C and T366W]	EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

		QYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
113	Fc с мутацией «впадина» [(Y349C, T366S, L368A и Y407V +	EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
114	IgG1-шарнир	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
115	IgG2-шарнир	ERKCCVECPPCPAPPVAGP
116	IgG3-шарнир	ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPAPE LLG
117	IgG4-шарнир	ESKYGPPCPSCPAPEFLG
118	R7P1D5_aMTSE (R7P1D5 – вариант 1 альфа-вариабельн. домена)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPG AGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESIIIFGSGTRLSIRP
119	R7P1D5_aFTSE (R7P1D5 - вариант 2 альфа-вариабельн. домена)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPG AGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEFTSESIIIFGSGTRLSIRP
120	R7P1D5_aFNSE ((R7P1D5 - вариант 3 альфа-вариабельн. домена)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPG AGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEFNSESKIIIFGSGTRLSIRP
121	R7P1D5_aFSSA (R7P1D5 - вариант 4 альфа-вариабельн. домена)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPG AGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEFSSASKIIIFGSGTRLSIRP
122	R7P1D5_aATSE (R7P1D5 - вариант 5 альфа-вариабельн. домена)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPG AGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEATSESIIIFGSGTRLSIRP
123	75-NU (V9) легкая цепь для CR7P1D5S- общий LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQK PGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQGGNTLPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLNTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
124	75-NU(V9)-CR7P1D5S (HC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVR QAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKN TAYLQMNSLRADTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGEDVEQSLFLSVREGDSVINCTYTDSSSTY LYWYKQEPGAGLQLLTYIYSNMDMKQDQRLTVLLNKKDK HLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIIFGSGTRLSIRPGG GGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSDAGVIQSPRHEVT EMGQEVTLRCKPISGHDFWYRQTMRRGLELLIYFNNN VPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF CASRANTGELFFGEGSRLTVL
125	75-NU(Var17)- CR7P1D5#19 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS

		PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCTYTDSSS TYLYWYKQEPGAGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIFYCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFC YGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
126	75-NU(Var17)-CR7P1D5I (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGGGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDNAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCTYTDSSS TYLYWYKQEPGAGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIFYCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFC YGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
127	100(A)-NU(V17)- R7P1D5#114-iso0- dsFcKO-GK (альфа-VL)	EDVEQSLFLSVREGDSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPG KGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGSGGGGDI QMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIRNYLNWYQQKPG KAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DIATYFCQQGQTLPWTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
128	100(A)-NU(V17)- R7P1D5#112-dsFcKO- GK (VH-бета)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGGGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDNAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLTVSSGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTG ELFFGEGSRLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYT QKSLSLSP
129	ZFC-001	KLQEQIHRV
130	100(A)-NU(V17)- R7P1D5#114-dsFcKO- GK (VH-бета)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGGGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDNAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLTVSSGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTG ELFFGEGSRLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYT QKSLSLSP

131	100(A)-NU(V17)- R7P1D5#114-iso1- dsFcKO-GK (альфа-VL)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLWYKQEPG KGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIFYCAEMTSESKIIFGSGTRLIRPGGGSGGGGDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPG KAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DIATYFCQQGQTLPWTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
132	1G4 альфа-цепь	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQIPAAALSVPEGENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTS RLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPTSGGS YIPTFGRGTSILVHPYIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVA WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSF ETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
133	100(A)-NU(V17)- R7P1D5#114-iso2- dsFcKO-GK (альфа-VL)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSTYLWYKQEPG KGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIFYCAEMTSESKIIFGSGTRLIRPGGGSGGGGDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPG KAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DIATYFCQQGQTLPWTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
134	1G4 бета-цепь	MSIGLLCCAALLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSM LQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQG EVPNGYNVSRSTTEFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVG NTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPVNHFRQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTVISAEAWGRADCGFTSESY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVKRKDSR G
135	100(D)-NB(V36)- R7P1D5#114-iso0- dsFcKO-GK (альфа-VH)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLWYKQEPG KGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIFYCAEMTSESKIIFGSGTRLIRPGGGSGGGGGEV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTSYVMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTSTSTA YMESSLRSEDYAVHYCARGSYDYEGFVYWGQGLVT VSSEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP ASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
136	100(D)-NB(V36)- R7P1D5#114-dsFcKO- GK (VL-бета)	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSVMHWYQQK GKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ EDAATYYCQWSSNPLTFGGGKVEIKGGSGGGGDA GVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTM RGLELLFYFCYGTCPDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKI QPSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSRLTVLEPKSSD KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK

		GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
137	100(D)-NB(V36)- R7P1D5#114-iso1- dsFcKO-GK (альфа-VH)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLWYKQEPG KGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESIIIFGSGTRLSIRPGGGSGGGGEV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTSYVMHWWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTSTSTA YMESSLRSEDTAVHYCARGSYDYEGFVYWGQGTTLVT VSSEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP ASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
138	R7P1D5#114-iso0- Вальфа	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLWYKQEPG KGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESIIIFGSGTRLSIRP
139	100(D)-NB(V36)- R7P1D5#114-iso2- dsFcKO-GK (альфа-VH)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSTYLWYKQEPG KGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESIIIFGSGTRLSIRPGGGSGGGGEV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTSYVMHWWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTSTSTA YMESSLRSEDTAVHYCARGSYDYEGFVYWGQGTTLVT VSSEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP ASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
140	Линкер	GGSGG
141	Линкер	GGSGGGGGSGG
142	100(A)-NU(V23)- R7P1D5#114-dsFcKO- GK (VH-бета)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTEYTMNWWVR QAPGGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMESSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSDFWYFDVWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTCPDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQSEPRDSAVYFCASRADTG ELFFGEGSRLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSP
143	Линкер	GGSGGGGGSGGGGGSGG
144	Линкер	GGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGG
145	Линкер	GGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGG
146	Линкер	GSADDAKKDAKKDGKS
147	Линкер	GGQGSGGTGSGGQGSGGTGSGGQGS
148	Линкер	GGGGSGT
149	R7P1D5#112-Vбета	DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTM MRGLELLFYFCYGTCPDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLK IQSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
150	R7P1D5#114-Vбета	DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTM MRGLELLFYFCYGTCPDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLK IQSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSRLTVL

151	R7P1D5#114-iso1-Вальфа	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLWYKQEPG KGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIFYCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP
152	R7P1D5#114-iso2-Вальфа	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSTYLWYKQEPG KGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIFYCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP
153	UCHT1(17) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQK PGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDIATYFCQQGQTLPWTFGQGTKVEIK
154	UCHT1(17) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLTVSS
155	Линкер	GGGGSGGGGSGT
156	UCHT1(23) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLTVSS
157	BMA(10) VL	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSVMHWYQQK GKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ EDAATYYCQQWSSNPLTFGGGKVEIK
158	BMA(10) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHWVR QAPGGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTST STAYMELSSLRSEDTAVHYCARSGYYDYDGFVYWGQGT LTVSS
159	BMA(36) VL	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSVMHWYQQK GKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ EDAATYYCQQWSSNPLTFGGGKVEIK
160	BMA(36) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHWVR QAPGGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTST STAYMELSSLRSEDTAVHYCARSGYYDYEGFVYWGQGT LTVSS
161	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGT
162	UCHT1(17opt) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGESDWDYFDVWGQ GTLTVSS
163	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGT
164	UCHT1(21) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLTVSS
165	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGT
166	100(A)-NU(V21)- R7P1D5#114-dsFcKO- GK (VH-бета)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLTVSSGGGGSGGGDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTG ELFFGEGSRLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSP

167	100(A)-NU(V17opt)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VH-бета)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYYGESDWYFDVWGQ GTLVTVSSGGGSGGGGDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTG ELFFGEGSRLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSP
168	PRAME-004	SLLQHLIGL
169	100(A)-NU(17)-PRAME-dsFcKO-GK (альфа-VL)	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQ YSGKSPELIMSIYQEGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRD SQPSDSATYLCAAVIDNDQGGILTFGTGTRLTIIIPNIQNGG GSGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYL NWWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDIATYFCQQGQTLPWTFGQGTKEIKEPKSS DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
170	100(A)-NU(17)-PRAME-dsFcKO-GK (VH-бета)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYYGSDWYFDVWGQ GTLVTVSSGGGSGGGGKAGVTQTPRYLIKTRGQQVTLS CSPIPGHRVSWYQQTPGQGLQFLFEYVHGEERNKGNF PGRFSGRQFSNSSEMNIENLELGDALYLCASSPWDSP NVQYFGPGTRLTVTEDLKNEPKSSDKTHTCPPCPAPPVA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSP RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
171	INTS4-002	KLLDLMPRL
172	SAMH-001	KLLSYIQLR
173	PPP1CA-006	SIIGRLLEV
174	RPL-007	KIYEGQVEV
175	SETD1A-001	ILLEHNYAL
176	NOMAP-1-0320	ALSNLEVKL
177	NOMAP-1-1223	LLDVPTAAV
178	ODC-001	ILDQKINEV
179	COL6A3-010	KLLPYIVGV
180	FAM115A-001	KLGSVPVTV
181	PHTF2-001	KLFGHLTSA
182	RPP1-001	KTLSAILRI

ФИГУРЫ

На Фигурах 1–18 изображены варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе.

На **Фигуре 1** показаны результаты преобразования TCR в стабилизированный scTCR с помощью поверхностного дисплея на основе дрожжей. Молекулы scTCR, отображаемые на поверхности трансформированных *Saccharomyces cerevisiae* EBY100, окрашивали меченым FITC анти-Vбета8 антителом и меченым PE тетрамером HLA-A*02/MAG-003.

5 Немодифицированный scTCR R7P1D5 (левая панель, SEQ ID NO: 19) сравнивается с вариантом scTCR, несущим две стабилизирующие одноточечные мутации (правая панель, SEQ ID NO: 22), который был получен в результате селекции библиотеки случайных мутаций scTCR. Можно видеть, что вариант scTCR, несущий две стабилизирующие одноточечные мутации, демонстрирует повышенное окрашивание
10 тетрамером HLA-A*02/MAG-003.

На **Фигуре 2А** показаны результаты поверхностного дисплея на основе дрожжей для созревания аффинности scTCR в отношении CDR3 альфа-цепи. Стабилизированные scTCR, включающие немодифицированную и зрелую CDR3 альфа-цепи, окрашивали
15 мономерами HLA-A*02/MAG-003 в концентрации 15 нМ. Для контрастного окрашивания применяли смесь из 10 тетрамеров HLA-A*02, каждый в концентрации 10 нМ, содержащих пептиды (SEQ ID NO: 23-32) с высоким подобием последовательности с MAG-003 (SEQ ID NO: 1). Стабилизированный scTCR (SEQ ID NO: 22) с немодифицированной последовательностью CDR3 альфа-цепи CAEYSSASKIIF (SEQ ID
20 NO: 7) сравнивается с вариантами scTCR, включающими аффинно зрелые последовательности CDR3 альфа-цепи: CAEFSSASKIIF (SEQ ID NO: 38), CAEMTSESKIIF (SEQ ID NO: 35), CAEFTSESKIIF (SEQ ID NO: 36), CAEFNSESKIIF (SEQ ID NO: 37) и CAEATSESKIIF (SEQ ID NO: 39), соответственно. Видно, что дрожжевые клоны с мутированными CDR альфа 2 (SEQ ID NO: 56, 57, 59), бета 1 (SEQ ID NO: 62)
25 или бета 2 (SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 70) также показали значительное улучшение связывания, в то время как специфичность к HLA-A*02/MAG-003 была в основном сохранена.

На **Фигуре 2Б** показаны результаты поверхностного дисплея на основе дрожжей для аффинного созревания scTCR в отношении CDR2 альфа, CDR3 альфа, CDR1 бета и CDR2 бета, соответственно. Стабилизированные scTCR, содержащие немодифицированные и зрелые CDR, окрашивали мономером HLA-A*02/MAG-003 (мономер пептид-мишень-HLA) и контрастировали смесью 10 тетрамеров HLA-A*02, каждый из которых наносили в концентрации 10 нМ, содержащих пептиды (SEQ ID NO:
30 23–32) с высоким подобием последовательности с MAG-003 (SEQ ID NO: 1). (а) Сравнение вариантов scTCR с немодифицированными (SEQ ID NO: 6) и зрелыми последовательностями CDR2 альфа-цепи IYSSQDQ (SEQ ID 56), IYSSQDV (SEQ ID 57) и IYSSQDS (SEQ ID 59), каждый из которых был окрашен мономером HLA-A*02/MAG-

003 40 нМ. (b) Сравнение вариантов scTCR с немодифицированными (SEQ ID NO: 7) и зрелыми последовательностями CDR3 альфа-цепи CAEFSSASKIIF (SEQ ID NO: 38), CAEMTSESKIIF (SEQ ID NO: 35), CAEFTSESKIIF (SEQ ID NO: 36), CAEFNSESKIIF (SEQ ID NO: 37) и CAEATSESKIIF (SEQ ID NO: 39), каждый из которых был окрашен мономером HLA-A*02/MAG-003 15 нМ. (в) Сравнение вариантов scTCR с немодифицированной (SEQ ID NO: 12) и зрелой последовательностью CDR1 бета-цепи PGHDY (SEQ ID NO: 62), каждый из которых был окрашен 40 нМ мономера HLA-A*02/MAG-003. г) Сравнение вариантов scTCR с немодифицированными (SEQ ID NO: 13) и зрелыми последовательностями CDR2 альфа-цепи FcYGHF (SEQ ID NO: 63), FCYGVF (SEQ ID NO: 64), FCYGF (SEQ ID NO: 65), FCYGF (SEQ ID NO: 66), FCYGF (SEQ ID NO: 70), каждая из которых была окрашена 5 нМ мономера HLA-A*02/MAG-003. Окрашивание тетрамерами HLA-A*02/MAG-003 было значительно сильнее у всех мутантов CDRa3 R7P1D5 по сравнению с родительским TCR R7P1D5, что указывает на улучшенное связывание пептида с HLA у мутантных вариантов.

На **Фигуре 3** показано окрашивание зрелого варианта TCR R7P1D5, экспрессируемого человеческими CD8⁺ Т-клетками, PE-меченными тетрамерами HLA-A*02/MAG-003 и FITC-меченным анти-Vbeta 8 антителом. В качестве контроля проводили имитацию экспрессии TCR (ИМИТАЦИЯ) или экспрессировали TCR1G4, специфичный к NYESO1-001, и проводили окрашивание тетрамерами HLA-A*02/NYESO1-001, меченными PE.

На **Фигуре 4** показано высвобождение IFN-гамма человеческими CD8⁺ Т-клетками, экспрессирующими зрелый вариант TCR R7P1D5, в ответ на MAG-003. Для контроля выполняли имитацию экспрессии TCR (ИМИТАЦИЯ) или экспрессировали 1G4 TCR, специфичный к NYESO1-001. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ИФА после совместного культивирования электропорированных CD8⁺ Т-клеток с T2-клетками, нагруженными серийными разведениями MAG-003. Baseline levels of IFN-gamma (released by MOCK electroporated CD8⁺ T cells upon coculture with respectively loaded T2 cells) were subtracted. По сравнению с родительским TCR R7P1D5, зрелые мутанты 1–5 CDRa3 R7P1D5 показали повышенное высвобождение IFN-гамма в ответ на MAG-003.

На **Фигуре 5** показано высвобождение IFN-гамма для зрелого варианта TCR R7P1D5, экспрессируемого человеческими CD8⁺ Т-клетками в ответ на MAG-003 и другие подобные пептиды. Для контроля выполняли имитацию экспрессии TCR (ИМИТАЦИЯ) или экспрессировали 1G4 TCR, специфичный к NYESO1-001. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ИФА после совместного культивирования

электropорированных CD8⁺ Т-клеток с Т2-клетками, нагруженными 10 мкМ пептида. Baseline levels of IFN-gamma (released by MOCK electroporated CD8⁺ T cells upon coculture with respectively loaded T2 cells) were subtracted. По сравнению с родительским TCR R7P1D5, зрелые мутанты 1–5 CDRα3 R7P1D5 показали повышенное высвобождение IFN-гамма в ответ на MAG-003 и отсутствие высвобождения IFN-гамма в ответ на протестированные подобные пептиды.

На **Фигуре 6** показано высвобождение IFN-гамма человеческими CD8⁺ Т-клетками, экспрессирующими зрелый вариант TCR R7P1D5, в ответ на MAG-003 и соответствующие пептиды с заменой аланина. Для контроля выполняли имитацию экспрессии TCR (ИМИТАЦИЯ) или экспрессировали 1G4 TCR, специфичный к NYESO1-001. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ИФА после совместного культивирования электropорированных CD8⁺ Т-клеток с Т2-клетками, нагруженными 10 мкМ пептида. Baseline levels of IFN-gamma (released by MOCK electroporated CD8⁺ T cells upon coculture with respectively loaded T2 cells) were subtracted.

На **Фигуре 7А** показаны выходы продукта и данные по стабильности при тепловом стрессе растворимых антигенсвязывающих белков scTCR-Fab, включающих переменные домены TCR с различными аффинно-зрелыми CDR и/или каркасными мутациями.

На **Фигуре 7Б** показаны кривые связывания растворимых антигенсвязывающих белков scTCR-Fab, таких как S, № 1, № 2 и I с MAG-003 в комплексе с HLA-A*02, измеренные методом биослойной интерферометрии. Для каждого измерения взаимодействия использовались возрастающие концентрации мономеров HLA-A*02/MAG-003 в растворе, которые приведены в нМ.

На **Фигуре 7В** показаны кривые связывания растворимых антигенсвязывающих белков scTCR-Fab, таких как I (серые кривые) и № 19 (черные кривые) для MAG-003 и полученных из нормальной ткани нецелевых пептидов SYNE 3-001, TPX2-001, PSME2-001, соответственно, в комплексе с HLA-A*02. Измерение проводили методом биослойной интерферометрии, с использованием раствора scTCR-Fab в концентрации 1 мкМ.

На **Фигуре 8А** показаны выход продукта и данные по стабильности при тепловом стрессе для растворимых антигенсвязывающих белков TCER™, включающих переменные домены TCR с выбранными аффинно-зрелыми CDR в сочетании с

различными последовательностями VH/VL гуманизированного Т-клеточно-рекрутирующего антитела BMA031(36), а также различных вариантов 17, 17opt, 21, 23 гуманизированного рекрутируемого Т-клетками антитела UCHT1.

5 На **Фигуре 8Б** показаны кривые связывания антигенсвязывающих белков TCER™, включающих варианты переменного домена TCR 114-iso0, 114-iso1 и 114-iso2 в сочетании с UCHT1(17) и BMA031(36), с MAG-003 в комплексе с HLA-A*02. Для измерения использовалась биослойная интерферометрия, применялись возрастающие концентрации молекул TCER™ в растворе, которые приведены в нМ.

10

На **Фигуре 8В** показаны кривые связывания молекул TCER™ 114-iso1-BMA(36) и 114-iso2-UCHT1(17) с MAG-003 и полученными из нормальной ткани нецелевых пептидов NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223, ODC-001, соответственно, в комплексе с дисульфид-стабилизированным HLA-A*02. Измерения проводились методом биослойной

15 интерферометрии с использованием раствора TCER™ с концентрацией 1 мкМ.

На **Фигуре 9** представлены данные по эффективности *in vitro* опосредованного TCER™ уничтожения HLA-A*02-положительных опухолевых клеточных линий с детектируемой экспрессией MAG-003 (Hs695T и A375) и без детектируемой экспрессии MAG-003 (BV173). Были протестированы молекулы TCER™, включающие переменные домены антитела UCHT1(17) с переменными доменами вариантов TCR №114-iso0 (SEQ ID NO: 127 и 130), №114-iso1 (SEQ ID NO: 131 и 130) и №114-iso2 (SEQ ID NO: 133 и 130) (верхняя панель). Кроме того, были протестированы молекулы TCER™, включающие переменные домены антитела BMA031(36) с переменными доменами

20 вариантов TCR №114-iso0 (SEQ ID NO: 135 и 136) и №114-iso2 (SEQ ID NO: 139 и 136) (нижняя панель). Опухолевые клетки инкубировали совместно с человеческими МПКК от здорового HLA-A*02+ донора (HBC-720) в соотношении 1:10, и анализировали цитотоксическую активность в присутствии возрастающих концентраций молекул TCER™ с помощью анализа высвобождения LDH. Через 48 часов лизис целевых

25 клеточных линий измеряли с помощью наборов CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (PROMEGA). Эффективный лизис клеток был продемонстрирован для молекул TCER™, включающих антитела UCHT1(17) и BMA031(36).

30

Рисунок 10 демонстрирует TCER™-опосредованное уничтожение *in vitro* HLA-A*02-положительных опухолевых клеточных линий с детектируемой экспрессией MAG-003 (Hs695T, A375 и U2OS). Были протестированы молекулы TCER™, включающие переменные домены антитела UCHT1(17) с переменными доменами вариантов TCR

35

№114-iso1 (SEQ ID NO: 131 и 130) и №114-iso2 (SEQ ID NO: 133 и 130), а также молекулы TCER™, включающие переменные домены антитела BMA031(36) с переменными доменами варианта TCR №114-iso1 (SEQ ID NO: 137 и 136). Опухолевые клетки инкубировали совместно с человеческими МПК от здорового HLA-A*02+ донора (HBC-982) в соотношении 1:10, и анализировали цитотоксическую активность в присутствии возрастающих концентраций молекул TCER™ посредством анализа высвобождения LDH. Через 48 часов лизис опухолевых клеточных линий измеряли с помощью наборов CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (PROMEGA). Эффективный лизис клеток был продемонстрирован для молекул TCER™, включающих антитела UCHT1(17) и BMA031(36).

На **Фигуре 11** показана эффективность, опосредованная TCER™ *in vivo* у иммунодефицитных мышей NOG, привитых человеческими МПК, против ксенотрансплантатов опухолевых клеток Hs695T – HLA-A*02-положительной опухолевой клеточной линии с детектируемой презентацией MAG-003 (SEQ ID NO: 1) и PRAME-004 (SEQ ID NO: 168). TCER™, включающий переменные домены антитела UCHT1(17) с переменными доменами варианта TCR №114-iso0 (SEQ ID NO: 127 и 130, группа 3), сравнивали с TCER™, включающим переменные домены антитела BMA031(36) с переменными доменами варианта TCR №114-iso0 (SEQ ID NO: 135 и 136, группа 4). В качестве контроля использовали нацеленный на PRAME-004 TCER (SEQ ID NO 169 и 170, группа 2). Группа 1 представляет собой контрольную группу, леченную носителем, в которой одно животное было умерщвлено на 11-й день из-за изъязвления опухоли. Каждый символ, соединенный линией, представляет отдельное животное, а дни лечения указаны стрелкой. Была продемонстрирована полная ремиссия при использовании TCER™, включающего антитело UCHT1(17) и антитело BMA031(36) для рекрутинга Т-клеток.

На **Фигуре 12** показаны данные по безопасности *in vitro* для молекулы TCER™ 114-iso1-BMA(36) (SEQ ID NO: 137 и 136), оцененные в экспериментах с измерением уровня LDH при уничтожении клеток с человеческими HLA-A*02-положительными первичными клетками нормальной ткани от 11 различных органов. Различные клетки были совместно культивированы с эффекторными клетками МПК от здоровых HLA-A*02+ доноров в соотношении 1:10 при возрастающих концентрациях TCER™. Клетки коинкубировали в 50 %-й смеси специфичной среды для первичных тканевых клеток и среды для Т-клеток. Для определения окна безопасности молекулы TCER™ коинкубировали по идентичной схеме с MAG-003-положительной опухолевой клеточной линией Hs695T. Окно безопасности было определено на основе наименьшего

наблюдаемого уровня воздействия (LOEL), определяемого как первая концентрация TCER™, дающая ответ, превышающий пороговое значение. Пороговое значение было определено как ([стандартное отклонение всех трипликатов x 3] + результат контрольного образца нормальной ткани без TCER) и показано пунктирной линией на

5 каждом графике цитотоксичности. Для каждого типа клеток нормальной ткани окно безопасности, определенное на основе LOEL, было более чем 1 000-кратным или 10 000-кратным, что указывает на благоприятный профиль безопасности молекулы TCER™ 114-iso1-BMA(36).

10 На **Фигуре 13** показана эффективность TCER™ *in vivo* у иммунодефицитных мышей NOG, привитых человеческими МКПК, против ксенотрансплантатов опухолевых клеток Hs695T – HLA-A*02-положительной опухолевой клеточной линии с детектируемой презентацией MAG-003 (SEQ ID NO: 1). Молекулы TCER™, включающие переменные домены антитела UCNT1(V17opt) и переменные домены варианта TCR 114-iso1 (SEQ

15 ID NO: 131 и 167, группа 3), сравнивали с TCER™, включающими переменные домены антитела BMA031(36) и переменные домены варианта TCR 114-iso1 (SEQ ID NO: 137 и 136, группа 2). Группа 1 представляет собой контрольную группу, леченную носителем. На графиках показан средний объем опухоли, полученной у мышей, от шести (группа 2 и 3) до десяти особей (группа носителя) в каждой группе. Полная

20 ремиссия была продемонстрирована при использовании молекул TCER™, включающих антитело UCNT1(17opt) и антитело BMA031(36) для рекрутинга Т-клеток, при введении дозы 0,01 мг/кг массы тела один раз в неделю внутривенно.

На **Фигуре 14** показан фармакокинетический профиль молекулы TCER™ 114-iso1-UCNT1(17) у мышей NOG. Мыши получали однократную внутривенную инъекцию в дозе 2 мг/кг массы тела. Концентрацию TCER™ в образцах в плазме крови, собранных в

25 разные временные точки, определяли с помощью ИФА, выявляющего либо наличие специфических белковых доменов (анализ F_c – V_L), либо активность биспецифического связывания (анализ CD3 – pMHC).

На **Фигуре 15** представлено строение молекул TCER™. Биспецифические Т-клеточные рецепторы (TCER™) представляют собой слитые белки, содержащие переменные домены (V α , V β) аффинно зрелого TCR и переменные домены (VH, VL) гуманизированного рекрутирующего Т-клетки антитела. В молекулах используется F_c-

35 часть с выключенной эффекторной функцией, что обеспечивает увеличенный период полужизни, а также улучшенные характеристики стабильности/технологичности.

- На **Фигуре 16** показаны данные по безопасности *in vitro* для молекулы TCER™ 114-iso1-BMA(36) (SEQ ID NO: 137 и 136), оцененные в экспериментах с измерением уровня LDH при уничтожении клеток с человеческими HLA-A*02-положительными первичными клетками нормальной ткани от 12 различных органов. Различные клетки были совместно культивированы с эффекторными клетками МКПК от здоровых HLA-A*02+ доноров в соотношении 1:10 при возрастающих концентрациях TCER™. Клетки коинкубировали в 50 %-й смеси специфичной среды для первичных тканевых клеток и среды для Т-клеток. Для определения окна безопасности молекулы TCER™ коинкубировали по идентичной схеме с MAG-003-позитивной опухолевой клеточной линией Hs695T. Окно безопасности было определено на основе наименьшего наблюдаемого уровня воздействия (LOEL), определяемого как первая концентрация TCER™, дающая ответ, превышающий пороговое значение. Пороговое значение было определено как ([стандартное отклонение всех трипликатов x 3] + результат контрольного образца нормальной ткани без TCER) и показано пунктирной линией на каждом графике цитотоксичности. Для каждого типа клеток нормальной ткани окно безопасности, определенное на основе LOEL, было более чем 1 000-кратным или 10 000-кратным, что указывает на благоприятный профиль безопасности молекулы TCER™ 114-iso1-BMA(36).
- На **Фигуре 17** показана цитотоксичность и высвобождение IFN-гамма человеческими CD8+ Т-клетками, экспрессирующими зрелый вариант TCR R7P1D5, в ответ на линии опухолевых клеток, представляющие различные количества копий HLA-A*02/MAG-003. Для контроля выполняли имитацию экспрессии TCR (ИМИТАЦИЯ) или экспрессировали 1G4 TCR, специфичный к NYESO1-001. Уровни LDH и IFN-гамма в супернатантах определяли после совместного культивирования электропорированных CD8+ Т-клеток с линиями опухолевых клеток.

Рисунок 18: Нормальные ткани и образцы опухолей, проанализированные на наличие пептидов, были сгруппированы в соответствии с их органом происхождения. Верхняя часть: медианные значения интенсивности МС-сигнала, полученные в технических повторных измерениях и измерениях аликвот, показаны в виде точек для отдельных HLA-A*02-положительных нормальных (левая часть фигуры) и опухолевых образцов (правая часть фигуры), на которых был обнаружен пептид. Графики типа «ящик и усы» представляют нормализованную интенсивность сигнала по нескольким образцам и определены в логарифмическом пространстве. В «ящиках» показаны медиана, 25-й и 75-й процентиля. «Усы» простираются до самой низкой точки данных, находящейся в пределах 1,5 интерквартильного интервала (IQR) нижнего квартиля, и самой высокой

точки данных, находящейся в пределах 1,5 IQR верхнего квартиля. Нижняя часть: относительная частота обнаружения пептидов в каждом органе показана в виде столбчатой диаграммы. Числа под панелью указывают на количество образцов, в которых был обнаружен пептид, из общего числа образцов, пригодных для данного анализа, для каждого органа (N = 581 для нормальных образцов, N = 771 для опухолевых образцов). Если пептид был обнаружен на образце, но не мог быть определен количественно по техническим причинам, образец включается в это представление частоты обнаружения, но точка в верхней части фигуры отсутствует.

Используемые сокращения: жир. ткань: жировая ткань; желч. проток: желчный проток; мочевой: мочевой пузырь; кров. сос.: кровеносный сосуд; клет. крови: клетки крови; кост. мозг: костный мозг; голов. мозг: головной мозг; молоч. жел.: молочная железа; желч. п.: желчный пузырь; толстая киш.: толстая кишка; тонкая киш.: тонкая кишка; лимф. уз.: лимфатический узел; центр. нерв: центральный нерв; периф. нерв: периферический нерв; подж. жел.: поджелудочная железа; парашит. ж.: парашитовидная железа; предстат.: предстательная железа; скел. мышца: скелетная мышца; щитов. жел.: щитовидная железа; ОМЛ: острый миелоидный лейкоз; РМЖ: рак молочной железы; ХК: холангиоцеллюлярная карцинома; ХЛЛ: хронический лимфоцитарный лейкоз; КРК: колоректальный рак; РЖП: рак желчного пузыря; ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; РПЖП: рак пищевода-желудочного перехода; ГКК: гепатоцеллюлярная карцинома; ПлКГШ: плоскоклеточная карцинома головы и шеи; МЕЛ: меланома; НХЛ: неходжкинская лимфома; НМРЛадено: аденокарцинома немелкоклеточного рака легкого; НМРЛдругие: НМРЛ, которые не могли быть однозначно отнесены к НМРЛадено или НМРЛплоск; НМРЛплоск: плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого; РЯ: рак яичников; РП: рак пищевода; РПЖ: рак поджелудочной железы; РпрЖ: рак предстательной железы; ПКК: почечно-клеточная карцинома; МРЛ: мелкоклеточный рак легкого; КМП: карцинома мочевого пузыря; РЭМ: рак матки и эндометрия.

ПРИМЕРЫ

Т-клеточные рецепторы (TCR) к раковым антигенам часто имеют более низкую аффинность по сравнению с TCR, нацеленными на вирусные антигены, и это может быть одним из возможных объяснений иммунного ускользания опухоли (Aleksic et al. 2012, Eur J Immunol. 2012 Dec; 42 (12)): 3174–9). Поэтому желательно создать варианты TCR с более высоким сродством для использования в качестве нацеленных на раковый антиген конструкций в адоптивной клеточной терапии или в качестве модуля распознавания растворимого терапевтического лекарственного средства, то есть биспецифических молекул (Hickman et al. 2016, J Biomol Screen. 2016 Sep;21(8):769-85). Таким образом, настоящее изобретение относится к модификации и оптимизации Т-

клеточного рецептора R7P1D5, который был идентифицирован из природного TCR-репертуара человека на основе высокой авидности и селективности в отношении ассоциированного с опухолью пептида MAG-003 (SEQ ID NO: 1). TCR R7P1D5 включает

5 вариабельный домен альфа с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 и

вариабельный домен бета с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, которые раскрыты в WO 2017/158103.

Пример 1. Получение стабильного scTCR

Для настоящего изобретения TCR R7P1D5 (SEQ ID NO: 2 и 9, полная длина) был

10 преобразован в одноцепочечную конструкцию TCR (scTCR R7P1D5, SEQ ID NO: 19) с

использованием вариабельных доменов альфа (SEQ ID NO: 4) и бета (SEQ ID NO: 11) и соответствующей глицин-сериновой линкерной последовательности. Для созревания TCR посредством поверхностного дисплея на основе дрожжей, ДНК соответствующей

последовательности синтезировали и трансформировали в *Sacchromyces cerevisiae*

15 EBY100 (MATa

AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3⁻52 trp1 leu2⁻delta200 his3⁻delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL) (ATCC® MYA⁻ 4941™) вместе с дрожжевым дисплейным вектором, содержащим лидерную последовательность и белок спаривания дрожжей Aga2p (SEQ ID NO: 19), на основе pCT302 (Boder and Wittrup, Methods Enzymol. 2000;328:430-44).

20 Полученный слитый белок после гомологичной рекомбинации в дрожжах (SEQ ID NO: 16) содержит лидерный пептид на N-конце белка Aga2p, ответственный за отображение представляющего интерес белка (Boder and Wittrup, Nat Biotechnol. 1997 Jun; 15 (6): 553-7), короткие пептидные метки, включающие линкерные последовательности (SEQ ID NO: 18 и 20) для контроля экспрессии и целевой белок, а именно scTCR R7P1D5 (SEQ

25 ID NO: 19) или его варианты. Библиотеки вариантов scTCR были созданы методом ПЦР со случайными мутациями, охватывающим всю последовательность гена scTCR R7P1D5. Трансформацию дрожжевых клеток проводили, как описано в заявке WO 2018/091396, и получали до 10⁹ дрожжевых клонов на библиотеку. Процесс отбора дрожжевых клонов, несущих мутантные варианты scTCR с улучшенным связыванием с

30 MAG-003 в комплексе с HLA-A*02, в основном проводили, как описано в публикации Smith et al. (Methods Mol Biol. 2015;1319:95-141). Чтобы убедиться в высокой экспрессии и правильной конформации вариантов scTCR R7P1D5, отображаемых на поверхности дрожжей, использовали окрашивание антителом анти-Vбета8 (Life technologies, клон 1C1), а также окрашивание тетрамером HLA-A*02/MAG-003 (Фигура 1). Трансформация

35 scTCR с помощью дрожжевого поверхностного дисплея выявила две важнейшие стабилизирующие мутации для правильной презентации scTCR на клеточной поверхности, одну в каркасной области FR1-а (SEQ ID NO: 83) альфа-цепи scTCR и одну

в CDR2 альфа-цепи (SEQ ID NO: 6), что привело к получению стабилизированной версии scTCR R7P1D5S (SEQ ID NO: 22), демонстрирующей улучшенное связывание с тетрамером HLA-A*02/MAG-003.

5 Пример 2. Аффинное созревание стабилизированного scTCR

Для создания молекул scTCR с более высокой аффинностью связывания с HLA-A*02/MAG-003 все CDR были подвергнуты индивидуально созреванию с использованием ранее идентифицированного стабилизированного scTCR R7P1D5S (SEQ ID NO: 22). Остатки CDR рандомизировали с использованием вырожденных олиго-
 10 праймеров ДНК, по существу, как описано ранее (Smith et al., Methods Mol Biol. 2015;1319:95-141). Полученные библиотеки ДНК трансформировали, как описано в примере 1. Для сохранения специфичности связывания применяли отрицательный отбор против смеси тетрамеров HLA A*02, содержащих пептиды, полученные из нормальных тканей (SEQ ID NO: 23–32), имеющих высокую степень подобия
 15 последовательности с пептидом MAG-003 (SEQ ID NO 1).

Для отбора обладающих усиленной аффинностью и селективных вариантов scTCR R7P1D5S в каждом раунде отбора использовали уменьшающуюся концентрацию тетрамера или мономера HLA-A*02/MAG-003. После трех раундов отбора были выделены и секвенированы отдельные клоны scTCR, в результате чего были получены
 20 различные аффинно-зрелые последовательности CDR. Как показано на примере scTCR со зрелыми последовательностями CDRa3 (SEQ ID NO: от 35 до 39), можно продемонстрировать значительное улучшение связывания мономера HLA-A*02/MAG-003. Селективность связывания HLA-A*02/MAG-003 была сохранена, что подтверждается низким связыванием со смесью из 10 тетрамеров HLA-A*02,
 25 содержащих пептиды, полученные из нормальных тканей с высокой степенью подобия последовательности с пептидом MAG-003 (SEQ ID NO: 1). Мутант 5 CDRa3 (SEQ ID NO: 39) показал несколько повышенное перекрестное связывание тетрамерных HLA-A*02/подобных пептидов (Фигура 2A). Кроме того, клоны дрожжей с мутированными CDR альфа 2 (SEQ ID NO: 56, 57, 59), бета 1 (SEQ ID NO: 62) или бета 2 (SEQ ID NO: 63, 64,
 30 65, 66, 70) показали значительно более лучшее связывание, в то время как специфичность в отношении HLA-A*02/MAG-003 была в основном сохранена (рисунок 2B).

Пример 3. Использование зрелых TCR для клеточной экспрессии

35 Модификация Т-клеток для экспрессии TCR, распознающих комплекс опухоль-специфический пептид-МНС, является перспективной стратегией перенаправления Т-клеток на раковые клетки. Использование зрелых последовательностей CDR3 может

улучшить реактивность связанных с клетками TCR к HLA-A*02/MAG-003, и идентифицированные мутантные последовательности CDRa3 (SEQ ID NO: 35–39) были привиты к альфа-цепи родительского TCR R7P1D5 (SEQ ID NO: 2) и объединены с бета-цепью родительского TCR R7P1D5 (SEQ ID NO: 9). Полученные мутантные варианты

5 TCR (мутанты 1–5 CDRa3 R7P1D5, включающие последовательности вариантов альфа-цепи SEQ ID NO: 40–44, соответственно) были экспрессированы в человеческих CD8+ Т-клетках после электропорации соответствующей мПНК, полученной путем транскрипции *in vitro* ПЦР-амплифицированных ДНК-конструкций. Для контроля экспрессировали TCR 1G4 (SEQ ID NO: 132 и 134), который направлен против пептида

10 NYESO1-001 (SEQ ID NO: 45) в комплексе с HLA-A*02. После ночной инкубации ПНК-электропорированных CD8+ Т-клеток экспрессию введенных вариантов TCR анализировали путем окрашивания меченными PE тетрамерами пептида-HLA-A*02 и меченным FITC анти-Vбета 8 антителом. Родительский TCR R7P1D5 и все производные от него варианты показали сходное окрашивание анти-Vbeta 8 по сравнению с

15 фоновыми уровнями, полученными от образца после имитации электропорации и контроля, Vbeta 8-негативного TCR NYESO1, что свидетельствует о сходной эффективности экспрессии. Напротив, окрашивание тетрамерами HLA-A*02/MAG-003 было значительно сильнее у всех мутантов CDRa3 R7P1D5 по сравнению с родительским TCR R7P1D5 (Фиг. 3), что указывает на улучшенное связывание пептида

20 с HLA у мутантных вариантов. Функциональная активация CD8+ Т-клеток (20 000 клеток/лунка), экспрессирующих различные варианты TCR R7P1D5, была исследована путем измерения опосредованного Т-клетками высвобождения IFN-гамма в ответ на целевые клетки Т2 (20 000 клеток/лунка), нагруженные либо серией разведений MAG-003 (Фигура 4), либо 10 мкМ MAG-003 и потенциальными нецелевыми

25 пептидами (Фигура 5). Потенциальные нецелевые пептиды были выбраны из базы данных связанных с HLA-A*02 с пептидов, представленных в нормальной ткани (база данных XPRESIDENT), на основании высокого сходства последовательностей (поиск сходства по BLAST) с MAG-003. По сравнению с родительским TCR R7P1D5, зрелые мутанты CDRa3 1–5 рецептора R7P1D5 показали повышенную реактивность (Фигура 4),

30 о чем свидетельствует снижение в 3–9 раз концентрации, необходимой для индуцирования полумаксимального высвобождения IFN-гамма (значения EC₅₀, Таблица 3). Как и ожидалось, только фоновое высвобождение IFN-гамма наблюдалось с Т-клетками, не экспрессирующими дополнительных количеств TCR (ИМИТАЦИЯ) или экспрессирующим контрольный TCR 1G4, специфичный для NYESO1-001. Для анализа

35 селективности распознавания MAG-003 зрелыми вариантами TCR R7P1D5 было проанализировано высвобождение IFN-гамма в ответ на Т2 клетки, нагруженные различными подобными пептидами (SEQ ID NO: от 23 до 34). Данные были

скорректированы с учетом фонового высвобождения IFN-гамма путем вычитания уровней IFN-гамма, высвобождаемого CD8⁺ Т-клетками после имитации электропорации при совместном культивировании с соответственно нагруженными Т2-клетками. За исключением мутанта 5 R7P1D5 CDRa3, который показал слегка

5 повышенный сигнал для нескольких подобных пептидов, и низкого сигнала мутанта 2 R7P1D5 CDRa3 против MIA3-001, все остальные зрелые варианты R7P1D5 TCR были высокоселективными, без перекрестной реактивности в отношении протестированных

10 подобных пептидов (Фигура 5). Поскольку все мутантные варианты TCR индуцировали значительно более высокий уровень специфического к MAG-003 высвобождения IFN-гамма по сравнению с родительским TCR, мутанты 4, 1 и 3 (и потенциально 2) CDRa3 R7P1D5 являются наиболее перспективными кандидатами для нацеливания на

15 опухоли с помощью TCR. Мутанты 1–5 CDRa3 R7P1D5 были дополнительно охарактеризованы в отношении их эпитопа связывания с помощью мутационного анализа. Мутанты 1–5 CDRa3 R7P1D5 были дополнительно охарактеризованы в

20 отношении их эпитопа связывания с помощью мутационного анализа. Для некоторых вариантов R7P1D5, таких как мутант 1, небольшой эффект наблюдался также при замене аланина в положении 3. В соответствии с более низкой специфичностью, продемонстрированной в отношении подобных пептидов, мутант 5 CDRa3 рецептора TCR R7P1D5 распознавал положения 7 и 8 с меньшей строгостью по

25 сравнению с мутантными вариантами 1–4 (рисунок 6). Функциональная активность мутантных вариантов CDRa3 TCR была далее оценена на линиях опухолевых клеток, представляющих различные количества копий HLA-A*02/MAG-003. РНК-электропорированные CD8⁺ Т-клетки культивировали совместно с опухолевыми

30 клеточными линиями при соотношении эффекторных и целевых клеток 3:1 (NCI-H1755, MCF-7: 25 000 клеток/лунка; Hs695T, A375, U2O: 12 500 клеток/лунка). Экспрессию введенных вариантов TCR в CD8⁺ Т-клетках проверяли, как описано выше. После совместного культивирования эффекторных и целевых клеток в течение 24 ч, были определены количественно уровни LDH и IFN-гамма, высвобожденных в супернатанты. Уровни LDH определяли с помощью наборов CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity

Assay Kit (PROMEGA), а цитотоксичность рассчитывали как процент от полного контроля лизиса после вычитания спонтанного высвобождения LDH эффекторными и целевыми клетками.

Все варианты мутантов CDRa3 рецептора TCR индуцировали более сильное уничтожение всех проанализированных линий опухолевых клеток по сравнению с

35 родительским TCR, в то время как не наблюдалась гибели клеток MCF-7, не содержащих мишень. Для линий опухолевых клеток, представляющих более низкое число копий мишеней (A375, U2OS), только минимальная цитотоксичность была обнаружена для

TCR дикого типа, в то время как особенно зрелые варианты 1-4 были способны вызвать значительный лизис, что указывает на то, что эти варианты позволят лечить популяции пациентов с низким числом целевых копий. В соответствии с данными цитотоксичности, также повышенное высвобождение IFN-гамма наблюдалось для Т-клеток, экспрессирующих зрелые варианты TCR, по сравнению с диким типом.

Таблица 3. Полумаксимальные концентрации высвобождения IFN-гамма [нМ] для родительского R7P1D5 и мутантных вариантов CDRa3 1–5 Родительский TCR R7P1D5 основан на последовательностях SEQ ID NO 2 и 11, а мутантные варианты TCR 1–5 основаны на последовательностях SEQ ID NO: 40–44, соответственно, и SEQ ID NO: 11.

Вариант	EC ₅₀ [нМ]
R7P1D5	9,5
CDRa3 R7P1D5, мутант 4	1,4
CDRa3 R7P1D5, мутант 1	2,1
CDRa3 R7P1D5, мутант 2	1,4
CDRa3 R7P1D5, мутант 3	1,1
CDRa3 R7P1D5, мутант 5	3,7

Пример 4. Получение, очистка и характеристика вариантов scTCR

TCR, состоящие из доменов Vальфа и Vбета, были разработаны, произведены и испытаны в одноцепочечном формате (scTCR) в сочетании с Fab-фрагментом, полученным из гуманизированного CD3-специфического рекрутирующего Т-клетки антитела UCNT1. Поэтому были созданы плазмиды, содержащие либо легкие цепи гуманизированных антител UCNT1 (SEQ ID No: 123 для варианта S и SEQ ID No: 80 для других вариантов, кроме S), либо соответствующие последовательности scTCR, соединенные с С-концом V_H-C_{H1} гуманизированного антитела UCNT1, под контролем промоторных элементов, полученных из HCMV.

Таблица 4. Комбинации последовательностей для генерации вариантов scTCR, экспрессированных в сочетании с Fab-фрагментом. Для целей трансфекции плазмиды, содержащие последовательность легкой цепи, смешивали с плазмидами, содержащими соответствующую последовательность тяжелой цепи Fab.

Вариант	Легкая цепь (SEQ ID No:)	Тяжелая цепь (SEQ ID No:)
S	123	124
I	80	126

№ 1	80	58
№ 2	80	76
№ 19	80	125
№ 20	80	60
№ 21	80	61
№ 29	80	67
№ 30	80	68
№ 31	80	69
№ 32	80	75

Плазмидную ДНК амплифицировали в *E. coli* в соответствии со стандартными способами культивирования и затем очищали с помощью коммерчески доступных наборов (Macherey & Nagel). Очищенную плазмидную ДНК использовали для транзиторной трансфекции клеток CHO-S в соответствии с инструкциями производителя (система ExpiCHO™; Thermo Fisher Scientific). Трансфицированные CHO-клетки культивировали 10–12 дней при 32 °C – 37 °C и с однократным добавлением подпитки ExpiCHO™ Feed.

Супернатант кондиционированных клеток осветляли путем фильтрации (0,22 мкм) с использованием Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid (Sartorius). Биспецифические антигенсвязывающие белки очищали с помощью системы Äkta Pure 25 L FPLC (GE Lifesciences), оборудованной для последовательного проведения аффинной и эксклюзионной хроматографии на одной линии. Аффинная хроматография проводилась на колонках protein L (GE Lifesciences) в соответствии со стандартными протоколами аффинной хроматографии. Эксклюзионную хроматографию проводили непосредственно после кислотной элюции (pH 2,8) с аффинной колонки для получения высокочистого мономерного белка с использованием колонок Superdex 200 pg 16/600 (GE Lifesciences) по стандартным протоколам. Концентрацию белка определяли на системе NanoDrop (Thermo Scientific) с использованием рассчитанных коэффициентов экстинкции в соответствии с предсказанными последовательностями белков. При необходимости концентрацию корректировали с помощью приборов Vivaspin (Sartorius). Наконец, очищенные молекулы хранили в фосфатно-солевом буферном растворе (DPBS, pH 7,2) с концентрацией около 1 мг/мл при температуре 2–8 °C. Продуктивность каждой молекулы оценивали, рассчитывая выход в единицах [миллиграмм очищенного белка/литр клеточного супернатанта].

Качество очищенных антигенсвязывающих белков scTCR-Fab определяли методом эксклюзионной ВЭЖХ на колонках MabPac SEC-1 (5 мкм, 7,8x300 мм), работающих в 50 mM растворе натрий-фосфата с pH 6,8, содержащем 300 mM NaCl, в системе

Vanquish uHPLC-System. Длина волны детектора была установлена на 214 нм. По той же методике были проанализированы образцы соответствующих молекул, подвергшиеся тепловому стрессу (после хранения в течение 7 или 14 дней при 40°C в растворе DPBS с концентрацией 1 мг/мл). Индуцированные агрегаты рассчитывали как [% агрегатов после стрессового воздействия] – [% агрегатов до стрессового воздействия]. Извлечение мономера рассчитывали как [площадь пика мономера после стрессового воздействия]/[площадь пика мономера до стрессового воздействия] x 100 %. Как показано на Фигуре 7А, между различными вариантами scTCR наблюдались выраженные различия по выходу продукта (левая панель) и стабильности при тепловом стрессе. Стабилизированный вариант scTCR S (SEQ ID No: 124), содержащий CDR-последовательности дикого типа в сочетании с двумя каркасными мутациями (aS19A, aF57Y), мог экспрессироваться только на низких уровнях. Повышенные уровни экспрессии и повышенная устойчивость к тепловому стрессу могут быть достигнуты после включения аффинно зрелых последовательностей CDRa2, CDRa3 и CDRb1 (вариант №1) и аффинно зрелых последовательностей CDRa2, CDRa3 и CDRb1 вместе с аффинно зрелой последовательностью CDRb2 в сочетании с мутацией прилегающего каркаса bI66C (вариант I). С использованием обоих CDR-зрелых вариантов scTCR, I и №1, были протестированы дополнительные модификации каркасных областей для улучшения выхода экспрессии и стабильности при тепловом стрессе. Включение 3 каркасных мутаций (aL50P, bM46P и bM47G) в вариант №1 привело к созданию варианта №30 с повышенным выходом продукта, этот вариант можно дополнительно улучшить заменой каркасной мутации aS19A на aS19V (вариант №32). Влияние мутации aS19A или aS19V подчеркивается вариантом №29, представляющим собой вариант №32 с обратной мутацией aS19, что привело к значительному снижению продуктивности и повышению уровня агрегации. Примечательно, что последний негативный эффект обратной мутации aS19 на выход продукта может быть обращен введением мутации каркаса aA48K (вариант №31). В контексте CDR-зрелого scTCR варианта I, дополнительная мутация каркаса bI54F (вариант №19) и мутация bN109D в CDR3 бета-цепи (вариант №20) были протестированы отдельно и в комбинации (вариант №21). Мутация bN109D в CDRb3 преобразует NT-мотив, который потенциально подвержен деамидированию Asn-остатка, в DT-мотив, что может оказаться полезным с точки зрения подходов к дизайну для устранения помех в последовательностях CDR. Введение каркасной мутации bI54F в вариант I (вариант №19) привело к повышению выхода и улучшению стабильности scTCR в условиях теплового стресса. Дополнительное введение мутации bN109D в CDRb3 в вариант № 19 привело к созданию варианта scTCR № 21, еще более устойчивого к тепловому стрессу, хотя одна только мутация bN109D (вариант № 20)

показала лишь незначительное улучшение продуктивности и аналогичную стабильность по сравнению с вариантом I.

- Антигенсвязывающие белки scTCR-Fab были проанализированы на аффинность связывания с антигенным пептидом MAGE-A с SEQ ID NO: 1 в комплексе с HLA-A*02 с помощью биослойной интерферометрии. Измерения проводились на системе Octet RED384 с использованием настроек, рекомендованных производителем. В нескольких словах, кинетику связывания измеряли при 30°C и скорости встряхивания 1000 об/мин, с использованием в качестве буфера PBS, 0,05 % Tween-20, 0,1 % BSA.
- Биспецифические молекулы загружали на биосенсоры (FAB2G) перед анализом серийных разведений комплекса пептид-HLA-A*02. Биспецифический антигенсвязывающий белок, включающий стабилизированный вариант scTCR S (SEQ ID NO: 123 и 124), показал только очень слабые сигналы связывания до концентрации 500 нМ (Фигура 7B, Таблица 5). Введение аффинно-зрелых последовательностей CDRa2, CDRa3 и CDRb1 (вариант №1 и вариант №2) значительно улучшило связывание с комплексом пептид-мишень-MHC. Для вариантов №1 (SEQ ID NO: 80, 58) и №2 (SEQ ID NOs: 80, 76) были определены значения K_D 2–3 нМ. Дополнительное включение зрелой последовательности CDRb2 вместе с каркасной мутацией b166C в вариант scTCR №2 привело к дополнительному улучшению аффинности связывания с измеренным K_D =150 пМ для варианта I (SEQ ID NO: 80 и 126).

Таблица 5. Каркасные мутации, комбинации CDR и значения K_D вариантов S (SEQ ID NO: 123 и 124), №1, №2 и I (SEQ ID NO: 80 в сочетании с 58, 76 или 126, соответственно). Значения K_D были измерены методом биослойной интерферометрии.

Вариант TCR	CDRa1	CDRa2	CDRa3	CDRb1	CDRb2	CDRb3	K_D [M]
S aS19A	DSSSTY SEQ ID NO 5	IYSNMDM SEQ ID NO 21	CAEYSSASKIIF SEQ ID NO 7	SGHDY SEQ ID NO 12	FNNNVP SEQ ID NO 13	CASRANTGELFF SEQ ID NO 14	.*
№ 1 aS19A	DSSSTY SEQ ID NO 5	IYSSQDQ SEQ ID NO 56	CAEMTSESKIIF SEQ ID NO 35	PGHDY SEQ ID NO 62	FNNNVP SEQ ID NO 13	CASRANTGELFF SEQ ID NO 14	2,35E-09
№ 2 aS19A	DSSSTY SEQ ID NO 5	IYSSQDS SEQ ID NO 59	CAEMTSESKIIF SEQ ID NO 35	PGHDY SEQ ID NO 62	FNNNVP SEQ ID NO 13	CASRANTGELFF SEQ ID NO 14	2,69E-09

I	DSSSTY	IYSSQDS	CAEMTSESKIIF	PGHDY	FCYGTP	CASRANTGELFF	1,53E-
aS19A	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID NO 35	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID NO 14	10
bl66C	NO 5	NO 59		NO 62	NO 65		

* нет соответствующих сигналов связывания до 500 нМ

Антигенсвязывающие белки scTCR-Fab были дополнительно охарактеризованы в отношении их специфичности путем анализа связывания с потенциальными нецелевыми пептидами в комплексе с HLA-A*02. Потенциальные нецелевые пептиды были выбраны из базы данных пептидов, презентированных в нормальных тканях, связанных с HLA-A*02 (база данных XPRESIDENT) на основе сходства последовательностей, определенного с помощью поиска сходства по BLAST. Связывание анализировали с помощью биослойной интерферометрии, по существу как описано выше. Сигналы связывания всех взаимодействий определяли при концентрации 1 мкМ биспецифического scTCR-Fab с использованием биосенсоров HIS1K для загрузки комплексов пептид-HLA-A*02. Потенциальные нецелевые пептиды анализировали в отношении их реакции связывания в конце фазы ассоциации. По сравнению с вариантом I scTCR (SEQ ID NO: 80, 126), вариант №19 (SEQ ID NO: 80, 125), включающий дополнительную каркасную мутацию bl54F, показал улучшенную специфичность связывания (Фигура 7C, Таблица 6), помимо улучшенного выхода продукции и стабильности, как показано выше. В то время как кривые связывания для MAG-003 (SEQ ID NO: 1) были подобны для обоих вариантов (Фигура 7C), вариант № 19 показал отмену связывания с нецелевыми пептидами SYNE3-001 (SEQ ID NO: 27), TPX2-001. (SEQ ID NO: 26) и PSME2-001 (SEQ ID NO: 30), что видно по отсутствию сигналов связывания (Таблица 6).

Таблица 6: Специфичность антигенсвязывающих белков scTCR-Fab с вариантом I scTCR (SEQ ID NO: 80, 126) и вариантом № 19 (SEQ ID NO: 80, 125). Кинетику связывания 1 мкМ биспецифика измеряли с помощью биослойной интерферометрии. Показаны ответы в конце фазы ассоциации (в нм или в % от сигнала MAG-003).

	I		№ 19	
Ид. № загрузочно-го образца	Ответ	Ответ (% от MAG-003)	Ответ	Ответ (% от MAG-003)
MAG-003	0,738	100,0	0,719	100,0
SYNE3-001	0,226	30,6	-0,006	-0,9
TPX2-001	0,136	18,4	-0,003	-0,3
PSME2-001	0,074	10,0	-0,010	-1,4

Пример 5: Производство, очистка и характеристика биспецифических молекул TCER™

На Фигуре 15 показана биспецифическая молекула TCER™ в соответствии с одним вариантом реализации настоящего раскрытия. Биспецифические Т-клеточные рецепторы (TCER™) представляют собой слитые белки, содержащие переменные домены ($V\alpha$, $V\beta$) аффинно зрелого TCR и переменные домены (VH , VL) гуманизированного рекрутирующего Т-клетки антитела. В молекулах используется F_c -часть с выключенной эффекторной функцией, что обеспечивает увеличенный период полувыведения, а также улучшенные характеристики стабильности/технологичности.

Биспецифические молекулы TCER™ были сконструированы на основе отобранных переменных доменов альфа- и бета-цепей TCR с предпочтительными мутациями CDR и каркаса, как описано в примере 4. Соответствующие переменные домены TCR варианта scTCR №21 были объединены с выгодными каркасными мутациями $\alpha S19V$ и $\alpha A48K$, что привело к варианту TCR №114-iso0 (SEQ ID NO: 138 и SEQ ID No: 150). Для дальнейшей оптимизации последовательности переменного домена TCR № 114-iso0 были заменены два потенциальных сайта изомеризации (DS-мотивы), расположенные в CDR α 1 ($\alpha D27E$) и CDR α 2 ($\alpha S65Q$), соответственно, что привело к получению вариантов TCR № 114-iso1 (SEQ ID NO: 151 и SEQ ID No: 150) и 114-iso2 (SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 150), имеющих одну или ни одной, соответственно, консенсусной последовательности посттрансляционной модификации в CDR. Вышеописанные переменные домены вариантов TCR №114-iso0, №114-iso1 и №114-iso2 были объединены с VL - и VH -доменами, полученными из вариантов, полученных из двух новых гуманизированных рекрутирующих Т-клетки антител BMA031(36) (SEQ ID NO: 159 и 160), UCHT1(17) (SEQ ID NO: 153 и 154) и различных вариантов UCHT1(17) UCHT1(17opt) (SEQ ID No: 153 и 162), UCHT1(21) (SEQ ID No: 153 и 164) и UCHT1(23) (SEQ ID No: 153 и 156), соответственно.

Используя формат TCR/диатело- F_c , авторы изобретения сконструировали молекулы TCER™ (типичные полноразмерные последовательности, представлены в Таблице 7) и соответствующие векторы с моноцистронными, контролируемыми HCMV-производными промоторными элементами, pUC19-производными. Плазмидную ДНК амплифицировали в *E.coli* в соответствии со стандартными методами культивирования и затем очищали с помощью коммерческих наборов (Macherey & Nagel). Очищенную плазмидную ДНК использовали для транзиторной трансфекции клеток CHO-S с помощью системы электропорации (MaxCyte STX). Трансфицированные CHO-клетки культивировали 10–12 дней при 32°C–37°C с добавлением от одного до трех раз подпитки Cellboost 7a и 7b (GE Healthcare™).

Таблица 7. Комбинация последовательностей переменных доменов TCR и последовательностей переменных доменов рекрутирующих Т-клетки антител для создания соответствующих вариантов молекул TCER™. Для трансфекции смешивали плазмиды, содержащие цепь А, и плазмиды, содержащие цепь В.

Молекула TCER™	Цепь А SEQ ID No:	Цепь В SEQ ID No:
114-iso0-UCHT1(17)	127	130
114-iso1-UCHT1(17)	131	130
114-iso2-UCHT1(17)	133	130
114-iso0-BMA(36)	135	136
114-iso1-BMA(36)	137	136
114-iso2-BMA(36)	139	136

5

Супернатант кондиционированных клеток осветляли путем фильтрации (0,22 мкм) с использованием Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid (Sartorius). Биспецифические антигенсвязывающие белки очищали с помощью системы Äkta Pure 25 L FPLC (GE Lifesciences), оборудованной для последовательного проведения аффинной и эксклюзионной хроматографии на одной линии. Аффинная хроматография проводилась на колонках MAbSelect SuRE или protein L (GE Lifesciences) в соответствии со стандартными протоколами аффинной хроматографии. Эксклюзионную хроматографию проводили непосредственно после элюции (pH 2,8) с аффинной колонки для получения высокочистого мономерного белка с использованием колонок Superdex 200 pg 26/600 (GE Lifesciences) по стандартным протоколам. Концентрацию белка определяли на системе NanoDrop (Thermo Scientific) с использованием рассчитанных коэффициентов экстинкции в соответствии с предсказанными последовательностями белков. При необходимости концентрацию корректировали с помощью приборов Vivaspin (Sartorius). Наконец, очищенные молекулы хранили в фосфатно-солевом буферном растворе с концентрацией около 1 мг/мл при температуре 2-8°C.

10

15

20

Качество очищенных биспецифических антигенсвязывающих белков определяли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ на колонках MabPac SEC-1 (5 мкм, 4x300 мм), работающих в 50 мМ растворе натрий-фосфата pH 6,8, содержащем 300 мМ NaCl, в системе Vanquish uHPLC-System. Длина волны детектора была установлена на 214 нм.

25

Индукцированные агрегаты рассчитывали как [% агрегатов после стрессового воздействия] – [% агрегатов до стрессового воздействия]. Извлечение мономера рассчитывали как [площадь пика мономера после стрессового воздействия]/[площадь пика мономера до стрессового воздействия] x 100 %.

Данные по продуктивности и стрессоустойчивости различных молекул TCER™ представлены на Фигуре 8А. Все варианты, за исключением варианта 114-iso1-UCHT1(17opt), показали выход продукта более 10 мг/л (Фигура 8, левая панель). Испытание молекул в условиях теплового стресса при 40 °С показало стабильность от

очень хорошей до приемлемой для всех полученных молекул TCER™, демонстрируя менее 10 % агрегатообразования после 14 дней тепловой нагрузки (Фигура 8А, правая панель).

С помощью биослойной интерферометрии биспецифические антигенсвязывающие белки TCER™, включающие варианты TCR 114-iso0, 114-iso1 и 114-iso2 в комбинации с UCHT1(17) и BMA031(36), соответственно (как показано в Таблице 7), были охарактеризованы с точки зрения их аффинности к пептиду антигена MAGE-A (SEQ ID NO: 1) в комплексе с HLA-A*02 (Фигура 8А, Таблица 8). Измерения проводились на системе Octet RED384 с использованием настроек, рекомендованных производителем. В нескольких словах, кинетику связывания измеряли при 30°C и скорости встряхивания 1000 об/мин, с использованием в качестве буфера PBS, 0,05 % Tween-20, 0,1 % BSA. Комплексы пептид-HLA-A*02 загружали на биосенсоры (HIS1K) перед анализом серийных разведений биспецифических молекул TCER™. Варианты TCER™ 114-iso0, 114-iso1 и 114-iso2 прочно связываются с MAG-003 в комплексе с HLA-A*02 со сравнимыми значениями K_D 1,8 нМ, 2,0 нМ и 2,3 нМ, соответственно, что указывает на то, что на связывание HLA-A*02/MAG-003 не влияет удаление двух сайтов изомеризации в CDRa1 (aD27E) и CDRa2 (aS65Q) варибельного домена альфа-цепи TCR.

Таблица 8. Анализ аффинности вариантов TCER™ 114-iso0, 114-iso1 и 114-iso2 в комбинации с UCHT1 (17) и BMA031 (36), как показано в Таблице 7. Значения K_D были измерены методом биослойной интерферометрии.

	UCHT1(17)			BMA031(36)		
	114-iso0	114-iso1	114-iso2	114-iso0	114-iso1	114-iso2
K_D (MAG-003) [M]	1,79E-09	1,97E-09	2,32E-09	1,79E-09	1,97E-09	2,42E-09

Варианты TCR 114-iso0, 114-iso1 и 114-iso2 были дополнительно охарактеризованы с точки зрения их специфичности путем анализа связывания с нецелевыми пептидами, полученными из нормальной ткани, с использованием биослойной интерферометрии. Измерения проводили, как описано выше. Были определены аффинность связывания 114-iso0-UCHT1(17) с MAG-003 (SEQ ID NO: 1) и нецелевыми пептидами CNOT1-003 (SEQ ID NO: 32), COL6A3-010 (SEQ ID NO: 179), FAM115A-001 (SEQ ID NO: 180), HEATR5A-001 (SEQ ID NO: 31), HERC4-001 (SEQ ID NO: 29), INTS4-002 (SEQ ID NO:

171), PHTF2-001 (SEQ ID NO: 181), PPP1CA-006 (SEQ ID NO: 173), RPL-007 (SEQ ID NO: 174), RPP1-001 (SEQ ID NO: 182), SAMH-001 (SEQ ID NO: 172), SETD1A-001 (SEQ ID NO: 175) в комплексе с HLA-A*02 и рассчитаны окна аффинности. Окна аффинности находились в диапазоне от более чем 200-кратного до полного отсутствия нецелевого связывания (Таблица 9). Специфичность 114-iso1-BMA(36) и 114-iso2-UCHT1(17) анализировали путем измерения сигналов связывания MAG-003 (SEQ ID NO: 1) и нецелевых пептидов ODC-001 (SEQ ID NO: 178), NOMAP-1-0320 (SEQ ID NO: 176) и NOMAP-1-1223 (SEQ ID NO: 177) в комплексе с HLA-A*02 при концентрации TCER™ 1 мкМ (рисунок 8С, таблица 10). Были обнаружены реакции связывания, составляющие 1 % от сигнала MAG-003 или ниже, что свидетельствует о высокой специфичности вариантов TCR к MAG-003.

Таблица 9. Специфичность молекулы 114-iso0-UCHT1 TCER™ (17). Значения K_D были измерены методом биослойной интерферометрии с анализом серийных разведений 114-iso0-UCHT1 (17) (500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ). Окна аффинности рассчитывали как K_D (подобный пептид)/ K_D (MAG-003).

	K_D [M]	K_D (подобный пептид)/ K_D (MAG-003)
MAG-003	1,56E-09	-
CNOT1-003	1,64E-06	1050
COL6A3-010	9,03E-07	579
FAM115A-001	7,84E-07	503
HEATR5A-001	3,70E-07	238
HERC4-001	4,91E-07	315
INTS4-002	1,98E-06	1273
PHTF2-001	1,02E-06	656
PPP1CA-006	нет связывания	нет связывания
RPL-007	нет связывания	нет связывания
RPP1-001	8,97E-07	576
SAMH-001	2,11E-06	1356
SETD1A-001	нет связывания	нет связывания

Таблица 10. Специфичность молекул TCER™ 114-iso1-BMA(36) и 114-iso2-UCHT1(17). Кинетику связывания 1 мкМ TCER™ измеряли методом биослойной интерферометрии. Показаны ответы в конце фазы ассоциации (в нМ или в % от сигнала MAG-003).

	114-iso1-BMA(36)		114-iso2-UCHT1(17)	
Ид. № загрузочного образца	Ответ	Ответ (% от MAG-003)	Ответ	Ответ (% от MAG-003)
MAG-003	0,8246	100,0	0,8233	100,0
ODC-001	0,0061	0,7	0,0104	1,3
NOMAP-1-0320	0,0025	0,3	0,0025	0,3
NOMAP-1-1223	0,0005	0,1	0,0057	0,7

Пример 6. TCER™-опосредованное уничтожение MAG-003-положительных и опухолевых клеточных линий

Зрелые варианты TCR были экспрессированы в виде растворимых молекул TCER™ № 114-iso0-UCHT1(17), № 114-iso1-UCHT1(17), № 114-iso2-UCHT1(17), № 114-iso0-BMA031(36), № 114-iso1-BMA031(36) и № 114-iso2-BMA031(36) с использованием формата диателы TCR/анти-CD3 – F_c (см. также Таблицу 7). Цитотоксическая активность биспецифических молекул TCER™ против MAG-003-положительных и MAG-003-отрицательных линий опухолевых клеток, соответственно, была проанализирована с помощью анализа высвобождения LDH. Таким образом, линии опухолевых клеток, представляющие различные количества молекул HLA-A*02/MAG-003 на клеточной поверхности, совместно инкубировали с МКПК от здоровых HLA-A*02+ доноров в присутствии возрастающих концентраций молекул TCER™. Через 48 часов лизис целевых клеточных линий измеряли с помощью наборов CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (PROMEGA). Как можно видеть на Фигуре 9 и Фигуре 10, молекулы TCER™ показали эффективный лизис MAG-003-положительных опухолевых клеточных линий Hs695T, A375 и U2OS, экспонируя 1100, 230 и 120 копий на опухолевую клетку, соответственно, согласно результатам количественного определения комплексов HLA-A*02/MAG-003 методом масс-спектрометрии. Для анализа методом киллинга использовали МКПК от двух здоровых доноров (HBC-720 на Фигуре 9 и HBC-982 на Фигуре 10). В тех же экспериментах на клеточной линии BV-173, экспрессирующей HLA-A*02, но не представляющей пептид MAG-003 на детектируемых уровнях, биспецифические молекулы TCER™ не вызывали лизиса клеток или вызывали его в незначительной степени, что указывает на специфичность доменов TCR.

Пример 7. Эффективность *in vivo* у мышей NOG с опухолевым ксенотрансплантатом

Для проверки способности молекул TCER™ стимулировать активность иммунных Т-клеток человека посредством специфического связывания с Т-клеточным антигеном и специфического связывания с опухолеспецифическим HLA-пептидным комплексом на раковых клетках человека было проведено фармакодинамическое исследование на линии мышей NOG с тяжелым иммунодефицитом. Мышам штамма NOG, которым была введена подкожная инъекция линии опухолевых клеток человека HS695T, вводили внутривенно ксенотрансплантаты мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека (МКПК). МКПК человека (1×10^7 клеток/мышь) трансплантировали в течение 24 часов, когда объем опухоли Hs695T достиг 50 мм^3 , как было рассчитано после измерения штангенциркулем. Лечение начинали в течение одного часа после трансплантации клеток крови человека. Восемь-десять самок мышей в каждой группе (рандомизированных по размеру опухоли) получали внутривенные болюсные инъекции (5 мл/кг массы тела, дважды в неделю, шесть доз) в хвостовую вену. Вводимая доза молекул TCER™ составляла 0,5 (группа 2) и 0,05 (группы 3 и 4) мг/кг веса тела на инъекцию; контрольной группе (группа 1), получавшей носитель, вводили PBS. Как показано на Фигуре 11 для отдельных мышей, лечение молекулами TCER™ вызывало выраженные противоопухолевые реакции. Лечение молекулой TCER™ (SEQ ID NO: 169 и 170), нацеленной на PRAME-004 (SEQ ID NO: 168, группа 2), выраженно подавляло рост опухоли, о чем свидетельствует уменьшение роста среднего объема опухоли от исходного уровня (начало рандомизации) 90 мм^3 до 209 мм^3 на 25-й день по сравнению с ростом, наблюдаемым в контрольной группе 1 введения носителя от исходного уровня 74 мм^3 до 1081 мм^3 на 25-й день. Лечение TCER™, нацеленным на MAG-003 (SEQ ID NO: 127 и 130, группа 3; SEQ ID NO: 135 и 136, группа 4) привело к полной ремиссии опухоли Hs695T у всех мышей на 18-й день и до конца исследования на 25-й день по сравнению с исходными уровнями 86 мм^3 (группа 3) и 80 мм^3 (группа 4) в день рандомизации.

Пример 8. Безопасность *in-vitro* на первичных здоровых клетках

Профиль безопасности молекулы TCER™ 114-iso1-BMA(36) был оценен в экспериментах по измерению уровня LDH при уничтожении клеток с первичными клетками нормальных тканей человека из различных органов. На Фигуре 12 представлены результаты совместного культивирования 11 первичных клеток различных здоровых тканей (HLA-A*02+) с эффекторными клетками МКПК от здоровых HLA-A*02+ доноров в соотношении 1:10 в присутствии возрастающих концентраций TCER™. Клетки коинкубировали в смеси 1:1 специфичной среды для первичных клеток

нормальной ткани и среды для Т-клеток. Для определения окна безопасности молекулы TCER™ инкубировали в идентичных условиях совместно с MAG-003-положительной опухолевой клеточной линией Hs695T в соответствующей комбинации сред первичных клеток нормальной ткани. После 48 часов совместного культивирования супернатанты собирали и анализировали лизис опухолевых клеток путем измерения высвобождения LDH с помощью набора LDH-Glo™ (Promega).

На Фигуре 12 каждый график цитотоксичности показывает высвобождение LDH первичными клетками нормальной ткани (пустые кружки) по сравнению с контрольной опухолевой клеточной линией Hs695T (закрашенные кружки) в той же комбинации сред после совместного инкубирования с МКПК и возрастающими концентрациями молекулы TCER. Во всех случаях реакция против первичных клеток нормальной ткани была слишком низкой для расчета EC_{50} . Вместо этого мы определили окно безопасности на основе наименьшего наблюдаемого уровня воздействия (LOEL), определенного как первая концентрация TCER™, которая дала реакцию, превышающую пороговое значение. Пороговое значение было определено как ([стандартное отклонение всех трипликатов $\times 3$] + результат контрольного образца нормальной ткани без TCER™) и показано пунктирной линией на каждом графике цитотоксичности. Для клеток каждого типа нормальной ткани окно безопасности на основе LOEL было определено как более чем 1000-кратное.

Профиль безопасности молекулы TCER™ 114-iso1-BMA(36) был оценен во втором эксперименте по измерению уровня LDH при уничтожении клеток с 12 первичными клетками различных здоровых тканей (HLA-A*02+), некоторые из которых перекрывались с первым экспериментом. Были использованы экспериментальные условия, описанные выше.

На Фигуре 16 каждый график цитотоксичности показывает высвобождение LDH первичными клетками нормальной ткани (пустые кружки) по сравнению с контрольной опухолевой клеточной линией Hs695T (закрашенные кружки) в той же комбинации сред после совместного инкубирования с МКПК и возрастающими концентрациями молекулы TCER. Во всех случаях реакция против первичных клеток нормальной ткани была слишком низкой для расчета EC_{50} . Вместо этого мы определили окно безопасности на основе наименьшего наблюдаемого уровня воздействия (LOEL), определенного как первая концентрация TCER™, которая дала реакцию, превышающую пороговое значение. Пороговое значение было определено как ([стандартное отклонение всех трипликатов $\times 3$] + результат контрольного образца нормальной ткани без TCER™) и показано пунктирной линией на каждом графике цитотоксичности. Для клеток каждого типа нормальной ткани окно безопасности на основе LOEL было определено как более чем 1000-кратное.

Пример 9. Эффективность лечения *in vivo* при введении один раз в неделю у мышей NOG с опухолевым ксенотрансплантатом

Для проверки способности молекул TCER™ стимулировать активность иммунных Т-клеток человека посредством специфического связывания с Т-клеточным антигеном и специфического связывания с опухолеспецифическим HLA-пептидным комплексом на раковых клетках человека было проведено фармакодинамическое исследование на линии мышей NOG с тяжелым иммунодефицитом. Мышам линии NOG, которые были хозяевами для развития подкожно введенных опухолевых клеток человека линии Hs695T, вводили внутривенно ксенотрансплантаты мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК). МКПК человека (1×10^7 клеток/мышь) трансплантировали в течение 24 часов, когда объем опухоли Hs695T достиг 50 мм^3 , как было рассчитано после измерения штангенциркулем. Лечение начинали в течение одного часа после трансплантации клеток крови человека. Шесть-десять самок мышей на группу (рандомизированных в зависимости от размера опухоли) получали внутривенные болюсные инъекции (5 мл/кг массы тела, один раз в неделю, три дозы) в хвостовую вену. Вводимая доза молекул TCER™ составляла 0,01 мг/кг массы тела на инъекцию (группы 2 и 3); контрольной группе (группа 1), получавшей носитель, вводили PBS. Как показано на Фигуре 13, лечение молекулами TCER™ вызывало выраженный противоопухолевый ответ. Лечение MAG-003 молекулами TCER™ 114-iso1-BMA(36) (SEQ ID NO: 137 и 136, группа 2) и 114-iso1-UCHT1(V17opt) (SEQ ID NO: 131 и 167, группа 3) привело к ремиссии опухоли Hs695T у всех мышей на 21-й день. Рост опухоли был сильно подавлен, о чем свидетельствует уменьшение роста среднего объема опухоли от исходных уровней (начало рандомизации) 84 мм^3 до 8 мм^3 (группа 2) и от 83 мм^3 до 14 мм^3 (группа 3) на 21-й день по сравнению с увеличением, наблюдаемым в контрольной группе (группа 1), получавшей носитель, от исходного уровня 85 мм^3 до 1024 мм^3 на 21-й день. Полная ремиссия наблюдалась у 2 мышей из группы 2 и 2 мышей из группы 3.

Пример 10. Фармакокинетика *in vivo* у мышей NOG

Фармакокинетические свойства TCER™ 114-iso1-UCHT1(17) (SEQ ID NO: 130 и 131) были проанализированы у мышей NOG с тяжелым иммунодефицитом, получивших однократную внутривенную инъекцию в дозе 2 мг/кг массы тела. Образцы плазмы собирали из ретробульбарного сплетения в моменты времени 0 ч, 0,1 ч, 2 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 120 ч, 240 ч и 360 ч. Уровни 114-iso1-UCHT1(17) в плазме определяли методом ИФА с использованием двух различных схем анализа (анализ $F_c - V_L$ и анализ CD3 – рМНС). При использовании схемы анализа $F_c - V_L$ уровень TCER™ в плазме определяли

количественно путем выявления соответствующих белковых субъединиц. В нескольких словах, козы антитела к F_c-фрагменту IgG человека наносили с использованием концентрации 2 мкг/мл в PBS и выдерживали при 4 °C в течение ночи. Оставшиеся сайты связывания блокировали с помощью PBS, содержащего 2 % BSA. Образцы, разведенные в блокирующем буфере, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре перед детекцией с помощью Protein L-HRP и раствора субстрата TMB. С помощью анализа CD3 – pMHC определяли уровень TCER™ 114-iso1-UCHT1(17) в плазме крови по его биспецифической активности связывания, путем измерения только тех молекул, которые способны связываться одновременно с обеими молекулами-мишенями. CD3δε- F_c был получен путем слияния внеклеточных доменов человеческих CD3δ и CD3ε с N-концом F_c-доменов в пределах TCER™-конструкций (содержащих мутации типа «выступ-во-впадину» и дополнительную C-концевую His-метку). Молекулы CD3δε- F_c экспрессировали в клетках ExpiCHO и очищали с помощью аффинной хроматографии с Protein A и последующей эксклюзионной хроматографии, как описано выше. CD3δε- F_c наносили в концентрации 1 мкг/мл в PBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. Блокирование и инкубацию образцов проводили, как описано выше, после чего выполняли двухэтапное определение с использованием HLA-A*02/MAG-003 и антител к b2m, меченых HRP. Концентрации образцов в плазме определяли путем интерполяции по соответствующим стандартным кривым. Обе схемы анализа показали сходные концентрации TCER™ в плазме, что свидетельствует о сохранении целостности белка и связывающей активности молекулы в плазме (рисунок 14). Линейная регрессия с временными точками 24 ч, 48 ч, 120 ч, 240 ч и 360 ч показала, что конечный период полувыведения в плазме составляет 150 ч. Результаты показывают, что период полувыведения (T_{1/2}) 114-iso1-UCHT1 (17) составляет около 6-7 дней.

Пример 11. Обнаружение пептида MAG-003 в первичных тканях методом масс-спектрометрии

Молекулы HLA из образцов тканей, подвергшихся шоковой заморозке, были очищены, и были выделены HLA-ассоциированные пептиды. Выделенные пептиды были разделены, и последовательности были идентифицированы с помощью жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) в режиме ионизации в наноэлектроспрее (nanoESI). MAG-003, идентифицированный в нескольких образцах тканей, был определен количественно с помощью подсчета ионов по данным ЖХ-МС без использования метки. Метод предполагает, что площадь сигнала пептида в ЖХ-МС коррелирует с его содержанием в образце. Все количественные сигналы пептида в различных ЖХ-МС экспериментах были нормализованы на основе центральной тенденции, усреднены для каждого образца и объединены в график, называемый профилем презентации. Профиль презентации объединяет различные методы анализа,

такие как поиск в базе данных белков, спектральная кластеризация, деконволюция зарядового состояния (разрядка) и выравнивание времени удерживания. Все автоматически полученные количественные и качественные данные были проверены вручную (см. Фигуру 18).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с антигенным пептидом MAGE-A, включающим или состоящим из аминокислотной последовательности «KVLEHVVRV» с SEQ ID NO: 1, где указанный антигенный пептид находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), причем антигенсвязывающий белок содержит

а) первую полипептидную цепь, содержащую первый переменный домен, содержащий три определяющие комплементарность области (CDR): CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

- CDRa1 включает или состоит из аминокислотной последовательности «X₁SSSTY» с SEQ ID NO: 72, где X₁ представляет собой любую аминокислоту, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 72 по меньшей мере одной аминокислотной заменой,

- CDRa2 включает или состоит из аминокислотной последовательности «IX₁SX₂X₃DX₄» с SEQ ID NO: 73, где от X₁ до X₄ представляет собой любую аминокислоту,

- CDRa3 включает или состоит из аминокислотной последовательности «CAEX₁X₂SX₃SKIIF» с SEQ ID NO: 77, где от X₁ до X₃ представляет собой любую аминокислоту, при условии, что CDRa3 не включает или не состоит из аминокислотной последовательности «CAEYSSASKIIF» (SEQ ID NO: 7), если CDRa1 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 и CDRa2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, предпочтительно при условии, что CDRa3 не включает или не состоит из аминокислотной последовательности «CAEYSSASKIIF» (SEQ ID NO: 7),

б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй переменный домен, содержащий три CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где

- CDRb1 включает или состоит из аминокислотной последовательности «X₁GHDY» с SEQ ID NO: 78, где X₁ представляет собой любую аминокислоту, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 78 по меньшей мере одной аминокислотной заменой,

- CDRb2 включает или состоит из аминокислотной последовательности «FX₁X₂X₃X₄P» SEQ ID NO: 79, где от X₁ до X₄ представляет собой любую аминокислоту, и

- CDRb3 включает или состоит из аминокислотной последовательности «CASRAX₁TGELFF» с SEQ ID NO: 82, где X₁ представляет собой любую

аминокислоту, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 82 по меньшей мере одной аминокислотной заменой.

2. Антигенсвязывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок специфически связывается с аминокислотной последовательностью «KVLEHVVRV» с SEQ ID NO: 1 указанного антигенного пептида, и где указанный антигенный пептид находится в комплексе с белком МНС, и где, предпочтительно, белок МНС является белком человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), предпочтительно HLA-A*02.
3. Антигенсвязывающий белок по пункту 1 или 2, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок специфически связывается с эпитопом, включающим или состоящим по меньшей мере из трех аминокислотных позиций антигенного пептида MAGE-A с SEQ ID NO: 1, предпочтительно по меньшей мере из трех аминокислотных позиций, выбранных из группы аминокислотных позиций, состоящей из аминокислотных позиций 1, 5, 7 и 8 или 1, 3, 5 и 7 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.
4. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пп. 1–3, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывается с комплексом указанного антигенного пептида MAGE-A, включающего или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и HLA-A*02, с $K_D \leq 100 \text{ мкМ}$, $\leq 50 \text{ мкМ}$, $\leq 30 \text{ мкМ}$, $\leq 25 \text{ мкМ}$, $\leq 1 \text{ мкМ}$, $\leq 500 \text{ нМ}$, $\leq 100 \text{ нМ}$, $\leq 50 \text{ нМ}$, $\leq 10 \text{ нМ}$, предпочтительно от 50 пМ до 100 мкМ, от 50 пМ до 10 мкМ, от 50 пМ до 1 мкМ, более предпочтительно от 50 пМ до 500 нМ, от 50 пМ до 100 нМ, от 50 пМ до 50 нМ и от 50 пМ до 10 нМ.
5. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пп. 1–4, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок имеет значение EC_{50} для клеток, представляющих комплекс MAGE-A/МНС, которое составляет менее 100 нМ, менее 50 нМ, менее 10 нМ, менее 900 пМ, менее 500 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 150 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 20 пМ, менее 10 пМ, например от 0,1 нМ до 20 нМ, например, от 0,5 нМ до 15 нМ, от 0,8 нМ до 12 нМ, от 0,8 нМ до 10 нМ, от 0,8 нМ до 10 нМ, от 0,8 нМ до 10 нМ или, например, от 1 пМ до 150 пМ, 1 пМ до 100 пМ, от 1 пМ до 50 пМ, от 1 пМ до 20 пМ, от 1 пМ до 20 пМ.
6. Антигенсвязывающий белок согласно любому одному из пп. 1–5, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок не связывается в значительной степени с

- пептидами, выбранными из перечня, состоящего из RABGAP1L-001, AXIN1-001, ANO5-001, TPX2-001, SYNE3-001, MIA3-001, HERC4-001, PSME2-001, HEATR5A-001, CNOT1-003, TERP1-003, PITPNM3-001, INTS4-002, SAMH-001, PPP1CA-006, RPL-007, SETD1A-001, NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223 и ODC-001, предпочтительно HEATR5A-001 и CNOT1-003, когда указанный пептид находится в комплексе с белком MHC, предпочтительно в комплексе с HLA-A*02.
7. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пп. 1–6, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент, или биспецифическое антитело или его фрагмент, или Т-клеточный рецептор (TCR) или его фрагмент, или биспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) или его фрагмент.
8. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пп. 1–7, отличающийся тем, что первый полипептид и второй полипептид ковалентно или нековалентно связаны друг с другом.
9. Антигенсвязывающий белок по п. 8, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок представляет собой одноцепочечный TCR (scTCR) или одноцепочечное биспецифическое антитело.
10. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанный первый переменный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, выбранных из группы, состоящей из FR1-а, FR2-а, FR3-а и FR4-а, где
- FR1-а включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 83,
 - FR2-а включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 84,
 - FR3-а включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 85,

- FR4-a включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 86, и
- 5 указанный второй вариабельный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, выбранных из группы, состоящей из FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b, и где
- FR1-b включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 87,
- 10
- FR2-b включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 88,
- 15
- FR3-b включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 89 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 89,
- 20
- FR4-b включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 90 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентичной SEQ ID NO: 90,
- 25 11. Антигенсвязывающий белок по п. 10, отличающийся тем, что каркасная (каркасные) область (области) включает (включают) по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы аминокислотных замен, включающей:
- аминокислотную замену в положении 19 в FR1-a, где указанная аминокислотная замена предпочтительно представляет собой S19A, S19V, более предпочтительно S19V,
- 30
- аминокислотную замену в положении 48 и/или 50 в FR2-a, где указанная аминокислотная замена в положении 48 предпочтительно представляет собой A48K, а указанная аминокислотная замена в положении 50 предпочтительно представляет собой L50P,
- 35
- аминокислотную замену в положении 46, 47 и/или 54 в FR2-b, где указанная аминокислотная замена в положении 46, 47 и 54 предпочтительно

представляет собой M46P, M47G и I54F, соответственно, где предпочтительно указанная аминокислота в положении 54 представляет собой I54F, когда аминокислотная последовательность CDRb3, как определено выше, включает в положении 109 аминокислоту 109D,

- 5 - аминокислотную замену в положении 66 в FR3-b, где указанная аминокислотная замена в положении 66 предпочтительно представляет собой I66C и где предпочтительно указанная аминокислота в положении 66 представляет собой 66C, когда аминокислотная последовательность CDRb2, как определено выше, включает в положении 57 аминокислоту 57C,
- 10 и где положения замен указаны в соответствии с номенклатурой IMGT.

12. Антигенсвязывающий белок по п. 11, отличающийся тем, что указанный первый переменный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, выбранных из группы, состоящей из FR1-a, FR2-a, FR3-a и FR4-a, где

- 15 - FR1-a включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 91, где предпочтительно указанная аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная SEQ ID NO: 91, включает аминокислоту 19V,
- 20 - FR2-a включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 92, где предпочтительно указанная аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная SEQ ID NO: 92, включает аминокислоту 48K и, необязательно, аминокислотную замену в
- 25 положении 50, предпочтительно L50P,
- FR3-a включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 85,
- 30 - FR4-a включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 86, и

указанный второй переменный домен дополнительно включает одну или более каркасных областей, предпочтительно каркасных областей, выбранных из группы, состоящей из FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b, и где

- 35 - FR1-b включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 87,

- 5

- FR2-b включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 93, где предпочтительно указанная аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная SEQ ID NO: 93, включает предпочтительно аминокислоту 54F и, необязательно, аминокислотную замену в положении 46 и/или 47, где указанная аминокислотная замена в положении 46 и/или 47 предпочтительно является M46P и/или M47G, соответственно,
 - 10

- FR3-b включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 89 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 89, или из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 94, где предпочтительно указанная аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичная

15

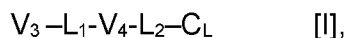
SEQ ID NO: 94 включает аминокислоту 66C, и где FR3-b предпочтительно включает или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 94, включающей аминокислоту 66C, когда аминокислотная последовательность CDRb2, как определено выше, включает в положении 57 аминокислоту 57C,
 - 20

- FR4-b включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 90 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 85 % идентичной SEQ ID NO: 90.
13. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пп. 1–12, отличающийся тем, что
- 25
- указанный первый вариабельный домен является частью цепи TCR α или γ ; и/или где указанный второй вариабельный домен является частью цепи TCR β или δ .
14. Антигенсвязывающий белок в соответствии с любым из пп. 1–13, отличающийся тем, что дополнительно включает одно или более из следующего:
- 30
- (i) один или более дополнительных участков связывания антигена;
 - (ii) трансмембранную область, необязательно включающую цитоплазматическую сигнальную область;
 - (iii) диагностическое средство;
 - (iv) терапевтическое средство или

35

 - (v) модифицирующий ФК фрагмент.

15. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пп. 1–7 и 10–13, включающий две полипептидные цепи, образующие два сайта связывания антигена, где первая полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой:



- 5 где V_3 представляет собой третий переменный домен; V_4 представляет собой четвертый переменный домен; L_1 и L_2 представляют собой линкеры; L_2 может присутствовать или отсутствовать; C_L представляет собой константный домен легкой цепи или его часть и может присутствовать или отсутствовать; и где вторая полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой:



- где V_5 представляет собой пятый переменный домен; V_6 представляет собой шестой переменный домен; L_3 и L_4 представляют собой линкеры; L_4 может присутствовать или отсутствовать; C_{H1} представляет собой константный домен 1 тяжелой цепи или его часть и может присутствовать или отсутствовать; и где V_3 или V_4 представляет собой первый переменный домен, как определено в пункте 1, и V_5 или V_6 представляет собой второй переменный домен, как определено в пункте 1, или

- 15 V_5 или V_6 представляет собой первый переменный домен, как определено в пункте 1, и V_3 или V_4 представляет собой второй переменный домен, как определено в пункте 1, и где

- 20 V_3 представляет собой первый переменный домен и V_5 представляет собой второй переменный домен, как определено в пункте 1, и V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_6 представляет собой переменный домен тяжелой цепи или V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и V_6 представляет собой переменный домен легкой цепи, или

- 25 V_3 представляет собой второй переменный домен и V_5 представляет собой первый переменный домен, как определено в пункте 1, и V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_6 представляет собой переменный домен тяжелой цепи или V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и V_6 представляет собой переменный домен легкой цепи, или

- 30 V_3 представляет собой первый переменный домен и V_6 представляет собой второй переменный домен, как определено в пункте 1, и V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_5 представляет собой переменный домен тяжелой цепи или V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и V_5 представляет собой переменный домен легкой цепи, или

- 35 V_3 представляет собой второй переменный домен и V_6 представляет собой первый переменный домен, как определено в пункте 1, и V_4 представляет собой

вариабельный домен легкой цепи и V_5 представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи или V_4 представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи и V_5 представляет собой вариабельный домен легкой цепи,

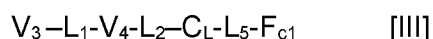
5 V_4 представляет собой первый вариабельный домен и V_5 представляет собой второй вариабельный домен, как определено в пункте 1, и V_3 представляет собой вариабельный домен легкой цепи и V_6 представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи или V_3 представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи и V_6 представляет собой вариабельный домен легкой цепи, или

10 V_4 представляет собой второй вариабельный домен и V_5 представляет собой первый вариабельный домен, как определено в пункте 1, и V_3 представляет собой вариабельный домен легкой цепи и V_6 представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи или V_3 представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи и V_6 представляет собой вариабельный домен легкой цепи,

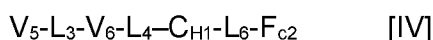
15 и где вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи вместе образуют один сайт связывания антигена, и где первый и второй вариабельный домен вместе образуют один сайт связывания антигена.

16. Антигенсвязывающий белок по п. 15, отличающийся тем, что указанный вариабельный домен тяжелой цепи и указанный вариабельный домен легкой цепи
20 связываются с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD3 (например, CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ), CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD94, CD90, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279,
25 CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, Fc ϵ RI, TCR α/β и TCR γ/δ , HLA-DR и/или связываются с эффекторной клеткой.

17. Антигенсвязывающий белок по п. 15 или 16, включающий две полипептидные цепи, которые образуют два сайта связывания антигена,
30 отличающийся тем, что одна полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой [III]:



и одна полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой [IV]:



35 где V_3 , L_1 , V_4 , L_2 , C_L , V_5 , L_3 , V_6 , L_4 , и C_{H1} определены в предыдущих пунктах формулы изобретения, и L_5 и L_6 представляют собой линкеры, которые присутствуют или

отсутствуют, и F_{c1} и F_{c2} представляют собой F_c -домены, и F_{c1} и F_{c2} одинаковые или разные, предпочтительно разные.

- 5 18. Антигенсвязывающий белок по п. 17, отличающийся тем, что V_3 представляет собой первый переменный домен и V_6 представляет собой второй переменный домен, как определено в предыдущих пунктах формулы изобретения, и V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи и V_5 представляет собой переменный домен тяжелой цепи, или

10 V_3 представляет собой первый переменный домен а V_6 представляет собой второй переменный домен, как определено в предыдущих пунктах формулы изобретения, и V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи, а V_5 представляет собой переменный домен легкой цепи, и где L_1 и L_2 содержат или состоят из аминокислотной последовательности «GGGSGGGG» с SEQ ID NO: 96, и где L_2 , L_5 , L_4 и L_6 отсутствуют, и где F_{c1} содержит или состоит из

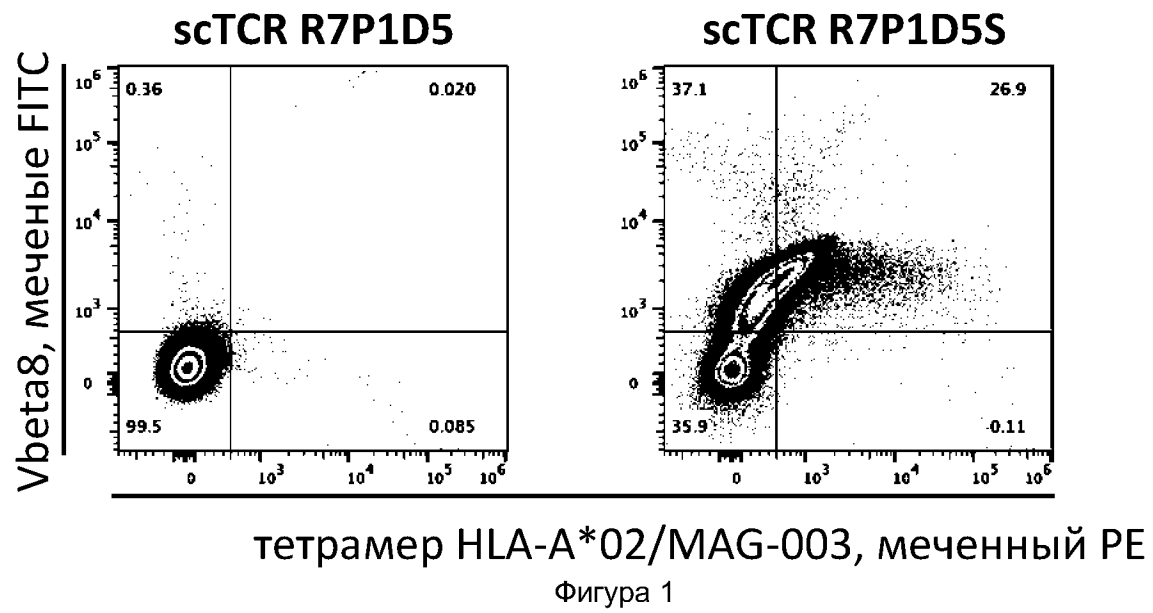
15 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, когда V_4 представляет собой переменный домен тяжелой цепи и F_{c2} содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, когда V_5 представляет собой переменный домен легкой цепи, или

20 F_{c1} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, когда V_4 представляет собой переменный домен легкой цепи, и F_{c2} включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, когда V_5 представляет собой переменный домен тяжелой цепи.
- 25 19. Выделенная нуклеиновая кислота, включающая последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок в соответствии с любым из пунктов 1–18, или вектор нуклеиновой кислоты, включающий указанную нуклеиновую кислоту.
- 30 20. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая антигенсвязывающий белок согласно любому из пп. 1–18, или нуклеиновую кислоту или вектор согласно п. 19, где указанная клетка-хозяин предпочтительно представляет собой а) лимфоцит, такой как Т-лимфоцит или клетка-предшественник Т-лимфоцитов, например CD4- или CD8-положительная Т-клетка, или б) клетку для рекомбинантной экспрессии, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO).
- 35 21. Фармацевтическая композиция, включающая антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–18, нуклеиновую кислоту или вектор по п. 19, или клетку-хозяина

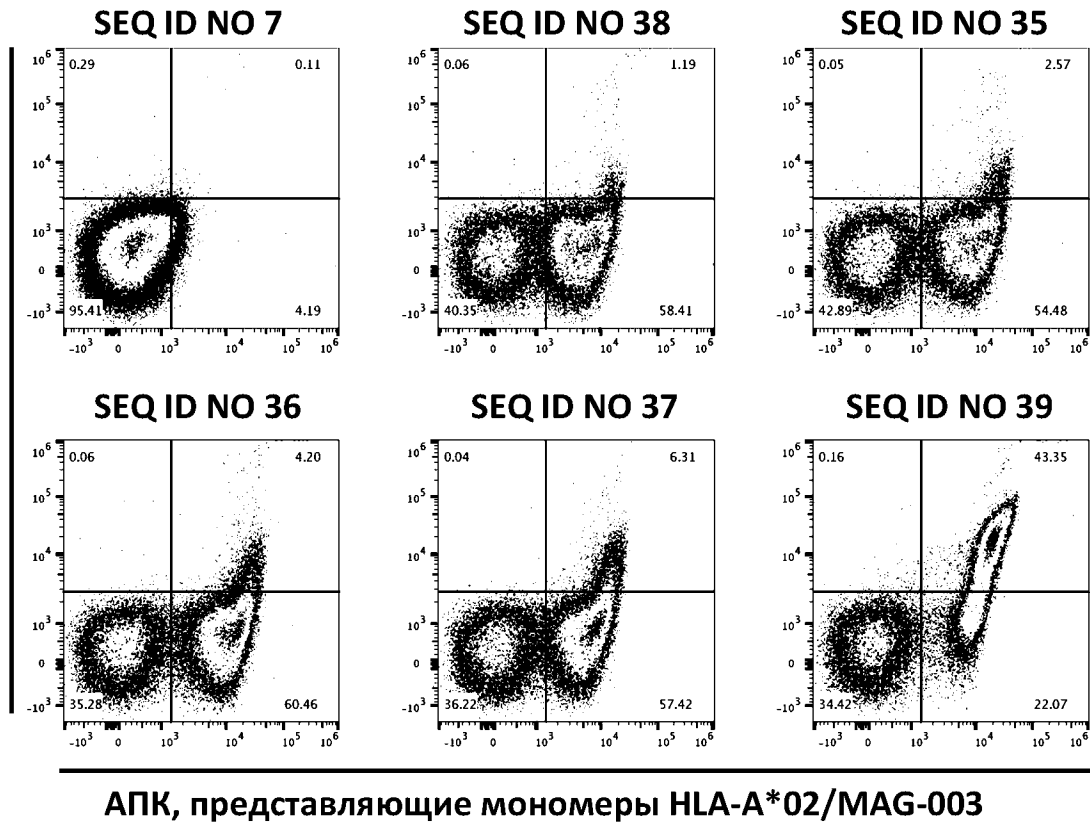
по п. 20, и фармацевтически приемлемый носитель, стабилизатор, разбавитель и/или вспомогательное вещество.

22. Способ получения антигенсвязывающего белка в соответствии с любым из пп. 1-18, включающий
 - а. предоставление подходящей клетки-хозяина,
 - б. предоставление генетической конструкции, включающей кодирующую последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок в соответствии с любым из пп. 1–18,
 - в. введение указанной генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяина, и
 - г. экспрессию указанной генетической конструкции в указанной подходящей клетке-хозяине.
23. Способ согласно п. 22, дополнительно включающий выделение и очистку антигенсвязывающего белка из подходящей клетки-хозяина и, необязательно, восстановление антигенсвязывающего белка в Т-клетке.
24. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–18, нуклеиновая кислота или вектор по п. 19, клетка-хозяин по п. 20 или фармацевтическая композиция по п. 21 для применения в медицине.
25. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пп. 1–18, нуклеиновая кислота или вектор согласно п. 19, клетка-хозяин согласно п. 20 или фармацевтическая композиция согласно п. 21 для применения в диагностике, профилактике и/или лечении пролиферативного заболевания, такого как рак, например MAGEA4- и/или MAGEA8-позитивного рака.
26. Антигенсвязывающий белок по п. 25, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака легких, рака печени, рака головы и шеи, рака кожи, почечно-клеточного рака, рака головного мозга, рака желудка, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, лейкоза, рака молочной железы, карциномы клеток Меркеля, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря и желчных протоков, остеосаркомы и рака пищевода.
27. Антигенсвязывающий белок по п. 26, отличающийся тем, что

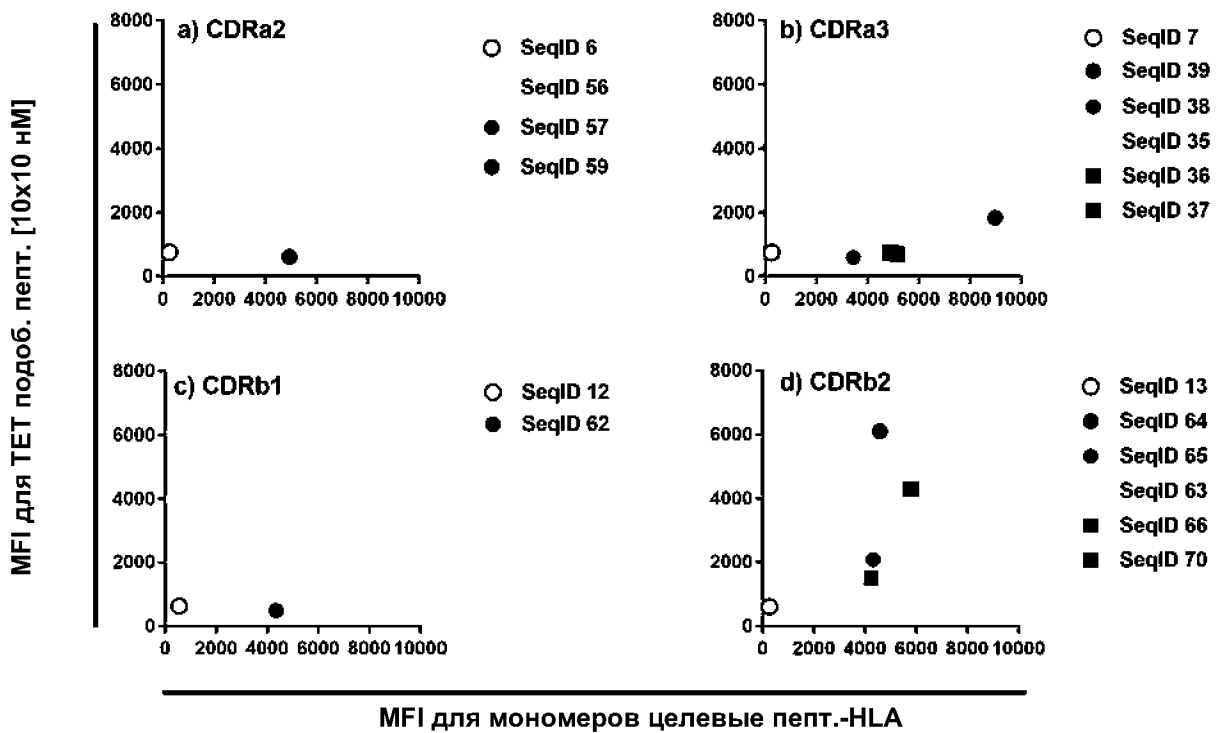
- 5
- (i) рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), предпочтительно аденокарциному немелкоклеточного рака легкого или плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (SNSCLC); или мелкоклеточный рак легкого (SCLC);
 - (ii) рак кожи представляет собой меланому;
 - (iii) рак головы и шеи представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC);
 - (iv) рак печени представляет собой гепатоцеллюлярный рак (HCC);
 - (v) рак пищевода представляет собой рак желудочно-пищеводного перехода.



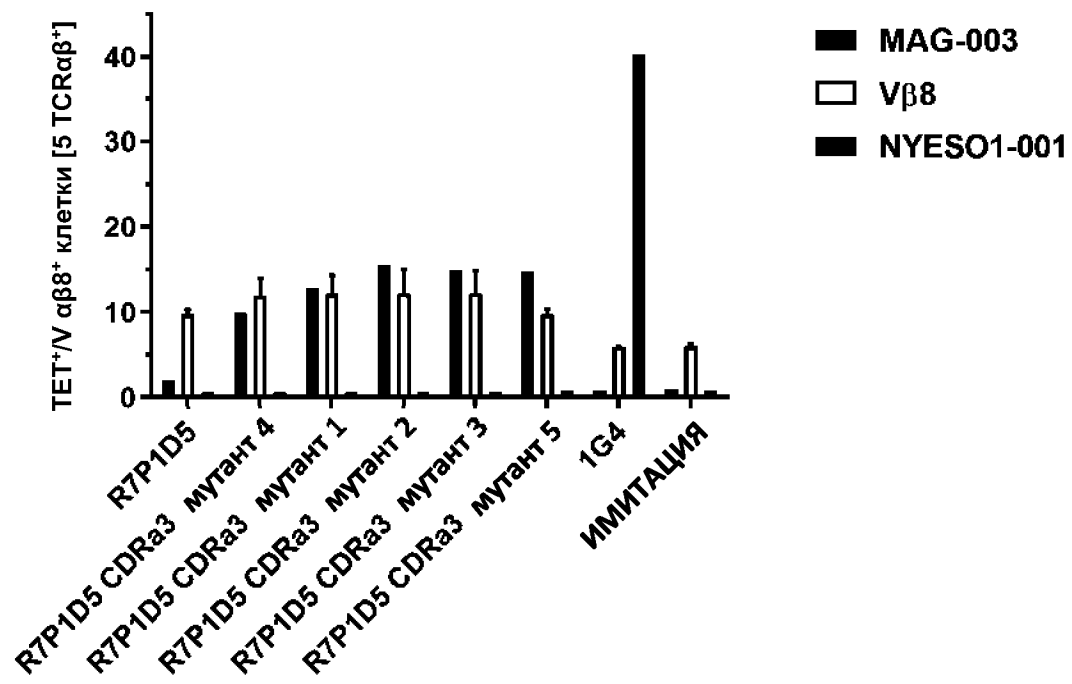
тетрамеры HLA-A*02/подобный пептид, меченные PE



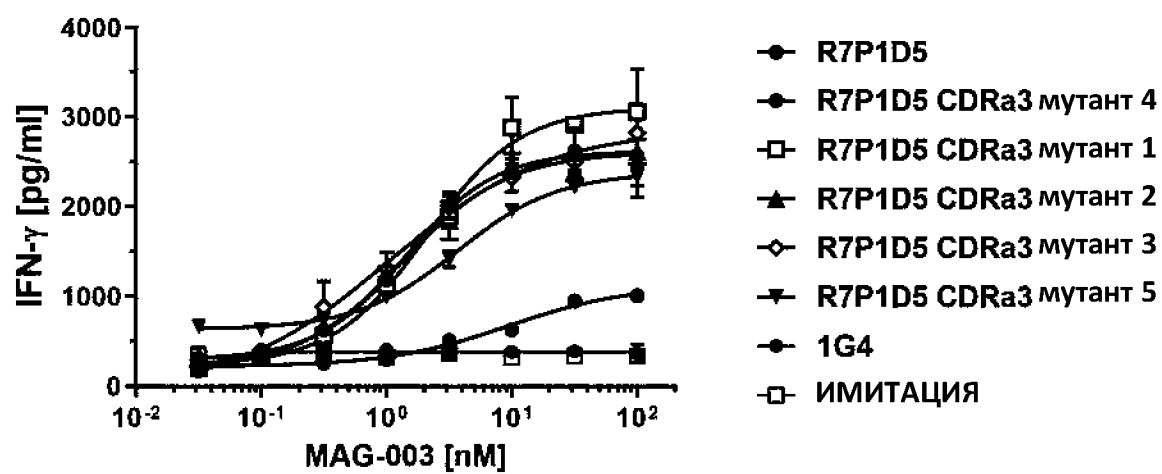
Фигура 2А



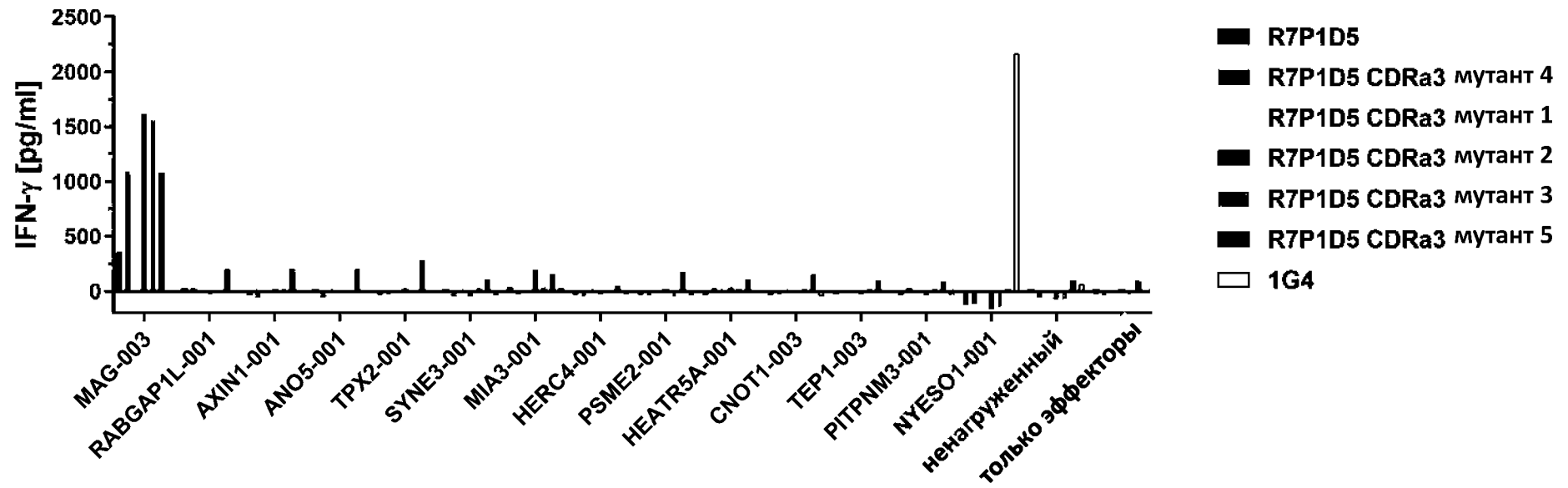
Фигура 2



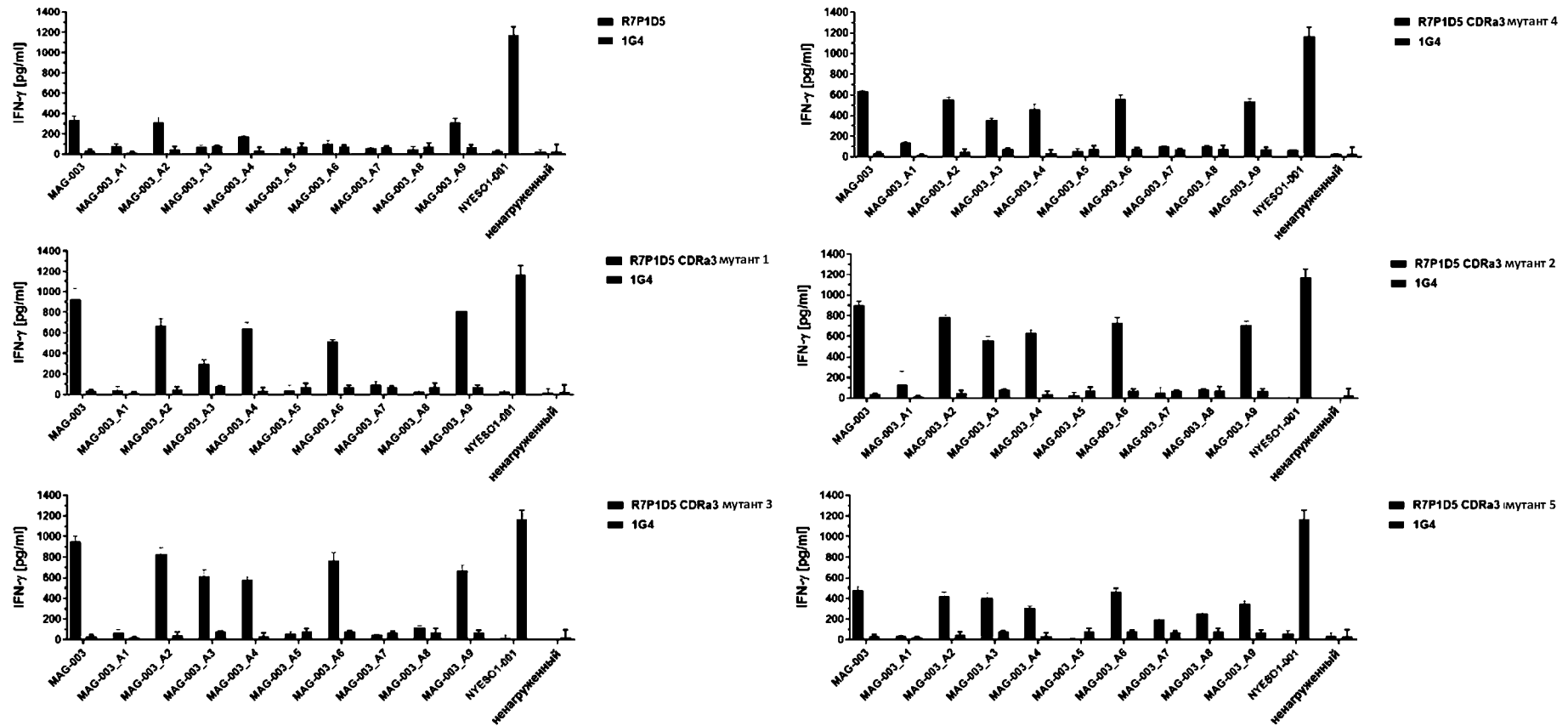
Фигура 3



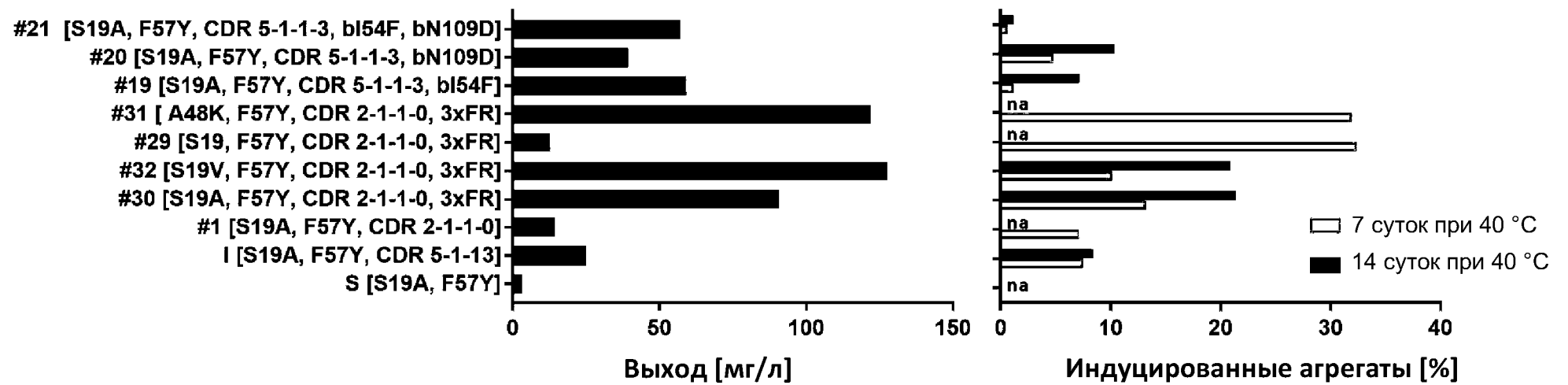
Фигура 4



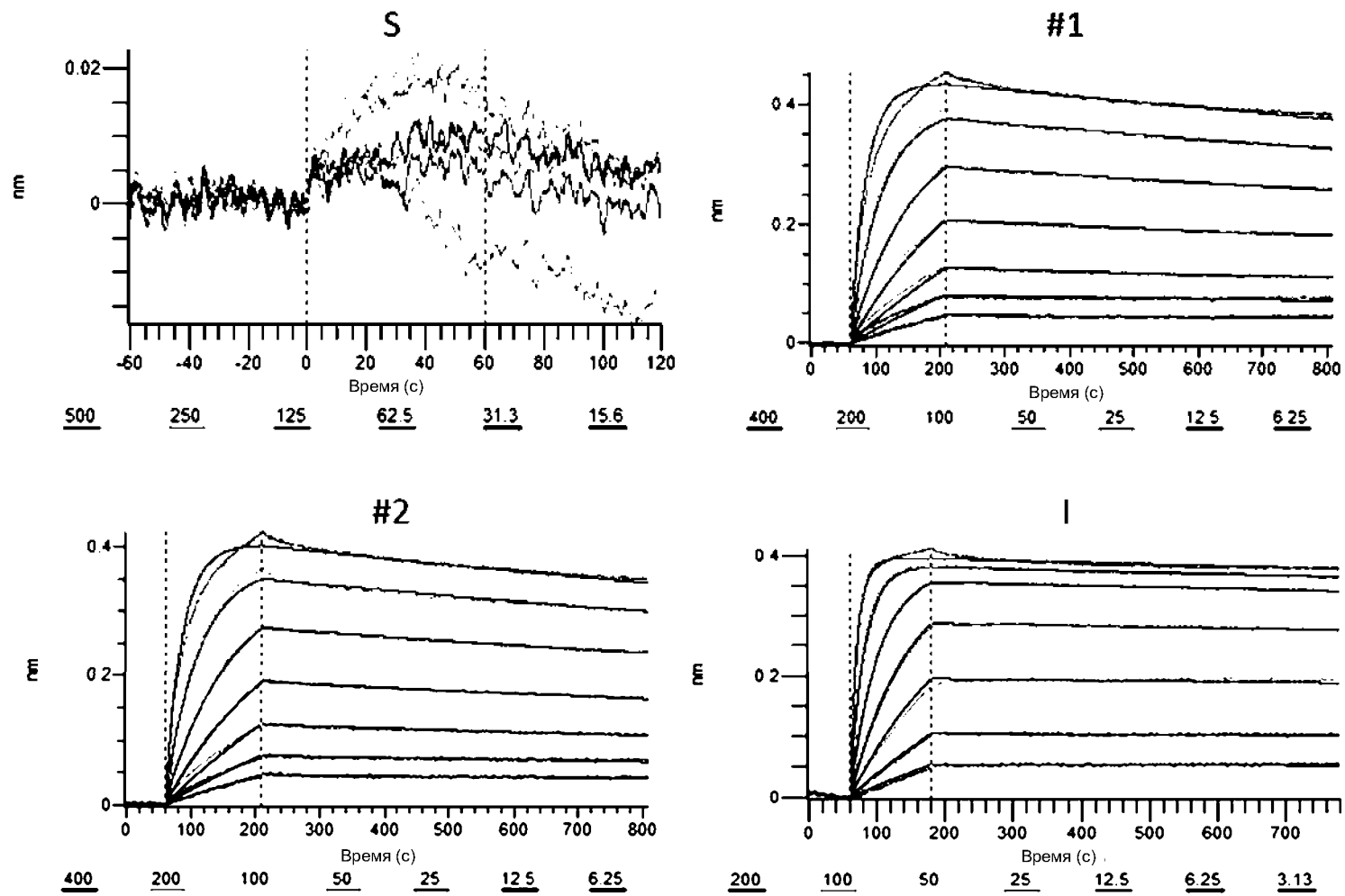
Фигура 5



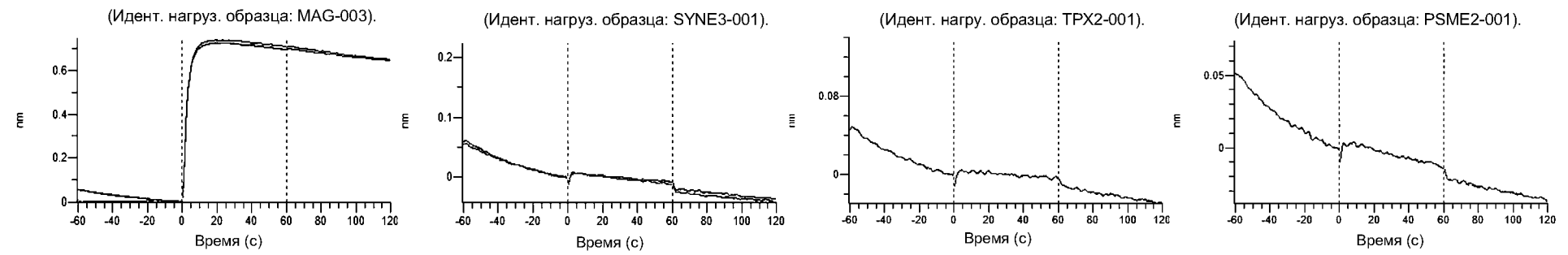
Фигура 6



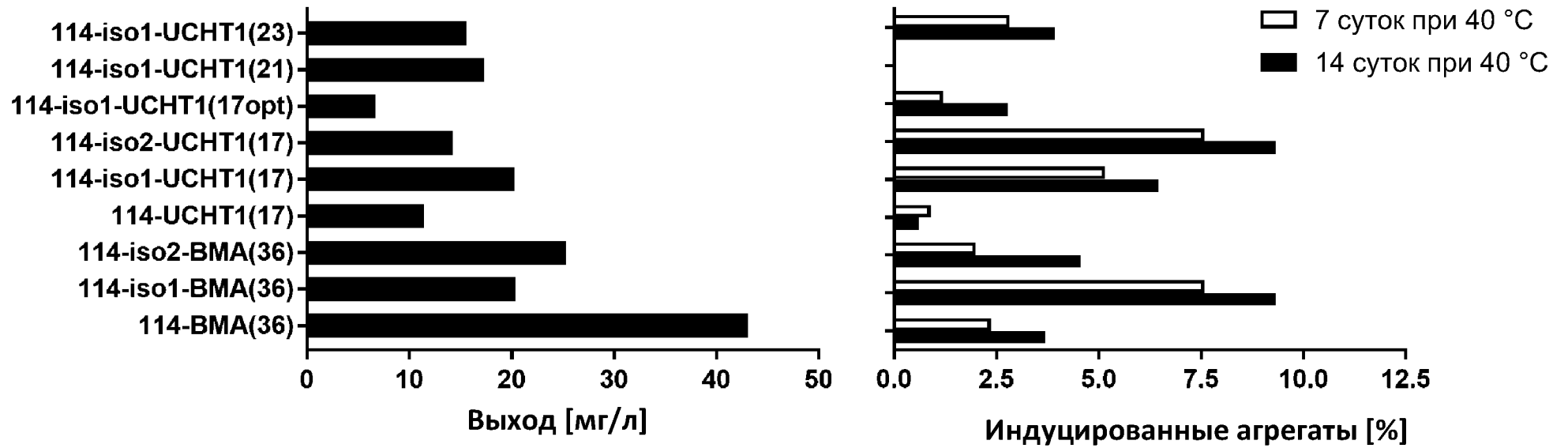
Фигура 7А



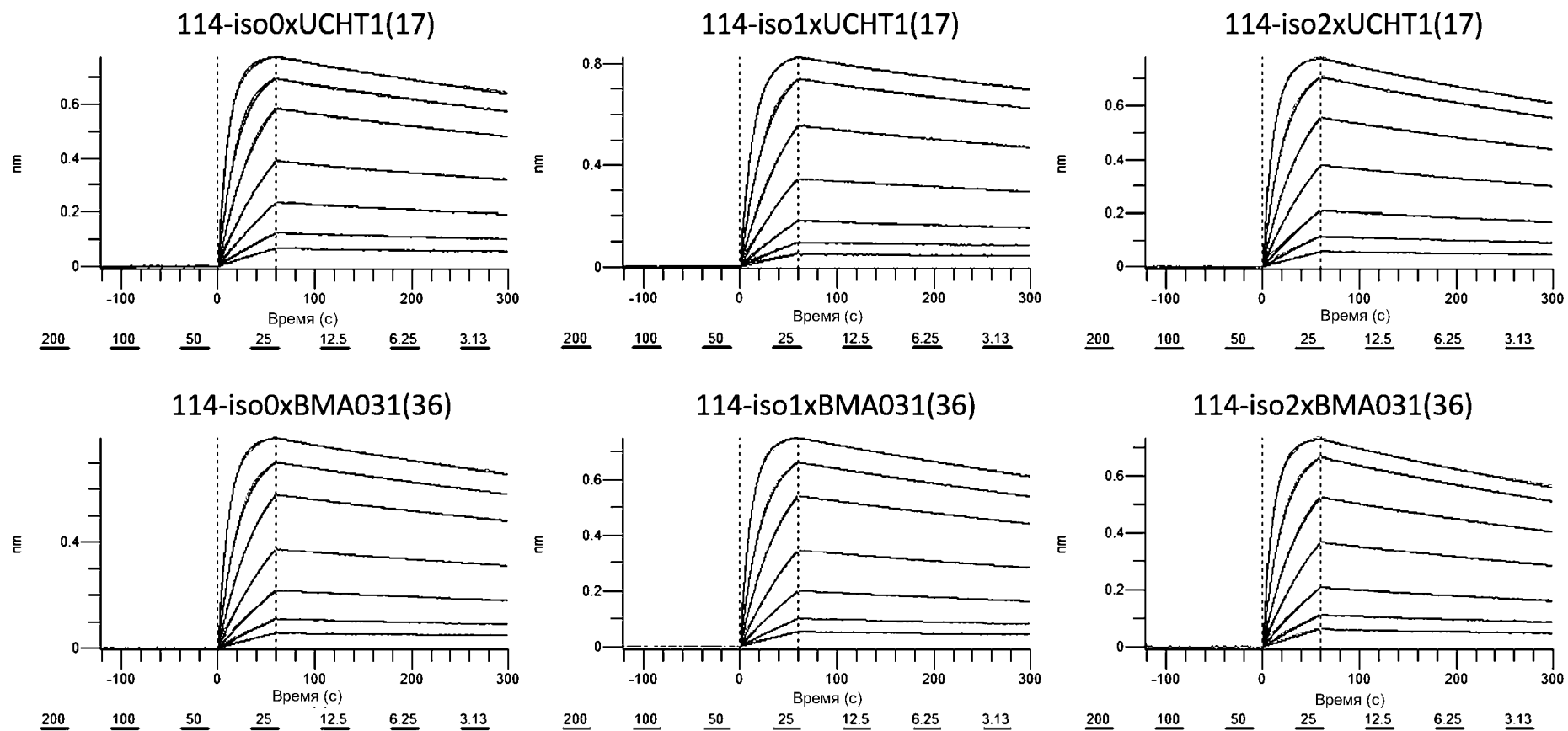
Фигура 7Б



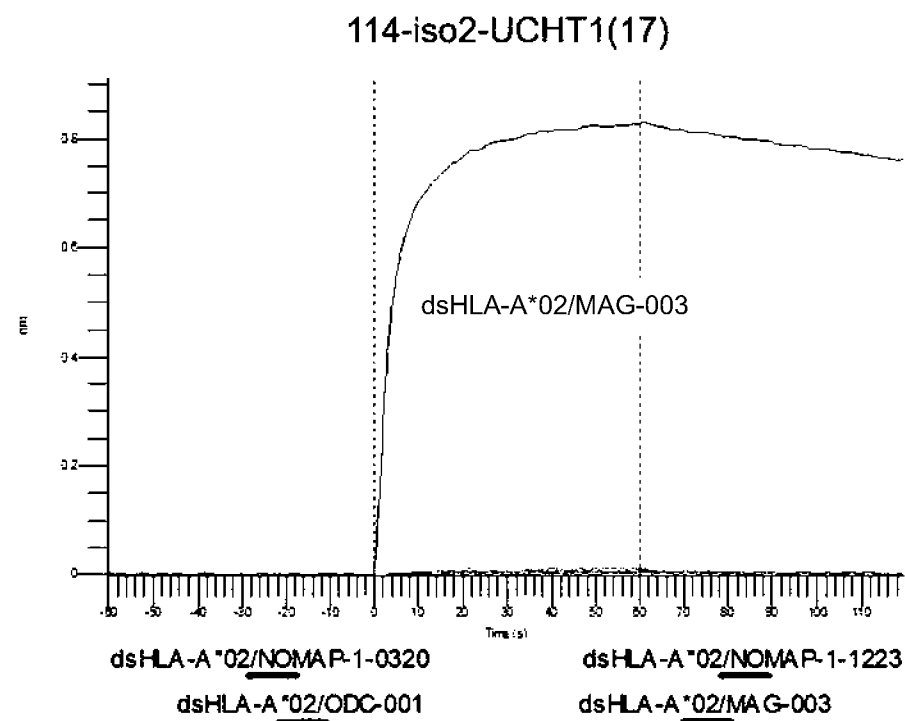
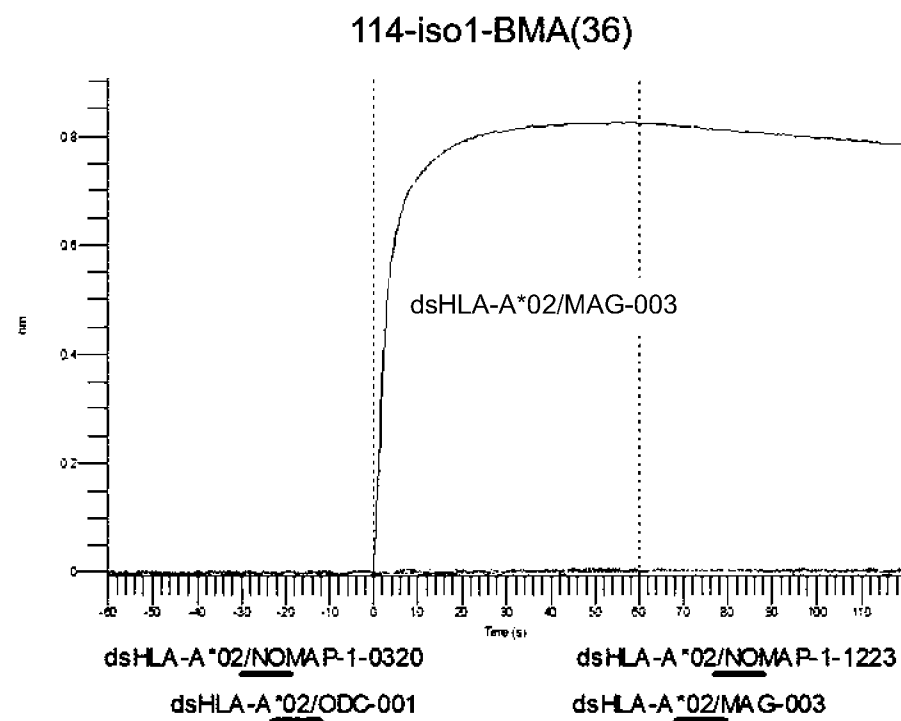
Фигура 7В



Фигура 8А

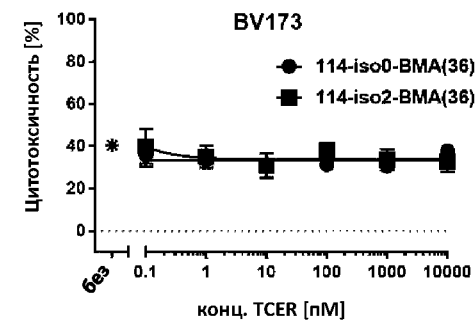
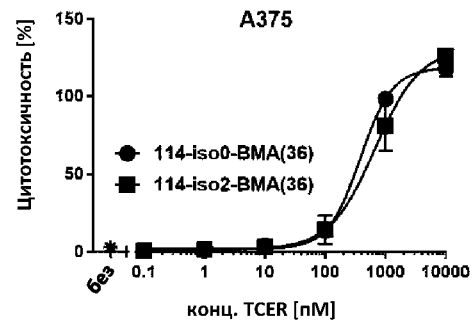
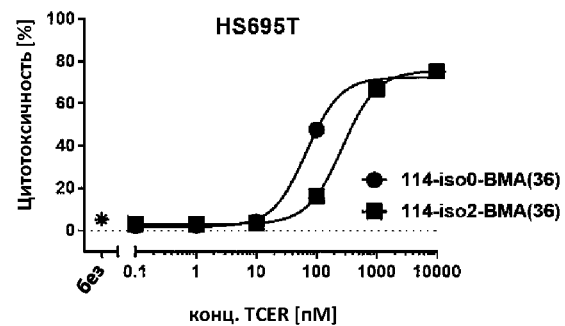
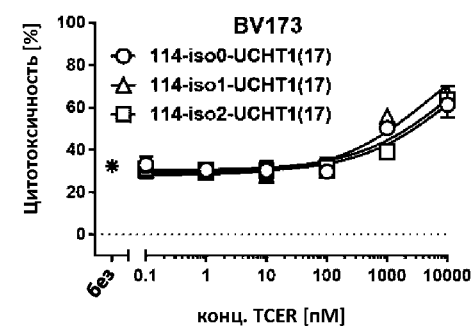
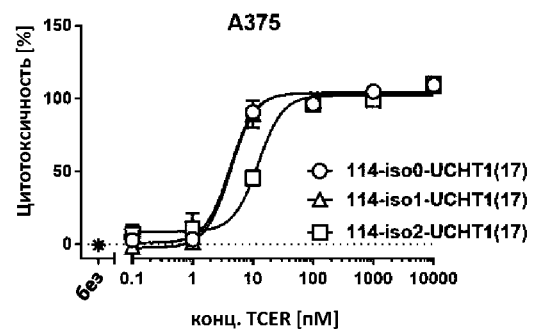
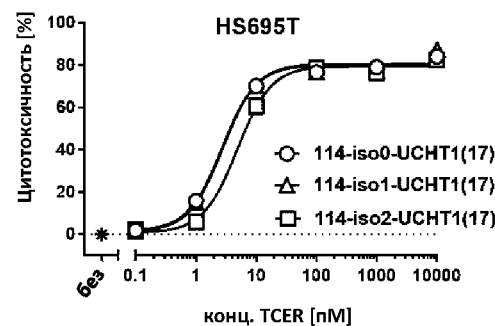


Фигура 8Б

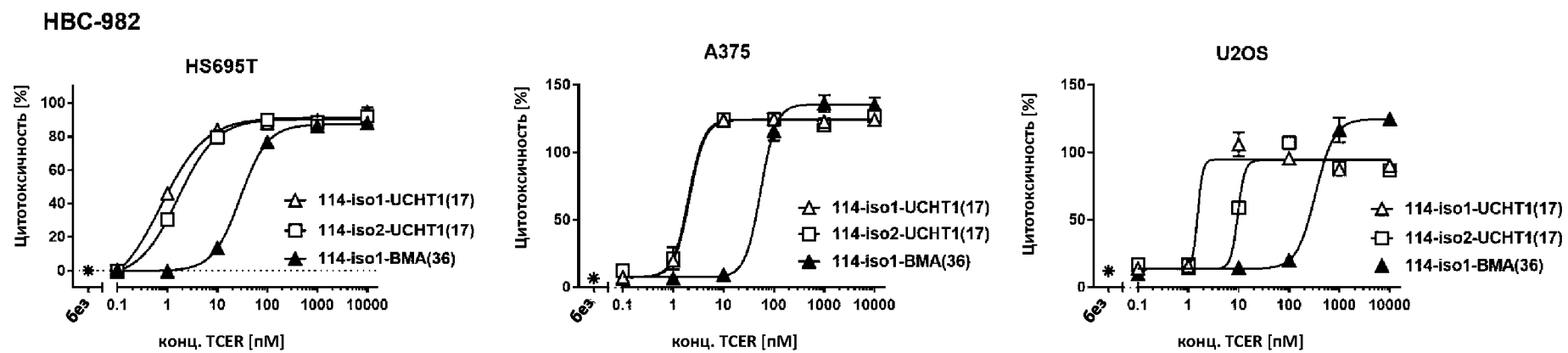


Фигура 8В

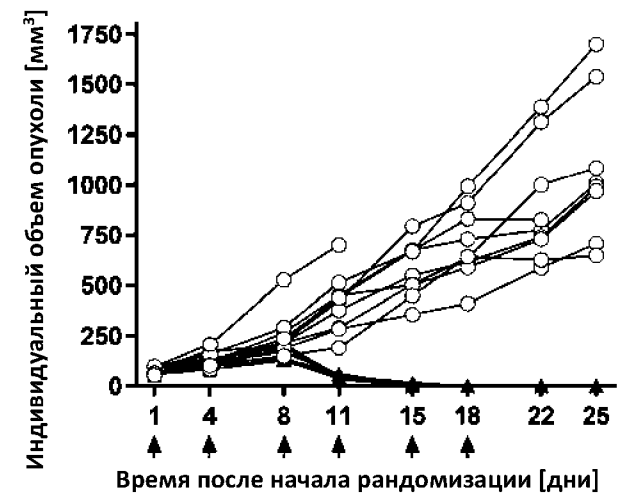
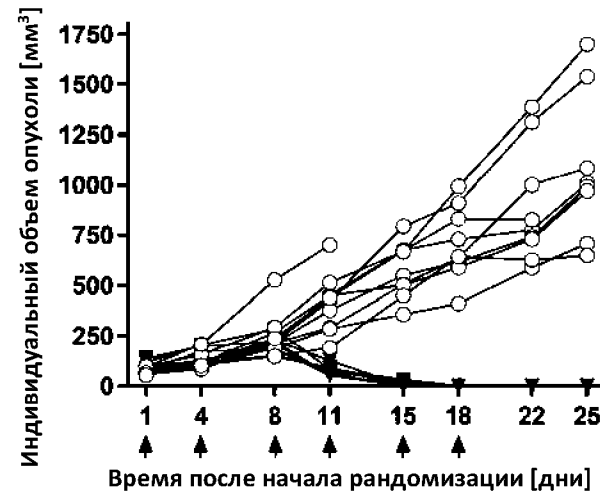
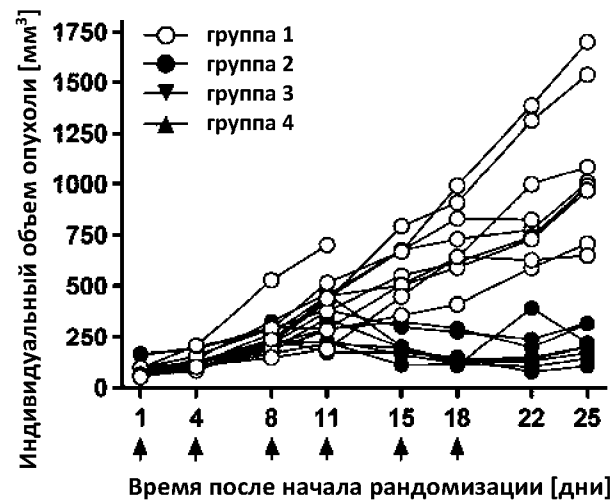
HBC-720



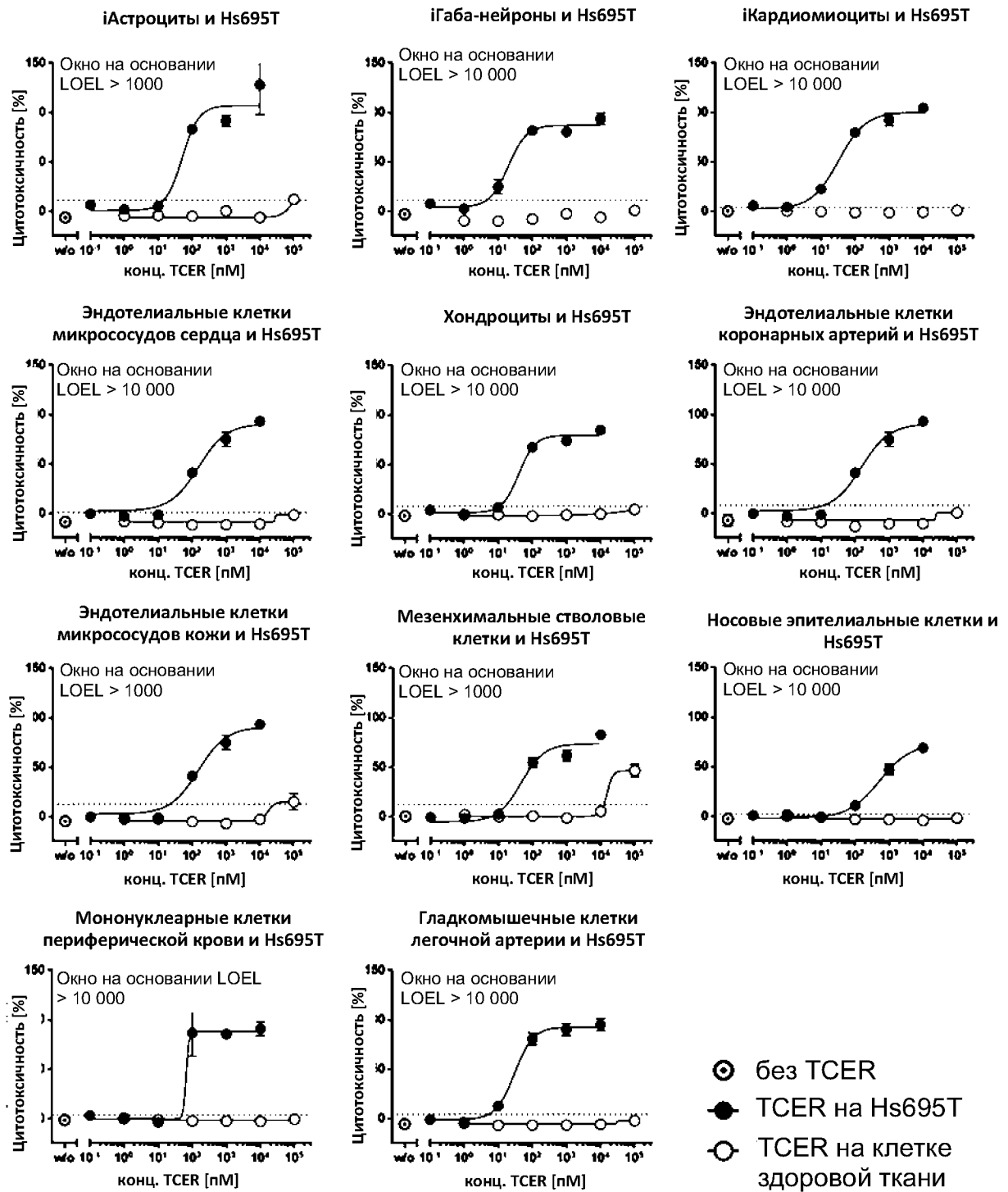
Фигура 9



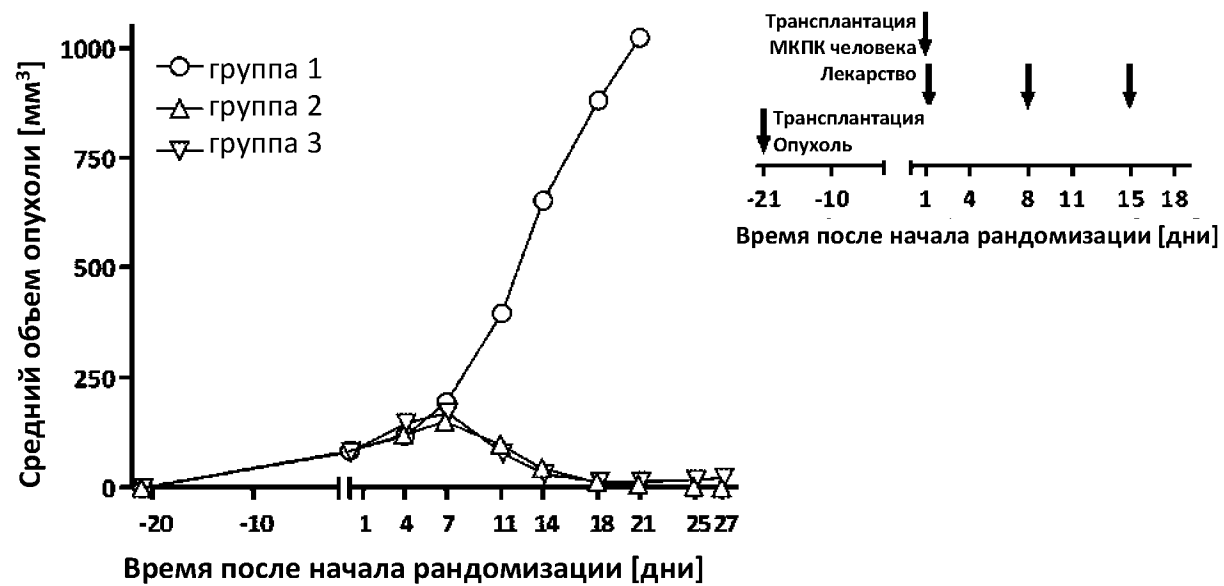
Фигура 10



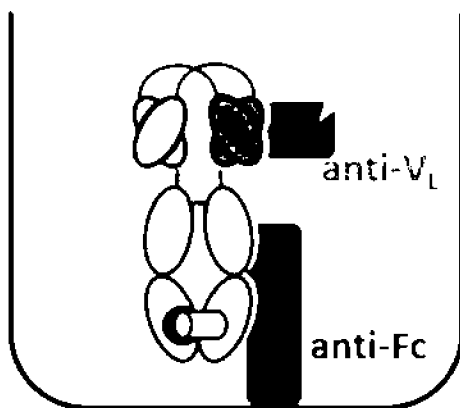
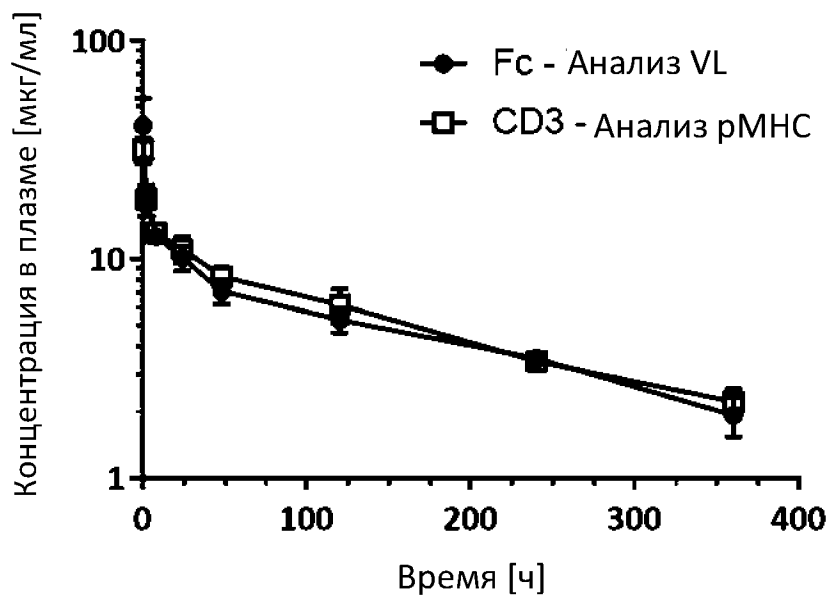
Фигура 11



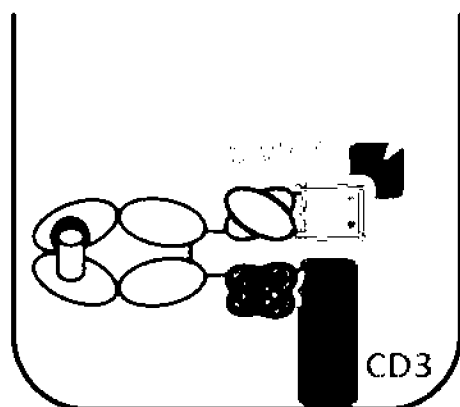
Фигура 12



Фигура 13

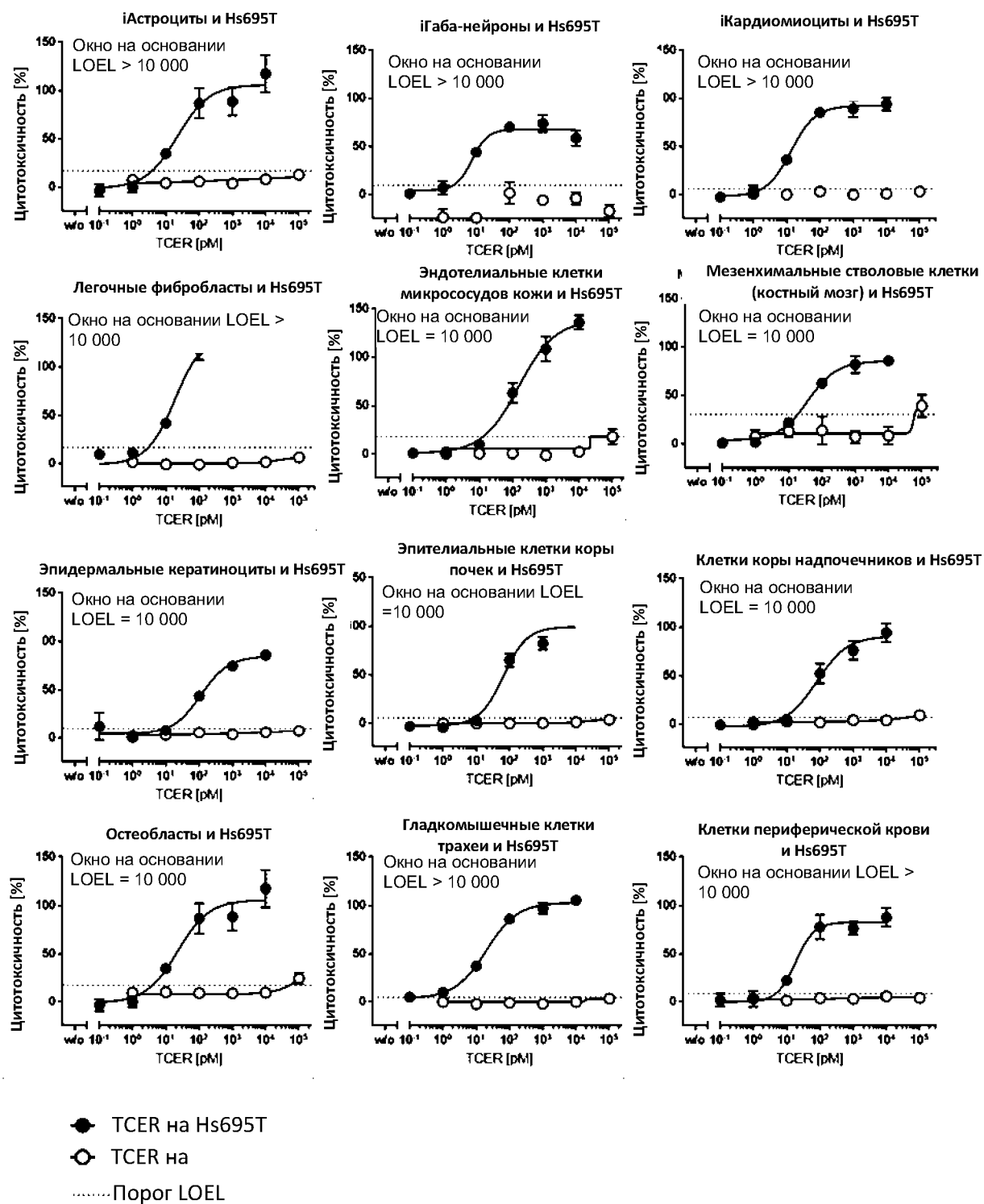


Fc – Анализ VL
Обнаружение
субъединиц TCER®



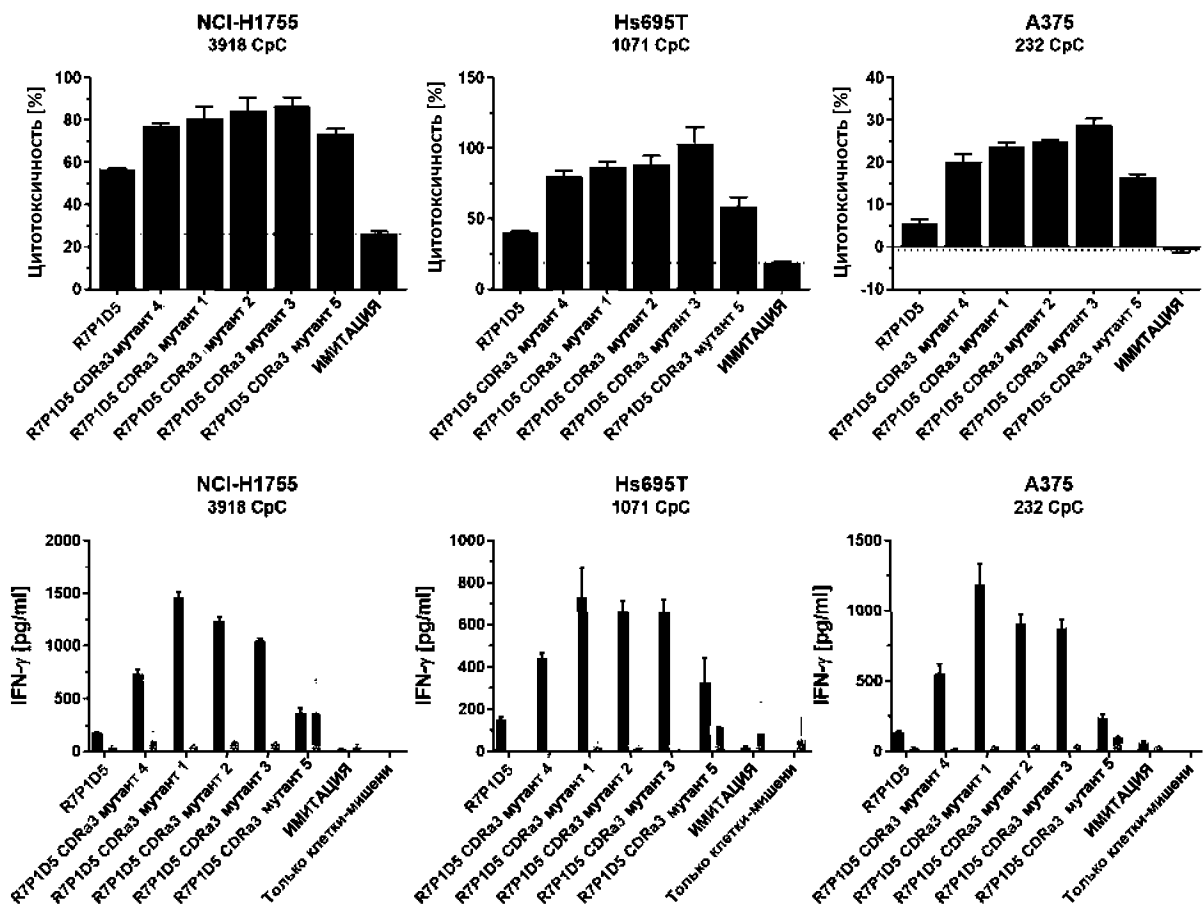
CD3 – Анализ pHLA
Обнаружение
бифункциональных
связей TCER®

Фигура 14



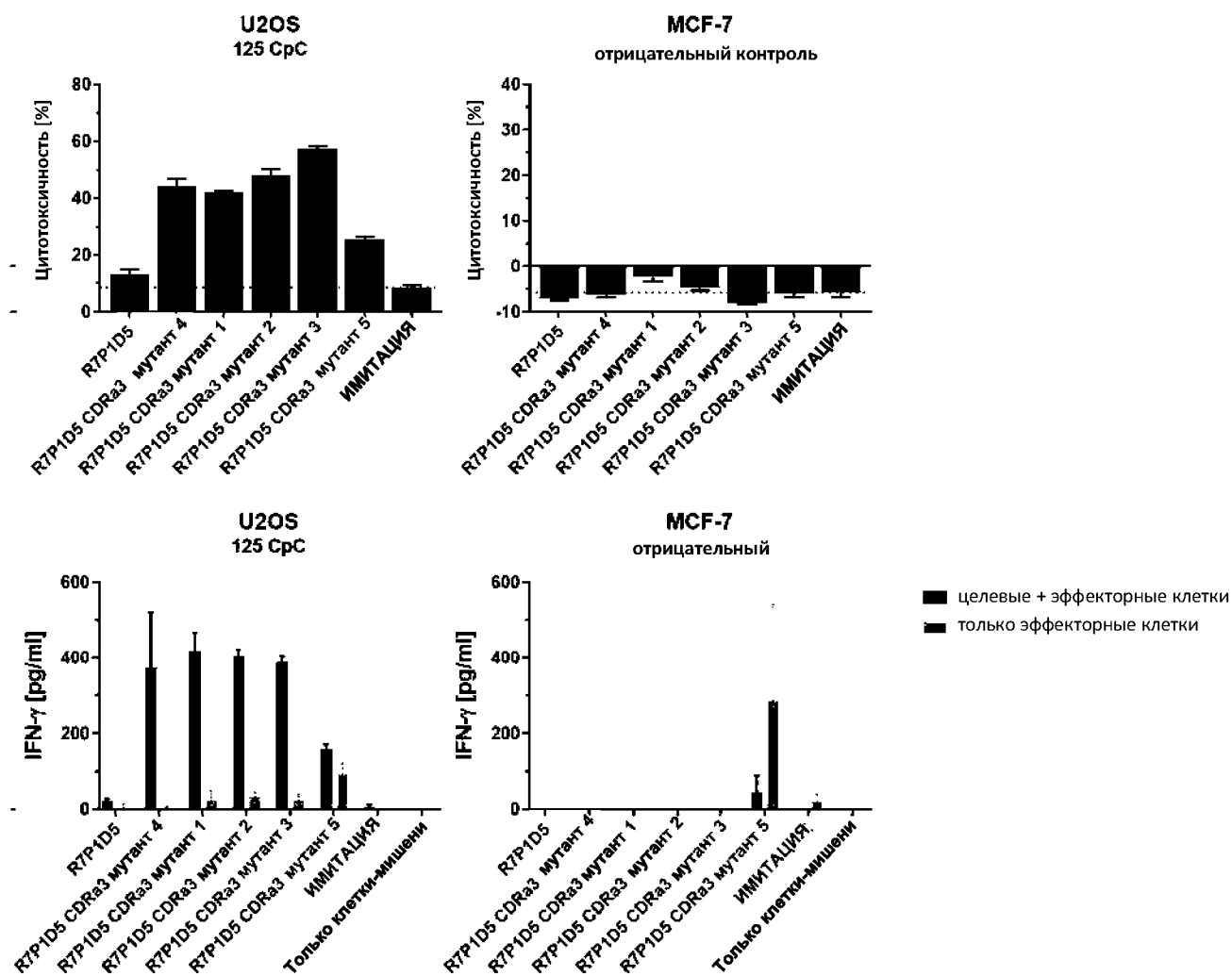
Фигура 16

Фигура 17

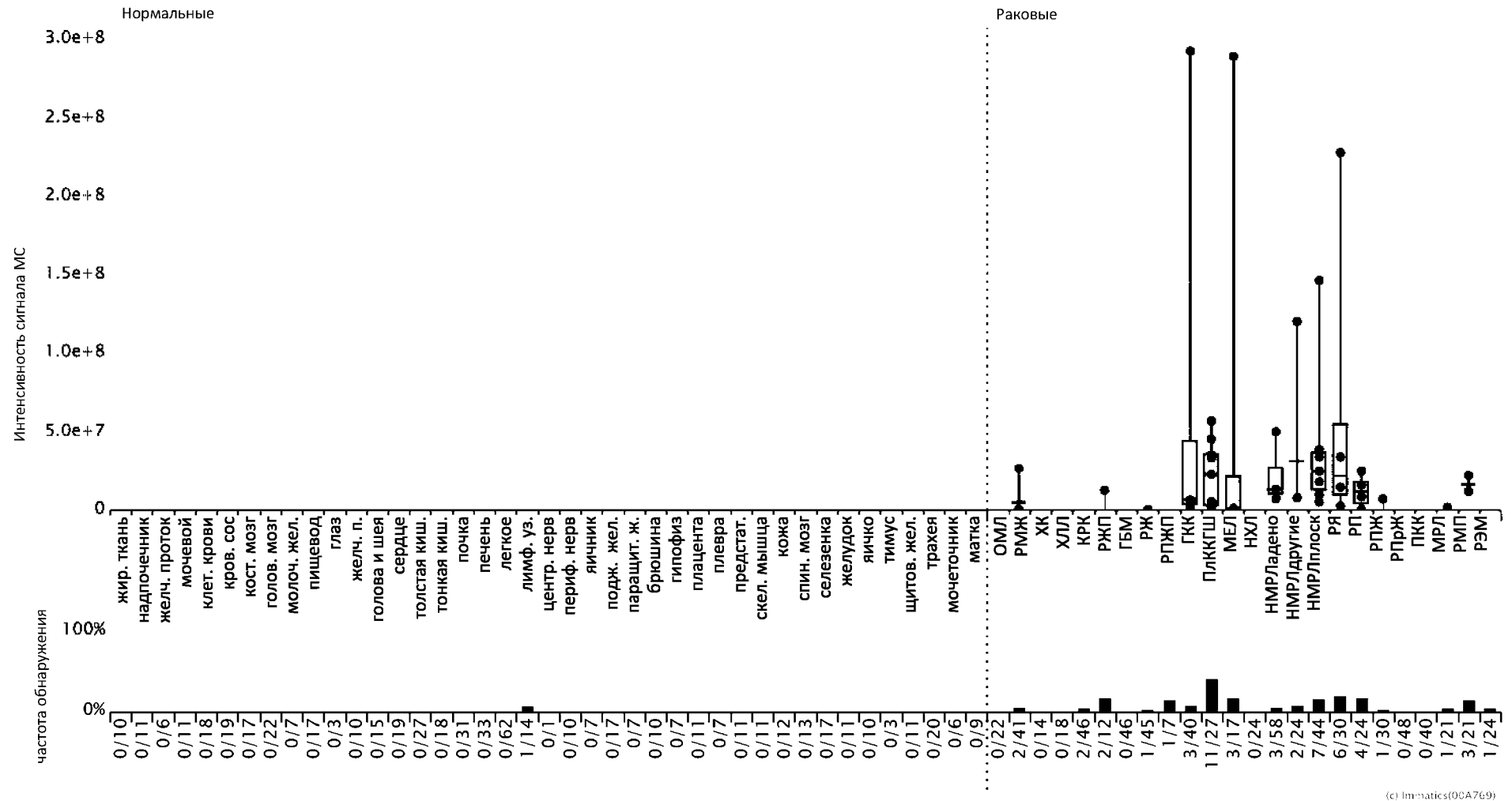


Фигура 17

Фигура 17



Фигура 17 (продолжение)



Фигура 18