

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290448** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2022.07.13

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.10.01

---

(54) **МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

---

(31) 19201200.3

(32) 2019.10.02

(33) EP

(86) PCT/EP2020/077586

(87) WO 2021/064137 2021.04.08

(88) 2021.05.14

(71) Заявитель:

**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Хипп Зузанне, Адам Пауль (DE),  
Дзегелевски Майкл, Ганешан  
Раджумар, Горман Филип Николас,  
Гупта Панкадж, Гупта Приянка,  
Лазару Марсиу, Шеер Джастин М.,  
Войнов Владимир Х. (US)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,  
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к новым связывающим белкам V7H6/CD3. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим такие белки; к способам получения таких белков; клеткам-хозяевам, экспрессирующим или способным экспрессировать такие белки; к композициям, содержащим такие белки; и к применению таких белков или таких композиций, в частности, для терапевтических целей в области раковых заболеваний.

---

**A1**

**202290448**

**202290448**

**A1**

## МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

5 Предпосылки создания изобретенияОбласть техники

Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, содержащим первую антигенсвязывающую единицу, специфичную для В7Н6 (также обозначаемую в настоящей заявке как «В7-Н6») и вторую антигенсвязывающую единицу, специфичную для CD3. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим такие связывающие белки, к способам получения таких связывающих белков; к клеткам-хозяевам, экспрессирующим или способным экспрессировать такие связывающие белки, композициям, содержащим такие связывающие белки и к применениям таких связывающих белков или таких композиций, в частности, для терапевтических целей в области онкологических заболеваний.

Дополнительная информация

В7Н6 является опухолеселективным членом семейства В7, который, как было описано, привлекает врожденный иммунитет к клеткам-мишеням и выполняет ту же функцию, что и другие члены семейства В7, с двумя Ig-подобными доменами во внеклеточном домене, N-концевым IgV-подобным доменом и C-концевым IgC1-подобным доменом. В7Н6 запускает опосредованную NKp30 активацию клеток естественных киллеров (NK), что приводит к дегрануляции и секреции IFN $\gamma$ . (Brandt и соавт., J. Exp. Med. 2009 206(7); 1495-1503). Имеющиеся в настоящее время данные предполагают роль В7Н6 в воспалительных реакциях на инфекционные состояния, а также в солидных опухолях.

Показано, что В7Н6 экспрессируется на клетках CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, выделенных из периферической крови больных сепсисом в результате воспалительного процесса при этом остром болезненном состоянии. Эти результаты были подтверждены анализом *in vitro* повышающей регуляции В7Н6 на клеточной поверхности CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> провоспалительных моноцитов и нейтрофилов при стимуляции посредством IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ . (Matta и соавт., Blood 2013 122(3)), предполагая роль В7Н6 в воспалительных реакциях на сепсис.

За исключением вышеупомянутых состояний сепсиса, В7Н6 в основном селективно экспрессируется в опухолевых клетках и не может быть обнаружен в нормальных тканях человека в стабильном состоянии. Например, экспрессия В7Н6 была описана для Т-клеточной лимфомы, миелоидного лейкоза, карциномы толстой кишки, рака молочной железы и карциномы яичников (Brandt и соавт., J. Exp. Med. 2009 206(7): 1495-1503; Li и соавт., J. Exp. Med. 2011 208(4); Greaves и соавт., Blood 2013 121(5); Zhang и соавт. Oncology Letters 2018 16:91-96), тканей немелкоклеточного рака легкого (Zhang и соавт., Int J clin Exp Pathol 2014;7(10):6936-6942), опухолевых тканей желудочно-кишечного тракта (Chen и соавт., Pathol. Oncol. Res. 2014 20:203-207; Zhao и соавт., Cell Proliferation 2018; e12468), ткани рака яичников (Zhou и соавт., Int clin Exp Pathol 2015 8(8), ткани плоскоклеточного рака полости рта (Wang и соавт., J Oral Pathol Med. 2017;46:766-772) и ткани гепатоцеллюлярной карциномы (Li и соавт., Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 156), однако функция В7Н6 в опухолях до конца не изучена.

Терапевтические применения, включая лечение рака с использованием антител против В7Н6, которые задействуют путь ADCC/CDC или конъюгатов антитело против-В7Н6-лекарственное средство описаны в WO 2009/046407A2 и WO 2011/07044A2.

Тем не менее, таргетная терапия В7Н6, основанная на активности ADCC/CDC, не является оптимальным способом действия из-за низкой экспрессии В7Н6 на клеточной поверхности и низких показателей успеха при использовании обычных антител с активностью ADCC/CDC в солидных опухолях.

Таргетная терапия, основанная на конъюгатах В7Н6-специфических антител с лекарственными средствами (ADC), также может иметь ограничения, поскольку у большинства пациентов возникает рецидив после химиотерапевтического лечения и из-за низкой экспрессии В7Н6 на клеточной поверхности. Кроме того, подходы ADC часто обладают нецелевой токсичностью, вызванной свободным лекарственным средством в результате нестабильности или разложения линкера.

CAR-T-клетки и антитела, активирующие Т-клетки, являются дополнительными подходами для таргетной терапии солидных опухолей,

экспрессирующих В7Н6 (Wu и соавт., *Gene* 2015 22, 675-684; Hua и соавт. *Protein Engineering, Design & Selection* 201730(10), 713-721; WO2017/181001). Например, Wu и соавт. (*J Immunol.* 2015 Jun 1;194(11):5305-11) описывает доклинические данные с В7Н6-специфическим-ViTE, ViTE расшифровывается как Vi-специфический привлекающий Т-клетки активатор, который представляет собой слитый белок массой около 55 кДа, состоящий из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv)). В этом случае В7Н6-специфический ViTE был сконструирован на основе связывающей молекулы ОКТ3-CD3 и ранее опубликованного антитела В7Н6 (Zhang и соавт., *J Immunol.* 2012 Sep 1;189(5):2290-9; WO 2013/169691). Однако антитело ОКТ3 не обладает перекрестной реакционной способностью с CD3 яванского макака и, следовательно, не позволяет проводить доклинические токсикологические испытания на яванских макаках, которые являются предпочтительными тестируемыми видами для подготовки к клиническим испытаниям (Chatenoud и соавт., *The Rev Diabet Stud* 2012;9(4):372-381). Дополнительной проблемой является короткий период полураспада относительно небольших, легко распадаемых молекул ViTE, что требует непрерывного внутривенного введения в клинику. Поэтому неизвестно, будет ли этот подход успешным. На сегодняшний день таргетная терапия опухолей, экспрессирующих В7-Н6, недоступна, и остается неудовлетворенная потребность, не решенная современными подходами.

Например, колоректальный рак (КРР) показывает высокую распространенность и предсказуемую экспрессию В7-Н6. Это одна из ведущих причин заболеваемости и смертности от рака во всем мире. Приблизительно у 25% пациентов с КРР изначально обнаруживаются явные метастазы, а метастатическое заболевание развивается у 40–50 % впервые диагностированных пациентов. Хотя недавние улучшения в химиотерапии и таргетной терапии увеличили продолжительность жизни при метастатическом КРР, большинство пациентов умирают от этого заболевания.

Ввиду неблагоприятных перспектив для больных раком на поздних стадиях заболевания необходимо определить более эффективные методы лечения, особенно эффективные методы лечения с улучшенной переносимостью.

Таким образом, задачей изобретения является предоставление фармакологически активных средств, композиций и/или способов лечения, которые обеспечивают определенные преимущества по сравнению со средствами, композициями и/или способами, используемыми в настоящее время и/или известными в данной области. К этим преимуществам относятся улучшенные терапевтические и фармакологические свойства, такие как эффективность *in vivo*, меньшее количество побочных эффектов, сниженная иммуногенность, улучшенное терапевтическое окно, сокращенное время введения (например, инфузии), более низкая дозировка, увеличенный период полувыведения, что позволяет реже вводить дозу, и другие преимущественные свойства, такие как улучшенная простота получения, стабильность, совместимость с обычными процессами антител или снижение стоимости товаров, особенно по сравнению с лекарственными средствами-кандидатами, уже известными в данной области.

#### Краткое изложение сущности изобретения

В основе настоящего изобретения лежит подход активации биспецифических Т-клеток, в котором используют мультиспецифические связывающие белки с плечом связывания с CD3, который экспрессируется на Т-клетках, и плечом связывания с B7H6, который экспрессируется на клеточной поверхности опухолевых клеток. Путем одновременного связывания с Т-клетками и опухолевыми клетками, активаторы Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением вызывают образование цитолитического синапса между двумя клетками и, таким образом, избирательно перенаправляют активность Т-клеток на опухолевые клетки-мишени.

В одном аспекте изобретение обеспечивает мультиспецифический связывающий белок, содержащий первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с B7H6, и вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, где указанная первая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с B7H6, выбрана из группы, которая состоит из i) - xxiv):

i) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие

в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3);

ii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3);

iii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3);

iv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID NO:24 (CDR3);

v) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID NO:30 (CDR3);

vi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID NO:36 (CDR3);

vii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) и SEQ ID NO:39 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:40 (CDR1), SEQ ID NO:41 (CDR2) и SEQ ID NO:42 (CDR3);

viii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) и SEQ ID NO:45 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:46 (CDR1), SEQ ID NO:47 (CDR2) и SEQ ID NO:48 (CDR3);

ix) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:49 (CDR1), SEQ ID NO:50 (CDR2) и SEQ ID NO:51 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:52 (CDR1), SEQ ID NO:53 (CDR2) и SEQ ID NO:54 (CDR3);

x) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) и SEQ ID NO:60 (CDR3);

xi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3);

xii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3);

xiii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:73 (CDR1), SEQ ID NO:74 (CDR2) и SEQ ID NO:75 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:76 (CDR1), SEQ ID NO:77 (CDR2) и SEQ ID NO:78 (CDR3);

xiv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и CDR тяжелой цепи,

включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3);

xv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3);

xvi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID NO:93 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3);

xvii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:97 (CDR1), SEQ ID NO:98(CDR2) и SEQ ID NO:99 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:100 (CDR1), SEQ ID NO:101 (CDR2) и SEQ ID NO:102 (CDR3);

xviii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:103 (CDR1), SEQ ID NO:104 (CDR2) и SEQ ID NO:105 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:106 (CDR1), SEQ ID NO:107 (CDR2) и SEQ ID NO:108 (CDR3);

xix) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:109 (CDR1), SEQ ID NO:110 (CDR2) и SEQ ID NO:111 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:112 (CDR1), SEQ ID NO:113 (CDR2) и SEQ ID NO:114 (CDR3);

xx) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:115 (CDR1), SEQ ID NO:116 (CDR2) и SEQ ID NO:117 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:118 (CDR1), SEQ ID NO:119 (CDR2) и SEQ ID NO:120 (CDR3);

xxi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:121 (CDR1), SEQ ID NO:122 (CDR2) и SEQ ID NO:123 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:124  
5 (CDR1), SEQ ID NO:125 (CDR2) и SEQ ID NO:126 (CDR3);

xxii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:127 (CDR1), SEQ ID NO:128 (CDR2) и SEQ ID NO:129 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:130  
10 (CDR1), SEQ ID NO:131 (CDR2) и SEQ ID NO:132 (CDR3);

xxiii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136  
15 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3); и

xxiv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:142  
20 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3).

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением первая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с В7Н6 выбрана из группы, которая включает в себя i) - xxiv):

i) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:146;  
25

ii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:147 переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:148;  
30

iii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:149 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:150;



xv) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:173 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:174;

5 xvi) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:175 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:176;

xvii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:177 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:178;

10 xviii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:180;

xix) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182;

15 xx) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:183 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:184;

20 xxi) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:185 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:186;

xxii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:187 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:188;

25 xxiii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:189 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:190; и

30 xxiv) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:191 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:192.

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением вторая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с CD3 выбрана из группы, которая включает в себя i) - vi):

i) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3);

ii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:263 (CDR1), SEQ ID NO:264 (CDR2) и SEQ ID NO:265 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:266 (CDR1), SEQ ID NO:267 (CDR2) и SEQ ID NO:268 (CDR3);

iii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:269 (CDR1), SEQ ID NO:270 (CDR2) и SEQ ID NO:271 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:272 (CDR1), SEQ ID NO:273 (CDR2) и SEQ ID NO:274 (CDR3);

iv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:275 (CDR1), SEQ ID NO:276 (CDR2) и SEQ ID NO:277 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:278 (CDR1), SEQ ID NO:279 (CDR2) и SEQ ID NO:280 (CDR3);

v) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:281 (CDR1), SEQ ID NO:282 (CDR2) и SEQ ID NO:283 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:284 (CDR1), SEQ ID NO:285 (CDR2) и SEQ ID NO:286 (CDR3); и

vi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:287 (CDR1), SEQ ID NO:288 (CDR2) и SEQ ID NO:289 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:290 (CDR1), SEQ ID NO:291 (CDR2) и SEQ ID NO:292 (CDR3).

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением, вторая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с CD3 выбрана из группы, которая включает в себя i) - vi):

i) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294;

ii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:295 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:296;

iii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:297 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:298;

iv) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:299 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:300;

v) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:301 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:302; и

vi) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:303 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:304.

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением первая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с B7H6, содержит от своего N- до C-конца первый переменный домен легкой цепи, первый константный домен легкой цепи, первый пептидный линкер, первый переменный домен тяжелой цепи и первый константный домен тяжелой цепи CH1; а вторая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с CD3 содержит от своего N-конца к C-концу второй переменный домен легкой цепи, второй константный домен легкой цепи, второй пептидный линкер, второй переменный домен тяжелой цепи и второй константный домен тяжелой цепи CH1. В некоторых вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением первый и/или второй пептидный линкер содержит от 26 до 42 аминокислот, предпочтительно любую из от 30 до 40 аминокислот, от 34 до 40 аминокислот или от 36 до 39 аминокислот, более предпочтительно 38 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый линкер и/или второй линкер представляет

собой линкер Gly-Ser, предпочтительно содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:250, более предпочтительно указанные первый и второй пептидные линкеры содержат одинаковую последовательность (например, SEQ ID NO:250). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый константный домен легкой цепи и второй константный домен легкой цепи независимо содержат каппа- или лямбда-домен человека.

В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая единица, специфическая для B7H6 связывающего белка в соответствии с изобретением содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196 SEQ ID NO:197 SEQ ID NO:198 SEQ ID NO:199 SEQ ID NO:200 SEQ ID NO:201 SEQ ID NO:202 SEQ ID NO:203 SEQ ID NO:204 SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215, и SEQ ID NO:216 вторая антигенсвязывающая единица, специфическая для CD3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:305, SEQ ID NO:306, SEQ ID NO:307, SEQ ID NO:308, SEQ ID NO:309, и SEQ ID NO:310, предпочтительно SEQ ID NO:305.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением дополнительно содержит первый и второй домен Fc, где указанный первый домен Fc ковалентно связан с указанной первой антигенсвязывающей единицей, предпочтительно с С-концом указанной первой антигенсвязывающей единицы, и указанный второй домен Fc ковалентно связан с указанной второй антигенсвязывающей единицей, предпочтительно с С-концом указанной второй антигенсвязывающей единицы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,

i) первый домен Fc содержит тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], а второй домен Fc содержит треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

ii) первый домен Fc содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], а второй домен Fc содержит серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V], или

iii) второй домен Fc содержит тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], а первый домен Fc содержит треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

iv) второй домен Fc содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], а первый домен Fc содержит серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V],

предпочтительно при этом первый или второй домен Fc дополнительно  
5 содержит аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F]. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй домен Fc содержит аланин в положении 234[L234A] и в положении 235 [L235A].

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую полипептидную цепь, специфически  
10 связывающуюся с B7H6, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID  
15 NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, и SEQ ID NO:240 и вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:311, SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315, и SEQ ID NO:316,  
20 предпочтительно SEQ ID NO:311.

В другом аспекте изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты i), кодирующей первую антигенсвязывающую единицу и/или вторую антигенсвязывающую единицу связывающего белка в соответствии с изобретением, необязательно дополнительно кодирующей  
25 первый и/или второй домен Fc, или ii) кодирующей первую и/или вторую полипептидную цепь связывающего белка в соответствии с изобретением. В дополнительных аспектах в настоящей заявке представлены векторы экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, клетки-хозяева, трансфицированные такими векторами экспрессии, и способы  
30 изготовления белка в соответствии с изобретением.

В другом аспекте изобретения в настоящей заявке предложен мультиспецифический связывающий белок, содержащий первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с B7H6, и вторую полипептидную цепь,

специфически связывающуюся с CD3, где первая полипептидная цепь содержит первую легкую цепь, первый линкер, а первая тяжелая цепь и вторая полипептидная цепь содержит вторую легкую цепь, второй линкер и вторую тяжелую цепь, предпочтительно С-конец первой легкой цепи ковалентно связан с N-концом первой тяжелой цепи через первый пептидный линкер, С-конец второй легкой цепи ковалентно связывается с N-концом второй тяжелой цепи через второй пептидный линкер. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что любая ссылка в настоящей заявке на «легкую цепь» или «тяжелую цепь» относится к легкой цепи антитела или тяжелой цепи антитела соответственно.

В некоторых вариантах осуществления белка в соответствии с изобретением, первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с В7Н6 содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащие последовательности CDR, последовательности VH/VL и/или последовательности одноцепочечных Fab, определенные для антигенсвязывающих единиц любого из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23 и В7Н6#24, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3, содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащие последовательности CDR, последовательности VH/VL и/или последовательности scFab, определенные для антигенсвязывающих единиц CD3#1, как описано в настоящей заявке.

Дополнительные аспекты, варианты осуществления, применения и способы, связанные со связывающими белками в соответствии с изобретением, станут понятны из следующего подробного описания и из прилагаемой формулы изобретения.

Изобретение относится к новым связывающим белкам, которые обеспечивают более эффективное лечение рака, экспрессирующего В7Н6, такого как (метастатический) колоректальный рак ((м)КРР), немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) или плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ).

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Схематическое изображение биспецифического связывающего белка в соответствии с изобретением.

Фигура 2: Схематическое изображение внеклеточного белка В7Н6, экспрессируемого на клеточной поверхности клеток СНО-К1.

5 Фигура 3: Связывание 34 типичных связывающих белков В7Н6/CD3 рекомбинантным внеклеточным белком В7Н6 человека.

Фигура 4: Связывание 34 типичных связывающих белков В7Н6/CD3 с рекомбинантным внеклеточным белком В7Н6 человека с мутацией аланина.

10 Фигура 5: Связывание 34 типичных связывающих белков В7Н6/CD3 с клетками НСТ-15, экспрессирующими эндогенный В7Н6 человека.

Фигура 6: Связывание 23 типичных связывающих белков В7Н6/CD3 с рекомбинантными клетками СНО-К1, экспрессирующими В7Н6 яванского макака.

15 Фигура 7: Связывание 23 типичных связывающих белков В7Н6/CD3 с человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD3.

Фигура 8: Связывание 23 типичных связывающих белков В7Н6/CD3 с В7Н6-отрицательными клетками СНО-К1.

Фигура 9: Ингибирующая активность 17 типичных связывающих белков В7Н6/CD3 в отношении В7Н6-зависимой секреции IFN $\gamma$  клетками NK-92MI.

20 Фигура 10: Эффективность лизиса клеток-мишеней 11 типичных связывающих белков В7Н6/CD3, перенаправляющих нестимулированные Т-клетки на клетки НСТ-15 человека.

25 Фигура 11: Эффективность лизиса клеток-мишеней 23 типичных В7Н6/CD3 связывающих белков В7Н6/CD3, перенаправляющих нестимулированные Т-клетки на клетки НСТ-15 человека.

Фигура 12: Эффективность лизиса клеток-мишеней типичного связывающего белка В7Н6/CD3 при различных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т).

30 Фигура 13: Эффективность лизиса клеток 23 типичных связывающих белков В7Н6/CD3, перенаправляющих нестимулированные Т-клетки на рекомбинантные клетки СНО, трансфицированные клетками В7-Н6 и Cho wt.

Фигура 14: Эффективность повышающей регуляции экспрессии CD25 на Т-клетках в присутствии клеток НСТ-15 шести типичных связывающих белков В7Н6/CD3.

5 Фигура 15: Эффективность повышающей регуляции экспрессии внутриклеточного перфорина в Т-клетках в присутствии клеток НСТ-15 шести типичных связывающих белков В7Н6/CD3.

Фигура 16: Эффективность повышающей регуляции внутриклеточную экспрессию гранзима В в Т-клетках в присутствии клеток НСТ-15 шести типичных связывающих белков В7Н6/CD3.

10 Фигура 17: Способность к пролиферации Т-клеток в присутствии клеток НСТ-15 шести типичных связывающих белков В7Н6/CD3.

Фигура 18: Эффективность в отношении секреции IFN $\gamma$  Т-клетками в присутствии клеток НСТ-15 пяти типичных связывающих белков В7Н6/CD3.

15 Фигура 19: Фармакокинетический профиль одного типичного связывающего белка В7Н6/CD3.

Фигура 20: Противоопухолевая активность одного типичного связывающего белка В7Н6/CD3 в модели мышинового ксенотрансплантата с привитыми Т-клетками.

20 Фигура 21: Т-клеточная инфильтрация в опухолевой ткани ксенотрансплантата NCI-H716 с типичным связывающим белком В7Н6/CD3.

Фигура 22: Фармакокинетический профиль четырех типичных связывающих белков В7Н6.

25 Фигура 23: Противоопухолевая активность четырех типичных В7Н6/CD3 связывающих белков в модели мышинового ксенотрансплантата с привитыми Т-клетками.

Фигура 24: Противоопухолевая активность типичного связывающего белка В7Н6/CD3 в модели мышинового ксенотрансплантата с привитыми Т-клетками, вводимого каждые 7 дней или в виде одной разовой дозы.

Подробное описание изобретения

30 Используемые термины и определения

Вышеупомянутые и другие аспекты и варианты осуществления изобретения станут понятны из дальнейшего описания, в котором:

Если не указано или не определено иное, все используемые термины имеют свое обычное значение в данной области техники, которое будет понятно специалисту в данной области. Например, делается ссылка на стандартные справочники, такие как Sambrook и соавт., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» (2-е изд.), тома 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, «Genes IV», Oxford University Press, New York, (1990) и Roitt и соавт., «Immunology» (2<sup>е</sup> изд.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989), а также общий уровень техники, цитируемый в настоящей заявке. Кроме того, если не указано иное, все способы, стадии, методики и манипуляции, которые подробно не описаны конкретно, могут быть осуществлены и были выполнены способом, известным самим по себе, что будет понятно специалисту в данной области техники. Например, снова делается ссылка на стандартные справочники, на общий уровень техники, упомянутый выше, и на дополнительные ссылки, цитируемые в настоящей заявке.

При использовании в настоящей заявке термин «содержащий» и его варианты, такие как «содержит» и «содержат», могут быть заменены термином «включающий в себя», «закрывающий в себе» или «имеющий».

Термин «последовательность», используемый в настоящей заявке (например, в таких терминах, как «последовательность тяжелой/легкой цепи», «последовательность антитела», «последовательность вариабельного домена», «последовательность константного домена» или «последовательность белка»), обычно следует понимать как включающий как соответствующую аминокислотную последовательность, так и последовательности нуклеиновых кислот или нуклеотидные последовательности, кодирующие ее, если только контекст не требует более ограниченной интерпретации.

Термин «антигенсвязывающая единица», используемый в настоящей заявке содержит минимальные структурные требования, вытекающие из антитела (т.е. минимальные структурные требования, обычно присутствующие в антителе), которые позволяют связываться с его конкретной мишенью или антигеном. Таким образом, антигенсвязывающая единица содержит по меньшей мере три последовательности CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи; предпочтительно она содержит по меньшей мере вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи.

Обобщенная структура антител или иммуноглобулина хорошо известна специалистам в данной области техники. Эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, как правило, примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей и обычно называются полноразмерными антителами. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью одной дисульфидной связью с образованием гетеродимера, а гетеротетрамерная молекула образуется за счет ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкая и тяжелая цепи связаны вместе одной дисульфидной связью, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьируется в зависимости от изоформа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на амино-конце переменный домен (VH), за которым следуют три или четыре (в случае IgE) константных домена (CH1, CH2, CH3 и CH4), а также шарнирную область между CH1 и CH2. Каждая легкая цепь имеет два домена, N-концевой переменный домен (VL) и C-концевой константный домен (CL). Домен VL нековалентно связывается с доменом VH, тогда как домен CL обычно ковалентно связан с доменом CH1 через дисульфидную связь. Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными доменами легкой и тяжелой цепей (Chothia и соавт., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663). Переменные домены также упоминаются в настоящей заявке как переменные области или Fv и обозначают часть, которая придает антителу специфичность в отношении антигена за счет наличия антигенсвязывающего участка.

«Переменный домен легкой цепи» (или «переменная область легкой цепи») и «переменный домен тяжелой цепи» (или «переменная область тяжелой цепи»), используемые в настоящей заявке имеют одинаковую общую структуру, и каждый домен по существу состоит из четырех каркасных областей (FR), последовательности которых являются широко консервативными, которые упоминаются в данной области техники и в настоящей заявке ниже как «каркасная область 1» или "FR1"; как «каркасная область 2» или «FR2»; как «каркасная область 3» или «FR3»; и как «каркасная область 4» или «FR4»,

соответственно; каркасные области которых прерваны тремя гипервариабельными областями, HVR (или CDR), которые упоминаются в данной области техники и в настоящей заявке ниже как «определяющая комплементарность область 1» или «CDR1»; как «определяющая комплементарность область 2» или «CDR2»; и как «определяющая комплементарность область 3» или «CDR3», соответственно. Таким образом, общую структуру или последовательность вариабельного домена иммуноглобулина можно обозначить следующим образом: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Каркасные области принимают конформацию бета-листа и CDR могут образовывать петли, соединяющие структуру бета-листа. CDR в каждой цепи удерживаются в своей трехмерной структуре каркасными областями и вместе с CDR из другой цепи образуют антигенсвязывающий участок.

В данной области техники известны различные определения CDR, например, определение, основанное на CCG, также называемое IMGT (Lefranc MP, Pommié C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, Thouvenin-Contet V, Lefranc G. «IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains.» *Dev Comp Immunol.* 2003 Jan;27(1):55-77; Giudicelli V, Brochet X, Lefranc MP. «IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences». *Cold Spring Harb Protoc.* 2011;2011(6):695–715) или определение, основанное на Chothia (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 1987, 196: 901–917), совместно с Kabat (E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller and H. Perry, *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda (1983)). В контексте данного изобретения ссылка на CDR основана на определении CCG (IMGT).

Термин «константные домены» или «константная область», используемый в настоящей заявке, обозначает сумму доменов антитела, отличного от вариабельной области. Такие константные домены и области хорошо известны в уровне техники и, например, описаны у Kabat и соавт. («Sequence of proteins of immunological interest», US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91-3242 (1991)). В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей антитела или иммуноглобулина делятся

на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. В соответствии с константными областями тяжелой цепи различные классы иммуноглобулинов называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно. Некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2.

5 «Fc-часть» или «Fc-домен» антитела не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но выполняет различные эффекторные функции. Термин «Fc-часть/домен антитела» хорошо известен специалистам в данной области и определяется на основе расщепления антител папаином. Fc-часть антитела непосредственно участвует в ADCC (антителозависимая  
10 клеточно-опосредованная цитотоксичность) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность) на основе активации комплемента, связывания C1q и связывания рецептора Fc. Активация комплемента (CDC) инициируется связыванием фактора комплемента C1q с Fc-частью большинства подклассов антител IgG. Хотя влияние антитела на систему комплемента зависит от  
15 определенных условий, связывание с C1q вызывается определенными участками связывания в Fc-части. Такими участками связывания являются, например, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация согласно нумерации Eu (Edelman и соавт., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 май;63(1):78-85)). Наиболее важными среди этих остатков в обеспечении связывания  
20 рецептора C1q и Fc $\gamma$  в IgG1 являются L234 и L235 (Hezareh и соавт., J. Virology 75 (2001) 12161- 12168, Shields и соавт. (2001) JBC, 276 (9): 6591–6604). Антитела подкласса IgG1 и IgG3 обычно демонстрируют активацию комплемента и связывание C1q и C3, тогда как IgG2 и IgG4 не активируют систему комплемента и не связывают C1q и C3.

25 Термин «антитело» или «молекула антитела» (используемый в настоящей заявке как синоним) включает в себя моноклональное антитело, поликлональное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, антитело с оптимизированной последовательностью, химерное антитело, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела),  
30 фрагмент антитела, в частности, фрагмент Fv, Fab, Fab' или F(ab')<sub>2</sub>, одноцепочечное антитело, в частности, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), одноцепочечный фрагмент Fab (scFab), иммунофармацевтическое средство на основе модульного белка малого размера (SMIP), доменное

антитело, нанотело ®, диатело. Антитело может иметь эффекторную функцию, такую как ADCC или CDC, которая обычно опосредуется Fc-частью антитела, или оно может не иметь эффекторной функции, например, из-за отсутствия Fc-части или наличия заблокированной маскированной Fc-части, по существу, Fc-части, которая не распознается или недостаточно распознается иммунными клетками или компонентами иммунной системы, такими как система комплемента.

Моноклональные антитела (mAb) представляют собой моноспецифические антитела, которые являются идентичными по аминокислотной последовательности. Они могут быть получены с помощью гибридной технологии из гибридной клеточной линии (называемой гибридомой), представляющей собой клон слияния специфической антителопродуцирующей В-клетки с миеломной клеткой (В-клеточного рака) (Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7). Альтернативно, моноклональные антитела могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (май 1997 г.). «Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells». J Immunol Methods 204 (1): 77–87; см. также ниже). «Рекомбинантное антитело» или «рекомбинантный связывающий белок» представляет собой антитело или связывающий белок, которые были получены с помощью рекомбинантно сконструированной клетки-хозяина. Оно может быть необязательно выделено или очищено.

Молекулы антител в соответствии с настоящим изобретением также включают фрагменты иммуноглобулинов, которые сохраняют антигенсвязывающие свойства, такие как фрагменты Fab, Fab' или F(ab')<sub>2</sub>. Такие фрагменты могут быть получены путем фрагментации иммуноглобулинов, например, протеолитическим расщеплением или рекомбинантной экспрессией таких фрагментов. Например, расщепление иммуноглобулина может быть выполнено с помощью рутинных методов, например, с использованием папаина или пепсина (WO 94/29348). При расщеплении антител папаином обычно образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента (Fabs). Фрагмент Fab состоит из одного константного и одного вариабельного домена каждой из

тяжелой и легкой цепи. Обработка пепсином дает F(ab')<sub>2</sub>. Во фрагментах Fab каждый переменный домен слит с константным доменом иммуноглобулина, предпочтительно человеческого происхождения. Таким образом, переменный домен тяжелой цепи может быть слит с доменом CH1 (так называемый фрагмент Fd), переменный домен легкой цепи может быть слит с доменом CL.

Фрагменты Fab могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии соответствующих нуклеиновых кислот в клетках-хозяевах, см. ниже.

Был разработан ряд технологий для помещения переменных доменов иммуноглобулинов или молекул, полученных из таких переменных доменов, в другой молекулярный контекст. Они также должны рассматриваться как «антитела» или «молекулы антител» в соответствии с настоящим изобретением. Как правило, эти молекулы антител имеют меньший размер по сравнению с иммуноглобулинами и могут содержать одну аминокислотную цепь или несколько аминокислотных цепей. Например, «одноцепочечный переменный фрагмент (scFv)» представляет собой слияние переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, связанных вместе с коротким линкером, обычно серином (S) или глицином (G) (WO 88/01649; WO 91/17271; Huston и соавт.; International Reviews of Immunology, том 10, 1993, 195 - 217).

«Однодоменные антитела» или «нанотела®» содержат антигенсвязывающий сайт в одном Ig-подобном домене (WO 94/04678; WO 03/050531, Ward и соавт., Nature. 1989 октябрь 12;341(6242):544-6; Revets и соавт., Expert Opin Biol Ther. 5(1):111-24, 2005). Одно или несколько однодоменных антител со специфичностью связывания для одного и того же или другого антигена могут быть связаны вместе. «Диатела» представляют собой молекулы двухвалентных антител, состоящие из двух аминокислотных цепей, содержащих два переменных домена (WO 94/13804, Holliger и соавт., Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 июль 15;90(14):6444-8). Другими примерами антителоподобных молекул являются «антитела суперсемейства иммуноглобулинов» (IgSF; Srinivasan and Roeske, Current Protein Pept. Sci. 2005, 6(2): 185-96). Другая концепция приводит к так называемому «иммунофармацевтическому средству на основе модульного белка малого размера (SMIP)», которое содержит домен Fv, связанный с одноцепочечным шарнирным и эффекторным доменами, лишенный константного домена CH1 (WO 02/056910). «Одноцепочечный Fab» или «scFab»

представляет собой слияние домена Fab легкой цепи (т.е. переменного домена легкой цепи (VL), который связан с одним константным доменом легкой цепи (CL)) с доменом Fab тяжелой цепи (т.е. переменный домен тяжелой цепи (VH), который связан с одним константным доменом тяжелой цепи (CH1)).

5 Одноцепочечный Fab способен распознавать и связывать антиген. scFab может также необязательно содержать линкер (например, пептидный линкер), расположенный между доменами CL и VH (Hust и соавт. BMC Biotechnology 2007, 7:14).

Для применения у человека часто желательно снизить иммуногенность  
10 терапевтических молекул, таких как антитела или связывающие белки, содержащие антигенсвязывающую единицу, как описано в настоящей заявке, первоначально полученные от других видов, таких как мышь. Это можно сделать с помощью конструирования химерных антител или с помощью процесса, называемого «гуманизация». В этом контексте под «химерным антителом»  
15 понимают антитело, содержащее часть последовательности (например, переменный домен), полученную из одного вида (например, мыши), слитую с частью последовательности (например, константными доменами), полученную из другого вида (например, человека). В данном контексте «гуманизованное антитело», «гуманизованная антигенсвязывающая единица» или  
20 «гуманизованный домен VL/VH» представляет собой антитело, антигенсвязывающую единицу или домен VH/VL, содержащий переменный домен, первоначально полученный от вида, отличного от человека, где некоторые аминокислоты были мутированы, чтобы сделать общую последовательность этого переменного домена более похожей на  
25 последовательность переменного домена человека. Способы гуманизации антител хорошо известны в данной области (Billetta R, Lobuglio AF. «Chimeric antibodies». Int Rev Immunol. 1993;10(2-3):165-76; Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988). «Reshaping human antibodies for therapy». Nature: 332:323).

30 Термины «человеческое антитело», «человеческая антигенсвязывающая единица» или «человеческий домен VH/VL», используемые в настоящей заявке, включают в себя антитела, антигенсвязывающие единицы или VH/VL-домены, имеющие переменные (и константные, если применимо) области, полученные

из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Термин «человеческое антитело», «человеческая антигенсвязывающая единица» или «человеческий домен VH/VL», используемый в настоящей заявке, не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой  
5 линии другого вида (млекопитающих), такого как мыши, крысы или кролика, были пересажены на каркасные последовательности человека. Таким образом, используемые в настоящей заявке термины «человеческое антитело», «человеческая антигенсвязывающая единица» или «человеческий домен VH/VL» относятся к антителу, антигенсвязывающей единице или домену VH/VL, в  
10 котором каждая часть белка (например, CDR, каркас, домены CL, CH (например, CH1, CH2, CH3), шарнир, VL, VH) является по существу неиммуногенным для человека, с лишь незначительными изменениями или вариациями последовательности, как дополнительно описано в настоящей заявке ниже.

Технологии создания таких «человеческих антител», «человеческих  
15 антигенсвязывающих единиц» или «человеческих доменов VH/VL» были описаны и включают, не ограничиваясь этим, фаговый дисплей или использование трансгенных животных (WWW. Ablexis.com/technology-alivamab.php; WO 90/05144; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths and G. Winter (1991) «By-passing immunisation. Human  
20 antibodies from V-gene libraries displayed on phage». J.Mol.Biol., 222, 581-597; Кнаппик и соавт., J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000; S. Carmen and L. Jermutus, «Concepts in antibody phage display». Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2002 1(2):189-203; Lonberg N, Huszar D. «Human antibodies from transgenic mice». Int Rev Immunol. 1995;13(1):65-93.; Brüggemann M, Taussig MJ.  
25 «Production of human antibody repertoires in transgenic mice». Curr Opin Biotechnol. 1997 Aug;8(4):455-8.).

Таким образом, человеческое антитело, человеческая антигенсвязывающая единица или человеческий домен VH/VL отличаются, например, от химерного или гуманизированного антитела. Указано, что человеческое антитело,  
30 человеческая антигенсвязывающая единица или человеческий домен VH/VL могут продуцироваться отличной от человека животной или прокариотической или эукариотической клеткой, которая способна экспрессировать

функционально реаранжированный человеческий иммуноглобулин (например, тяжелую цепь и/или легкую цепь) генов.

Химерные, гуманизированные или человеческие антитела, антигенсвязывающие единицы или домены VH/VL в соответствии с настоящим изобретением могут быть дополнительно оптимизированы; также называемые в настоящей заявке как «оптимизированными» антителами или антителами «с оптимизированной последовательностью», антигенсвязывающими единицами или доменами VH/VL. Такая оптимизация включает, без ограничения, удаление или замену нежелательных аминокислот, например, для снижения иммуногенности у человека или для предотвращения дезамидирования, нежелательных зарядов, липофильности или неспецифического связывания. Такое удаление или замена нежелательных аминокислот могут быть осуществлены, например, путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*. Более того, в связи с химерными или гуманизированными антителами, антигенсвязывающими единицами или доменами VH/VL следует понимать, что некоторые остатки FR мыши могут быть важны для функции оптимизированных антител, антигенсвязывающих единиц и доменов VH/VL. Следовательно, эти важные аминокислотные остатки могут быть сохранены в оптимизированном антителе, антигенсвязывающей единице и домене VH/VL.

Термин «мономер» относится к гомогенной форме антитела или мультиспецифического белка, как описано в настоящей заявке. Например, для полноразмерного антитела мономер означает мономерное антитело, имеющее две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи. В контексте настоящего изобретения мономер означает белок в соответствии с настоящим изобретением, имеющий одну антигенсвязывающую единицу, специфичную для B7H6, и одну антигенсвязывающую единицу, специфичную для CD3, как описано в настоящей заявке. Например, мономер связывающего белка, описанный в настоящей заявке, может иметь две полипептидные цепи, первая полипептидная цепь, содержащая одноцепочечный Fab, специфичный для B7H6, и первый домен Fc, и вторая полипептидная цепь, содержащая одноцепочечный Fab, специфичный для CD3 и второй домен Fc.

Эпитоп представляет собой область антигена, которая связана антителом или антигенсвязывающим фрагментом (например, антигенсвязывающей единицей белков, описанных в настоящей заявке). Термин «эпитоп» включает в себя любую полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления детерминанты эпитопов включают в себя химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, гликановые боковые цепи, фосфорил или сульфонил, и в некоторых вариантах осуществления могут иметь конкретные трехмерные структурные характеристики и/или конкретные характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первыми, но не со вторыми, теряется в присутствии денатурирующих растворителей.

Антигенсвязывающая молекула/белок (такая как иммуноглобулин, антитело, антигенсвязывающая единица или фрагмент такой антигенсвязывающей молекулы/белка), которая может «связываться», «связываться с», «специфически связываться» или «специфически связываться с» означает «связывание (с)» или «специфическое связывание с», которое «имеет сродство к», «специфично для» и/или которое «имеет специфичность к» определенному эпитопу, антигену или белку (или по меньшей мере к одной его части, фрагменту или его эпитопу) действует «против» или «направлено против» указанного эпитопа, антигена или белка или является «связывающей» молекулой/белком по отношению к такому эпитопу, антигену или белку. Эти термины используют в настоящей заявке взаимозаменяемо.

Используемые в настоящей заявке термины «связывание» и «специфическое связывание» относятся к связыванию антигенсвязывающей молекулы/белка (такого как иммуноглобулин, антитело, антигенсвязывающая единица или фрагмент такой антигенсвязывающей молекулы/белка) с эпитопом антигена в анализе *in vitro*, предпочтительно в анализе поверхностного плазмонного резонанса ((Malmqvist M., «Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics», Curr Opin Immunol. 1993 Apr;5(2):282-6.)) с очищенным антигеном дикого типа. Аффинность антител можно также измерить с помощью технологии анализа кинетического исключения (KinExA) (Darling, R.J., and Brault P-A., «Kinetic exclusion assay

technology: Characterization of Molecular Interactions». ASSAY and Drug Development Technologies. 2004, декабрь 2(6): 647-657). Например, связывающий белок или белок в соответствии с изобретением связывается с эпитопом В7Н6 с его первой антигенсвязывающей единицей/первой полипептидной цепью и с эпитопом CD3 с его второй антигенсвязывающей единицей/второй полипептидной цепью.

Как правило, термин «специфичность» относится к числу различных типов антигенов или эпитопов, с которыми может связываться конкретная антигенсвязывающая молекула/белок (такие как иммуноглобулин, антитело, антигенсвязывающая единица или фрагмент такой антигенсвязывающей молекулы/белка). Специфичность связывания в отношении В7Н6 означает, что антигенсвязывающий белок/молекула в соответствии с изобретением (например, первая антигенсвязывающая единица такого связывающего белка) имеет значительно более высокую аффинность связывания с В7Н6, чем со структурно неродственными молекулами. Специфичность связывания в отношении CD3 означает, что антигенсвязывающий белок/молекула в соответствии с изобретением (например, вторая антигенсвязывающая единица такого связывающего белка) обладает значительно более высокой аффинностью связывания с CD3, чем со структурно неродственными молекулами.

Специфичность антигенсвязывающей молекулы/белка можно определить на основе ее аффинности и/или avidности. Аффинность, представленная константой равновесия диссоциации антигена с антигенсвязывающим белком ( $K_D$ ), представляет собой меру силы связывания между эпитопом и антигенсвязывающим участком на антигенсвязывающей молекуле/белке: чем меньше значение  $K_D$ , тем сильнее сила связывания между эпитопом и антигенсвязывающим участком (в качестве альтернативы аффинность также может быть выражена как константа аффинности ( $K_A$ ), которая равна  $1/K_D$ ). Как будет понятно специалисту в данной области (например, на основании дальнейшего раскрытия в настоящей заявке), аффинность можно определить известным способом, в зависимости от конкретного интересующего антигена. Avidность представляет собой меру силы связывания между антигенсвязывающей молекулой/белком (таким как иммуноглобулин, антитело, антигенсвязывающая единица или фрагмент такой антигенсвязывающей

молекулы/белка) и соответствующим антигеном. Авидность связана как с аффинностью между эпитопом и его антигенсвязывающим участком на антигенсвязывающей молекуле/белке, так и с количеством соответствующих участков связывания, присутствующих на антигенсвязывающей молекуле/белке.

5 При ссылке на антигенсвязывающую единицу/антиген, лиганд/рецептор или другую связывающую пару термин «специфически связывает» или «селективно связывает» указывает на реакцию связывания, которая определяет присутствие белка в гетерогенной популяции белков и другие биопрепараты. Таким образом, в указанных условиях конкретная антигенсвязывающая единица  
10 связывается с конкретным антигеном и не связывается в значительном количестве с другими белками, присутствующими в образце. Антигенсвязывающая единица связывается со своим антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза выше, предпочтительно по меньшей мере в десять раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше и  
15 наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз выше в указанных условиях, чем аффинность с неродственными антигенами.

Термин «выделенный», используемый в настоящей заявке, относится к материалу, который удален из его исходной или естественной среды (например, естественной окружающей среды, если он встречается в природе). Например,  
20 встречающийся в природе полинуклеотид или полипептид, присутствующий в живом организме, не выделяют, а выделяют тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенный вмешательством человека от некоторых или всех сосуществующих материалов в природной системе. Такие полинуклеотиды могут быть частью вектора, и/или такие полинуклеотиды или полипептиды  
25 могут быть частью композиции, и все же быть выделенными в том смысле, что такой вектор или композиция не являются частью среды, в которой они встречаются в природе. Например, молекула нуклеиновой кислоты, белка/полипептида рассматривается как находящаяся «(в) основном выделенном (виде)» - по сравнению с ее природным биологическим источником и/или  
30 реакционной средой или средой культивирования, из которой она была получена - когда она была отделена по меньшей мере от одного другого компонента, с которым она обычно связана в указанном источнике или среде, такой как другая нуклеиновая кислота, другой белок/полипептид, другой биологический

компонент или макромолекула или по меньшей мере один загрязнитель, примесь или второстепенный компонент. В частности, молекула нуклеиновой кислоты или белка/полипептида считается «по существу выделенной», если она была очищена по меньшей мере 2 раза, в частности, по меньшей мере 10-кратно, более конкретно по меньшей мере 100-кратно и до 1000 раз или более. Молекула нуклеиновой кислоты или белка/полипептида, которая находится «по существу в выделенном виде», предпочтительно является по существу гомогенной, как определено с использованием подходящей методики, такой как подходящая хроматографическая методика, например, электрофорез в полиакриламидном геле.

Используемые в настоящей заявке термины «идентичный» или «процент идентичности» в контексте двух или большего количества последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, относятся к двум или большему количеству последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотные остатки, которые одинаковы при сравнении и выровнены для максимального соответствия. Чтобы определить процент идентичности, последовательности выравнивают для оптимальных целей сравнения (например, пробелы могут быть введены в последовательность первой аминокислоты или последовательность нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания со второй последовательностью аминокислоты или нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. Когда положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы в этом положении идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, разделенных последовательностями (то есть  $\% \text{ идентичности} = \frac{\# \text{ идентичных положений}}{\text{общее } \# \text{ положений}} \times 100$ ). В некоторых вариантах осуществления две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после того, как в последовательности введены пробелы, в зависимости от случая (например, за исключением дополнительной последовательности, выходящей за пределы сравниваемых

последовательностей). Например, когда сравнивают последовательности  
вариабельной области, то лидерные (сигнального пептида) и/или  
последовательности константной области не учитывают. Для сравнений  
последовательностей между двумя последовательностями «соответствующая»  
5 CDR относится к CDR в одном и том же месте в обеих последовательностях  
(например, CDR-H1 каждой последовательности).

Определение процента идентичности или процента сходства между двумя  
последовательностями может быть выполнено с использованием  
математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером  
10 математического алгоритма, используемого для сравнения двух  
последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA 87:2264-2268, измененный, как в Karlin and Altschul, 1993, Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы  
NBLAST и XBLAST от Altschul и соавт., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Поиск  
15 нуклеотидов BLAST может быть осуществлен с помощью программы NBLAST,  
оценка = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных  
последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей  
интересующий белок. Поиск белка BLAST может быть осуществлен с помощью  
программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, для получения  
20 аминокислотных последовательностей, гомологичных интересующему белку.  
Для получения выравниваний с пробелом для сравнения можно использовать  
Gapped BLAST, как описано в Altschul и соавт., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-  
3402. В качестве альтернативы PSI-Blast может быть использован для  
осуществления итеративного поиска, который обнаруживает отдаленные  
25 отношения между молекулами (Id.). При использовании программ BLAST,  
Gapped BLAST и PSI-Blast, могут быть использованы параметры по умолчанию  
соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим  
предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма,  
используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Майерса  
30 и Миллера, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN  
(версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для  
выравнивания последовательности GCG. При использовании программы ALIGN  
для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать

таблицу веса остатков PAM120, штраф за длину пробела 12 и штраф за пробел 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательности известны в данной области техники и включают ADVANCE и ADAM, как описано в Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; и FASTA, описанный в Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8. В рамках FASTA, представляет собой опцию управления, которая устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если  $ktup=2$ , то находят сходные области в двух сравниваемых последовательностях, просматривая пары выровненных остатков; если  $ktup=1$ , то исследуют отдельно выровненные аминокислоты.  $ktup$  может быть установлен на 2 или 1 для последовательностей белка, или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. По умолчанию, если  $ktup$  не указан, то это 2 для белков и 6 для ДНК. Альтернативно, выравнивание последовательности белка может быть выполнено с использованием алгоритма CLUSTAL W, как описано в Higgins и соавт., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

Используемый в настоящей заявке термин «соединённый ковалентной связью» или «ковалентно связанный» означает или прямую ковалентную связь между остатками, или не прямое соединение/связь, где два остатка не связаны напрямую, но оба ковалентно связаны с промежуточной молекулой или доменом, например промежуточный домен иммуноглобулина или линкера.

#### Мультиспецифические связывающие белки в соответствии с изобретением

Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, содержащим по меньшей мере одну антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с В7Н6 (первая антигенсвязывающая единица), и по меньшей мере одну антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3 (вторая антигенсвязывающая единица). За счет одновременного связывания антигена опухолевых клеток и CD3 на Т-клетке связывающие белки действуют как белки, активирующие Т-клетки, и также упоминаются в настоящей заявке как активаторы Т-клеток. Термин «(мультиспецифический) связывающий белок» используют в настоящей заявке взаимозаменяемо с термином «(мультиспецифическая) связывающая молекула». Дополнительные термины, используемые в настоящей заявке для обозначения мультиспецифического связывающего белка в соответствии с изобретением представляют собой «белок в соответствии с изобретением», «связывающий

белок в соответствии с изобретением», «антигенсвязывающий белок», а также «мультиспецифический белок».

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что мультиспецифические связывающие белки в соответствии с изобретением индуцируют мощный и селективный лизис В7Н6-положительных клеточных линий колоректального рака в присутствии Т-клеток и уже активны при низком соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней. Важно отметить, что связывающие белки в соответствии с изобретением не лизируют В7Н6-отрицательные клетки и не вызывают активацию Т-клеток, пролиферацию Т-клеток и секрецию цитокинов в отсутствие В7Н6-положительных клеток. Примечательно, что белки в соответствии с изобретением, которые не ингибируют активацию В7Н6-зависимых НК-клеток через НКр30 *in vitro*, более эффективно лизируют В7Н6-положительные опухолевые клетки. Эта активность описана, например, в анализе *in vitro* в Примере 11.

Во избежание сомнений, В7Н6, используемый в настоящей заявке, относится к В7Н6 человека UniProt Q68D85 и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей этот белок. CD3, используемый в настоящей заявке относится к комплексам CD3 эпсилон (UniProt P07766) и CD3 гамма (UniProt: P09693), (комплексы CD3εγ человека). Специалисту в данной области техники будет понятно, что термины В7Н6 и В7-Н6 используют в настоящей заявке взаимозаменяемо.

В одном аспекте мультиспецифический связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с В7Н6 и вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, при этом указанная первая связывающая единица выбрана из группы, которая включает в себя i) - xxiv):

i) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3) (антигенсвязывающая единица В7Н6#1);

ii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1),

SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#2);

iii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#3);

iv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID NO:24 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#4);

v) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID NO:30 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#5);

vi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID NO:36 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#6);

vii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) и SEQ ID NO:39 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:40 (CDR1), SEQ ID NO:41 (CDR2) и SEQ ID NO:42 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#7);

viii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) и SEQ ID NO:45 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:46 (CDR1),  
5 SEQ ID NO:47 (CDR2) и SEQ ID NO:48 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#8);

ix) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:49 (CDR1), SEQ ID NO:50 (CDR2) и SEQ ID NO:51 (CDR3) и CDR тяжелой цепи,  
10 включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:52 (CDR1), SEQ ID NO:53 (CDR2) и SEQ ID NO:54 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#9);

x) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1),  
15 SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) и SEQ ID NO:60 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#10);

xi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1),  
20 SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#11);

xii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1),  
25 SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3) (антигенсвязывающая единица  
30 B7H6#12));

xiii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:73 (CDR1),  
SEQ ID NO:74 (CDR2) и SEQ ID NO:75 (CDR3) и CDR тяжелой цепи,

включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:76 (CDR1), SEQ ID NO:77 (CDR2) и SEQ ID NO:78 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#13);

xiv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#14);

xv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#15);

xvi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID NO:93 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#16);

xvii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:97 (CDR1), SEQ ID NO:98 (CDR2) и SEQ ID NO:99 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:100 (CDR1), SEQ ID NO:101 (CDR2) и SEQ ID NO:102 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#17);

xviii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:103 (CDR1), SEQ ID NO:104 (CDR2) и SEQ ID NO:105 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:106 (CDR1), SEQ ID NO:107 (CDR2) и SEQ ID NO:108 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#18);

xix) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:109 (CDR1), SEQ ID NO:110 (CDR2) и SEQ ID NO:111 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:112 (CDR1), SEQ ID NO:113 (CDR2) и SEQ ID NO:114 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#19);

xx) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:115 (CDR1), SEQ ID NO:116 (CDR2) и SEQ ID NO:117 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:118 (CDR1), SEQ ID NO:119 (CDR2) и SEQ ID NO:120 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#20);

xxi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:121 (CDR1), SEQ ID NO:122 (CDR2) и SEQ ID NO:123 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:124 (CDR1), SEQ ID NO:125 (CDR2) и SEQ ID NO:126 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#21);

xxii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:127 (CDR1), SEQ ID NO:128 (CDR2) и SEQ ID NO:129 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:130 (CDR1), SEQ ID NO:131 (CDR2) и SEQ ID NO:132 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#22);

xxiii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#23); и

xxiv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3) и CDR тяжелой цепи,

включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3) (антигенсвязывающая единица B7H6#24).

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением, указанная вторая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с CD3, выбрана из группы, которая включает в себя i) - vi):

i) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3) (антигенсвязывающая единица CD3#1);

ii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:263 (CDR1), SEQ ID NO:264 (CDR2) и SEQ ID NO:265 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:266 (CDR1), SEQ ID NO:267 (CDR2) и SEQ ID NO:268 (CDR3) (антигенсвязывающая единица CD3#2);

iii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:269 (CDR1), SEQ ID NO:270 (CDR2) и SEQ ID NO:271 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:272 (CDR1), SEQ ID NO:273 (CDR2) и SEQ ID NO:274 (CDR3) (антигенсвязывающая единица CD3#3);

iv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:275 (CDR1), SEQ ID NO:276 (CDR2) и SEQ ID NO:277 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:278 (CDR1), SEQ ID NO:279 (CDR2) и SEQ ID NO:280 (CDR3) (антигенсвязывающая единица CD3#4);

v) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:281 (CDR1), SEQ ID NO:282 (CDR2) и SEQ ID NO:283 (CDR3) и CDR тяжелой цепи,

включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:284 (CDR1), SEQ ID NO:285 (CDR2) и SEQ ID NO:286 (CDR3) (антигенсвязывающая единица CD3#5); и

vi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:287 (CDR1), SEQ ID NO:288 (CDR2) и SEQ ID NO:289 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:290 (CDR1), SEQ ID NO:291 (CDR2) и SEQ ID NO:292 (CDR3) (антигенсвязывающая единица CD3#6).

Первые антигенсвязывающие единицы i) - xxiv) как указано выше, называются В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, и В7Н6#24, соответственно, а вторые антигенсвязывающие единицы i) - vi) как указано выше, называются CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 и CD3#6, соответственно. В настоящей заявке представлена таблица последовательностей, которая позволяет легко идентифицировать отдельные аминокислотные последовательности до специфических антигенсвязывающих единиц и полноразмерных связывающих белков в соответствии с настоящим изобретением. Резюме представлено в таблице 1 в примере 2.

Термины «первый» и «второй» по отношению к антигенсвязывающим единицам в целом, используемые в настоящей заявке, предназначены исключительно для обозначения того, что эти единицы представляют собой две разные единицы (поскольку они связываются с разными антигенами-мишенями). Таким образом, эти термины не следует понимать как относящиеся к точному порядку или последовательности единиц в связывающем белке в соответствии с изобретением.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую антигенсвязывающую единицу, выбранную из группы, состоящей из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23 и В7Н6#24 как определено соответствующими последовательностями

CDR, представленными в таблице 1, и вторую антигенсвязывающую единицу, выбранную из группы, состоящей из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 и CD3#6, как определено соответствующими последовательностями CDR, представленными в таблице 1.

5 В некоторых вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую антигенсвязывающую единицу, выбранную из группы, состоящей из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, 10 В7Н6#23 и В7Н6#24, как определено соответствующими последовательностями CDR, представленными в таблице 1 и вторую антигенсвязывающую единицу CD3#1, как определено соответствующими последовательностями CDR, представленными в таблице 1. В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую 15 антигенсвязывающую единицу, выбранную из группы, состоящей из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, и В7Н6#24, как определено соответствующими последовательностями CDR, представленными в таблице 1 и вторую антигенсвязывающую единицу CD3#1, 20 как определено соответствующими последовательностями CDR, представленными в таблице 1. В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую антигенсвязывающую единицу, выбранную из группы, состоящей из В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, 25 В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, и В7Н6#24, как определено соответствующими последовательностями CDR, представленными в таблице 1 и вторую антигенсвязывающую единицу CD3#1, как определено соответствующими последовательностями CDR, представленными в таблице 1. В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением 30 содержит первую антигенсвязывающую единицу, выбранную из группы, состоящей из В7Н6#12, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16 и В7Н6#23, как определено соответствующими последовательностями CDR, представленными в таблице 1 и

вторую антигенсвязывающую единицу CD3#1, как определено соответствующими последовательностями CDR, представленными в таблице 1.

В дополнение к последовательностям CDR, изложенным в настоящей заявке, антигенсвязывающие единицы связывающих белков в соответствии с изобретением включают последовательности каркасной области (FR) иммуноглобулина. Эти последовательности предпочтительно не являются иммуногенными для человека и поэтому предпочтительно являются человеческими, гуманизированными или оптимизированными последовательностями FR. Подходящие человеческие, гуманизированные или оптимизированные последовательности FR известны в данной области. Конкретно предпочтительные последовательности FR могут быть взяты из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, раскрывающих полные антигенсвязывающие единицы и таким образом, последовательности CDR, а также последовательности FR.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с B7H6, содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3) и вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3). Такой антигенсвязывающий белок обозначен в настоящей заявке как B7H6#14/CD3#1. В особенно предпочтительном варианте осуществления каждая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с B7H6 и CD3, соответственно, содержит CDR, как определено выше (B7H6#12/CD3#1) в домене VL/VH, например, домен VL/VH с оптимизированной последовательностью. В особенно предпочтительном варианте осуществления каждая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с B7H6 и CD3, соответственно

(B7H6#12/CD3#1), образована посредством scFab и необязательно каждая связана с доменом Fc.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с B7H6, содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3) и вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3). Такой антигенсвязывающий белок обозначен в настоящей заявке как B7H6#14/CD3#1. В особенно предпочтительном варианте осуществления каждая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с B7H6 и CD3, соответственно, содержит CDR, как определено выше (B7H6#14/CD#1) в домене VL/VH, например, домена VL/VH с оптимизированной последовательностью. В особенно предпочтительном варианте осуществления, каждая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с B7H6 и CD3, соответственно (B7H6#14/CD3#1), образована посредством scFab и необязательно каждая связана с доменом Fc.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с B7H6, содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3) и вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие

в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3). Такой антигенсвязывающий белок обозначен в настоящей заявке как B7H6#15/CD3#1. В особенно предпочтительном варианте осуществления, каждая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с B7H6 и CD3, соответственно, содержит CDR, как определено выше (B7H6#15/CD3#1) в домене VL/VH, например, домене VL/VH с оптимизированной последовательностью. В особенно предпочтительном варианте осуществления каждая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с B7H6 и CD3, соответственно (B7H6#15/CD3#1), образована посредством scFab и необязательно каждая связана с доменом Fc.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с B7H6, содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID NO:93 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3) и вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3). Такой антигенсвязывающий белок обозначен в настоящей заявке как B7H6#16/CD3#1. В особенно предпочтительном варианте осуществления каждая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с B7H6 и CD3, соответственно, содержит CDR, как определено выше (B7H6#16/CD3#1) в домене VL/VH, например, домен VL/VH с оптимизированной последовательностью. В особенно предпочтительном варианте осуществления каждая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с B7H6 и CD3, соответственно (B7H6#16/CD3#1), образована посредством scFab и необязательно каждая связана с доменом Fc.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с В7Н6, содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3) и вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3). Такой антигенсвязывающий белок обозначен в настоящей заявке как В7Н6#14/CD3#1. В особенно предпочтительном варианте осуществления каждая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с В7Н6 и CD3, соответственно, содержит CDR, как определено выше (В7Н6#23/CD3#1) в домене VL/VH, например, домен VL/VH с оптимизированной последовательностью. В особенно предпочтительном варианте осуществления каждая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с В7Н6 и CD3, соответственно (В7Н6#23/CD3#1), образована посредством scFab и необязательно каждая связана с доменом Fc.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающих белков в соответствии с изобретением каждая из первой и второй связывающей единицы содержит переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, причем указанные переменные домены легкой/тяжелой цепи определяются последовательностями CDR любого из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23 или В7Н6#24 для первой антигенсвязывающей единицы и указанные переменные домены легкой/тяжелой цепи определяются последовательностями CDR любого из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6 для второй антигенсвязывающей единицы. В некоторых вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением домен VH

и/или VL антигенсвязывающих единиц любого из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, В7Н6#24, CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6 представляет собой человеческий, гуманизированный или оптимизированный домен VH и/или VL.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением переменные домены легкой/тяжелой цепи первой антигенсвязывающей единицы, специфически связывающейся с В7Н6, дополнительно определены следующим образом:

i) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:146 (антигенсвязывающая единица В7Н6#1); или

ii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:147 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:148 (антигенсвязывающая единица В7Н6#2); или

iii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:149 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:150 (антигенсвязывающая единица В7Н6#3); или

iv) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:151 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:152 (антигенсвязывающая единица В7Н6#4); или

v) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:153 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:154 (антигенсвязывающая единица В7Н6#5); или

vi) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:155 и переменный домен тяжелой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:156 (антигенсвязывающая единица B7H6#6); или

vii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:157 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:158 (антигенсвязывающая единица B7H6#7); или

viii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:159 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:160 (антигенсвязывающая единица B7H6#8); или

ix) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:161 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:162 (антигенсвязывающая единица B7H6#9); или

x) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:163 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:164 (антигенсвязывающая единица B7H6#10); или

xi) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:165 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:166 (антигенсвязывающая единица B7H6#11); или

xii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:167 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:168 (антигенсвязывающая единица B7H6#12); или

xiii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:169 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:170 (антигенсвязывающая единица B7H6#13); или

xiv) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:171 и переменный домен тяжелой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:172 (антигенсвязывающая единица B7H6#14); или

xv) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:173 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:174 (антигенсвязывающая единица B7H6#15); или

xvi) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:175 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:176 (антигенсвязывающая единица B7H6#16); или

xvii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:177 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:178 (антигенсвязывающая единица B7H6#17); или

xviii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:180 (антигенсвязывающая единица B7H6#18); или

xix) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182 (антигенсвязывающая единица B7H6#19); или

xx) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:183 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:184 (антигенсвязывающая единица B7H6#20); или

xxi) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:185 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:186 (антигенсвязывающая единица B7H6#21); или

xxii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:187 и переменный домен тяжелой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:188 (антигенсвязывающая единица B7H6#22); или

xxiii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:189 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:190 (антигенсвязывающая единица B7H6#23); или

xxiv) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:191 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:192 (антигенсвязывающая единица B7H6#24).

В предпочтительных вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением, переменные домены легкой/тяжелой цепи второй антигенсвязывающей единицы, специфически связывающейся с CD3 дополнительно определены следующим образом:

i) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294 (антигенсвязывающая единица CD3#1); или

ii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:295 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:296 (антигенсвязывающая единица CD3#2); или

iii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:297 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:298 (антигенсвязывающая единица CD3#3); или

iv) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:299 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:300 (антигенсвязывающая единица CD3#4); или

v) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:301 и переменный домен тяжелой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:302 (антигенсвязывающая единица CD3#5); или

vi) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:303 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:304 (антигенсвязывающая единица CD3#6).

В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит комбинацию первой и второй антигенсвязывающей единицы, выбранной из группы, состоящей из V7H6#1/CD3#1, V7H6#2/CD3#1, V7H6#3/CD3#1, V7H6#4/CD3#1, V7H6#5/CD3#1, V7H6#6/CD3#1, V7H6#7/CD3#1, V7H6#8/CD3#1, V7H6#9/CD3#1, V7H6#10/CD3#1, V7H6#11/CD3#1, V7H6#12/CD3#1, V7H6#13/CD3#1, V7H6#14/CD3#1, V7H6#15/CD3#1, V7H6#16/CD3#1, V7H6#17/CD3#1, V7H6#18/CD3#1, V7H6#19/CD3#1, V7H6#20/CD3#1, V7H6#21/CD3#1, V7H6#22/CD3#1, V7H6#23/CD3#1 и V7H6#24/CD3#1, первая и вторая антигенсвязывающие единицы определяются последовательностями CDR и/или VH и VL антигенсвязывающих единиц, как показано в таблице 1.

В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит комбинацию первой и второй антигенсвязывающей единицы, выбранной из группы, состоящей из V7H6#1/CD3#1, V7H6#2/CD3#1, V7H6#3/CD3#1, V7H6#4/CD3#1, V7H6#5/CD3#1, V7H6#12/CD3#1, V7H6#13/CD3#1, V7H6#14/CD3#1, V7H6#15/CD3#1, V7H6#16/CD3#1, V7H6#17/CD3#1, V7H6#18/CD3#1, V7H6#19/CD3#1, V7H6#20/CD3#1, V7H6#21/CD3#1, V7H6#22/CD3#1, V7H6#23/CD3#1 и V7H6#24/CD3#1, причем первая и вторая антигенсвязывающие единицы определяются CDR и/или последовательностями VH и VL антигенсвязывающих единиц, как показано в таблице 1.

В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит комбинацию первой и второй антигенсвязывающей единицы, выбранной из группы, состоящей из V7H6#12/CD3#1, V7H6#13/CD3#1, V7H6#14/CD3#1, V7H6#15/CD3#1, V7H6#16/CD3#1, V7H6#17/CD3#1, V7H6#18/CD3#1, V7H6#19/CD3#1, V7H6#20/CD3#1, V7H6#21/CD3#1, V7H6#22/CD3#1, V7H6#23/CD3#1 и

В7Н6#24/CD3#1, причем первая и вторая антигенсвязывающие единицы определяются CDR и/или последовательностями VH и VL антигенсвязывающих единиц антигенсвязывающих единиц, как показано в таблице 1.

В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит комбинацию первой и второй антигенсвязывающей единицы, выбранной из группы, состоящей из В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1 и В7Н6#23/CD3#1, первая и вторая антигенсвязывающие единицы определяются CDR и/или последовательностями VH и VL антигенсвязывающих единиц антигенсвязывающих единиц, как показано в таблице 1.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с В7Н6, содержащим вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:167 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:168 и (ii) вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, содержащую вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294. Такой связывающий белок обозначен в настоящей заявке как В7Н6#12/CD3#1. В особенно предпочтительном варианте осуществления, антигенсвязывающие единицы, специфически связывающиеся с В7Н6 и CD3, соответственно, как определено выше (В7Н6#12/CD3#1) каждая из которых образована посредством scFab и необязательно каждая ковалентно связана с доменом Fc.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с В7Н6, содержащим вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:171 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:172 и (ii) вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, содержащую вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID

NO:293 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294. Такой связывающий белок обозначен в настоящей заявке как В7Н6#14/CD3#1. В особенно предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающие единицы, специфически связывающиеся с В7Н6 и CD3, соответственно, как определено выше (В7Н6#14/CD3#1) каждая из которых образована посредством scFab и необязательно каждая ковалентно связана с доменом Fc.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с В7Н6, содержащим вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:173 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:174 и (ii) вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, содержащую вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294. Такой связывающий белок обозначен в настоящей заявке как В7Н6#15/CD3#1. В особенно предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающие единицы, специфически связывающиеся с В7Н6 и CD3, соответственно, как определено выше (В7Н6#15/CD3#1), каждая из которых образована посредством scFab и необязательно каждая ковалентно связана с доменом Fc.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с В7Н6, содержащим вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:175 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:176 и (ii) вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, содержащую вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294. Такой связывающий белок обозначен в настоящей заявке как В7Н6#16/CD3#1. В особенно предпочтительном варианте

осуществления, антигенсвязывающие единицы, специфически связывающиеся с В7Н6 и CD3, соответственно, как определено выше (В7Н6#16/CD3#1), каждая из которых образована посредством scFab и необязательно каждая ковалентно связана с доменом с доменом Fc.

5 В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с В7Н6, содержащим вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:189 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:190 и (ii) вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, содержащую вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294. Такой связывающий белок обозначен в  
10 настоящей заявке как В7Н6#23/CD3#1. В особенно предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающие единицы, специфически связывающиеся с В7Н6 и CD3, соответственно, как определено выше (В7Н6#23/CD3#1) каждая из которых образована посредством scFab, и необязательно каждая ковалентно связана с доменом Fc.

20 В некоторых вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит i) первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с В7Н6 (например, любой из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18  
25 В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, В7Н6#24 как определено соответствующими последовательностями CDR или VH/VL, показанными в таблице 1), которые содержат первый вариабельный домен легкой цепи, ковалентно связанный с первым вариабельным доменом тяжелой цепи с помощью первого пептидного линкера и/или ii) вторую антигенсвязывающую  
30 единицу, специфически связывающуюся с CD3 (например, любой из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6, как определено соответствующими последовательностями CDR или VH/VL, показанными в таблице 1), который содержит второй вариабельный домен легкой цепи, ковалентно связанный со

вторым варибельным доменом тяжелой цепи вторым пептидным линкером. Необязательно первая и вторая антигенсвязывающие единицы ковалентно связаны друг с другом пептидным линкером.

В некоторых вариантах осуществления связывающих белков в соответствии с изобретением первая и/или вторая антигенсвязывающие единицы дополнительно содержат домен CL и CH1, как в легком/тяжелом фрагменте Fab традиционной молекулы антитела, таким образом, указанная первая связывающая единица содержит а) домен VL (например, определяемый CDR легкой цепи (LCCDR) или последовательностями VL любого из V7H6#1, V7H6#2, V7H6#3, V7H6#4, V7H6#5, V7H6#6, V7H6#7, V7H6#8, V7H6#9, V7H6#10, V7H6#11, V7H6#12, V7H6#13, V7H6#14, V7H6#15, V7H6#16, V7H6#17, V7H6#18, V7H6#19, V7H6#20, V7H6#21, V7H6#22, V7H6#23, или V7H6#24), ковалентно связанный (предпочтительно непосредственно связанный) с первым доменом CL и б) домен VH (например, определяемым CDR тяжелой цепи CDR (HCCDR) или последовательностями VH любого из V7H6#1, V7H6#2, V7H6#3, V7H6#4, V7H6#5, V7H6#6, V7H6#7, V7H6#8, V7H6#9, V7H6#10, V7H6#11, V7H6#12, V7H6#13, V7H6#14, V7H6#15, V7H6#16, V7H6#17, V7H6#18, V7H6#19, V7H6#20, V7H6#21, V7H6#22, V7H6#23, или V7H6#24), ковалентно связанный (предпочтительно непосредственно связанный) с первым доменом CH1 и/или указанная вторая антигенсвязывающая единица содержит а) домен VL (например, определяется последовательностями LCCDR или VL любого из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6), ковалентно связанный (предпочтительно непосредственно связанный) со вторым доменом CL и б) домен VH (например, определяется последовательностями HCCDR или VH любого из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6) ковалентно связанный (предпочтительно непосредственно связанный) со вторым доменом CH1.

В контексте настоящего изобретения домен CL представляет собой константный домен легкой цепи антитела, например, или легкой цепи каппа ( $\kappa$ ) или лямбда ( $\lambda$ ). Пример константной области легкой цепи каппа показан в SEQ ID NO:247. Пример константной области легкой цепи лямбда показан в SEQ ID NO:248. В некоторых вариантах осуществления первый и второй домен CL являются одними и теми же, например, и первый, и второй домен CL

представляют собой константные домены легкой цепи каппа, или первый и второй домены CL оба представляют собой константные домены легкой цепи лямбда. В предпочтительных вариантах осуществления первый и второй домен CL являются разными, например, первый домен CL представляет собой константный домен каппа, а второй домен CL представляет собой константный домен лямбда или наоборот.

В контексте настоящего изобретения домен CH1 представляет собой первый константный домен тяжелой цепи антитела. Пример константного домена CH1 показан в SEQ ID NO:249.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающих белков в соответствии с изобретением первая антигенсвязывающая единица, специфическая для В7Н6 (например, любая из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6 В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23 или В7Н6#24, определена посредством CDR и/или последовательностями VH/VL, представленными в Таблице 1) содержит от N- до C-конца: первый переменный домен легкой цепи, первый домен CL, первый линкерный пептид, первый домен VH и первый домен CH1, и/или вторая связывающая единица (например, CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6, определенная посредством CDR и/или последовательностями VH/VL, представленными в Таблице 1) связывающих белков в соответствии с изобретением содержит от N- до C-конца: второй переменный домен легкой цепи, второй домен CL, второй линкерный пептид, второй домен VH и второй домен CH1. В этих вариантах осуществления первая и/или вторая связывающая единица имеют структуру одноцепочечного Fab. Как для первой, так и для второй антигенсвязывающей единицы при формировании одноцепочечного Fab порядок может быть обратным, так что от N-конца к C-концу антигенсвязывающая единица содержит: VH-CH1-[линкерный пептид]-VL-CL. В некоторых вариантах осуществления белка в соответствии с изобретением, когда первая и/или вторая антигенсвязывающая единица содержит Fab или одноцепочечный Fab, константные домены могут быть одного типа (например, оба домена CL представляют собой константные домены легкой цепи каппа или лямбда) или разных типов (первый домен CL представляет собой каппа, а второй

домен CL представляет собой константный домен легкой цепи лямбда или наоборот), предпочтительно первый и второй домен CL относятся к разным типам. В предпочтительных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая единица состоит из первого одноцепочечного Fab, специфичного в отношении В7Н6 (предпочтительно одним из В7Н6#12, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16 или В7Н6#23, как определено последовательностями CDR и/или VH/VL, как представлено в Таблице 1) и вторая антигенсвязывающая единица состоит из второго одноцепочечного Fab, специфичного в отношении CD3 (например, CD3#1 как определено последовательностями CDR и/или VH/VL как представлено в Таблице 1).

Линкерная последовательность белков, связывающих В7Н6/CD3 (например, В7Н6/CD3 scFabs, описанных выше) может быть природной последовательностью или не встречающейся в природе последовательностью. При использовании в терапевтических целях линкер предпочтительно не является иммуногенным для субъекта, которому вводят связывающий белок в соответствии с изобретением. Предпочтительно линкер содержит от 26 до 42 аминокислот, например, от 30 до 40 аминокислот. В другом аспекте линкер, используемый в белке в соответствии с настоящим изобретением, содержит от 30 до 40 аминокислот, например, от 36 до 39 аминокислот, например, 38 аминокислот.

Одна пригодная группа линкерных последовательностей представляет собой линкеры, полученные из шарнирной области антител с тяжелой цепью, как описано в WO1996/34103 и WO1994/04678. Другими примерами являются полиаланиновые линкерные последовательности, такие как Ala-Ala-Ala.

Другими предпочтительными примерами линкерных последовательностей являются линкеры Gly/Ser различной длины, такие как линкеры (glyxser)<sub>z</sub>, включая, например, (gly4ser)<sub>3</sub>, (gly4ser)<sub>5</sub>, (gly4ser)<sub>7</sub>, (gly3ser)<sub>3</sub>, (gly3ser)<sub>5</sub>, (gly3ser)<sub>7</sub>, (gly3ser2)<sub>3</sub>, (gly3ser2)<sub>5</sub> и (gly3ser2)<sub>7</sub> или линкер любой из SEQ ID NO: 250, 251, 252, 253, 254, 255 или 256, предпочтительно SEQ ID NO: 250.

В некоторых вариантах осуществления связывающих белков в соответствии с изобретением, домен VL первой антигенсвязывающей единицы (например, определенной легкой цепью CDR (LCCDR) или последовательностями VL любого из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7,

В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18 В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, В7Н6#24 как представлено в Таблице 1) ковалентно связан через первый линкер Gly/Ser (например, линкер Gly/Ser любой из от 26 до 42 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, или от 36 до 39 аминокислот, предпочтительно 38 аминокислот) с доменом VH первой антигенсвязывающей единицы (например, определенной тяжелой цепью CDR (HCCDR) или последовательностями VH любой из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18 В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, В7Н6#24 как представлено в Таблице 1); и домен VL второй антигенсвязывающей единицы (например, определенной легкой цепью CDR (LCCDR) или последовательностями VL любой из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6 как представлено в Таблице 1) ковалентно связан через второй линкер Gly/Ser (например, линкер Gly/Ser любой из от 26 до 42 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, или от 36 до 39 аминокислот, предпочтительно 38 аминокислот) с доменом VH второй антигенсвязывающей единицы (например, определенной тяжелой цепью CDR (HCCDR) или последовательностями VH любого из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6, как представлено в Таблице 1). Более предпочтительно первый и второй линкер являются одинаковыми. Еще более предпочтительно каждый из первого и второго линкеров содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:250.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающих белков в соответствии с изобретением, первая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с В7Н6, содержит от N- к С-концу i) домен VL (например, определенной легкой цепью CDR (LCCDR) или последовательностями VL любой из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18 В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, В7Н6#24 как представлено в Таблице 1), ii) первый домен CL, iii) через первый линкер Gly/Ser (например, линкер Gly/Ser любой из от 26 до 42 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, или от 36

до 39 аминокислот, предпочтительно 38 аминокислот), iv) домен VH (например, определенной тяжелой цепью CDR (HCCDR) или последовательностями VH любого из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18 В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, В7Н6#24 как представлено в Таблице 1), и v) первый домен СН1 и/или вторая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с CD3 содержит от N- к С-концу i) домен VL (например, определенной легкой цепью CDR (LCCDR) или последовательностями VL любого из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6 как представлено в Таблице 1), ii) второй домен CL, iii) второй линкер Gly/Ser (например, линкер Gly/Ser любой из от 26 до 42 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, или от 36 до 39 аминокислот, предпочтительно 38 аминокислот), iv) домен VH второй антигенсвязывающей единицы (например, определенной тяжелой цепью CDR (HCCDR) или последовательностями VH любого из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6, как представлено в Таблице 1) и v) второй домен СН1. Предпочтительно, i) - v) каждый связан прямой ковалентной связью в порядке i) - v) от N- к С-концу антигенсвязывающей единицы (каждая антигенсвязывающая единица, таким образом, имеет структуру scFab). Более предпочтительно первый и второй линкер являются одинаковыми. Еще более предпочтительно каждый из первого и второго линкеров содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:250.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, специфичную для В7Н6 и содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:198 SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:201, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:203, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215 и SEQ ID NO:216 и второй одноцепочечный Fab, образующий вторую антигенсвязывающую

единицу, специфичную для CD3 и содержащую последовательность SEQ ID NO:305.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, специфичную для B7H6 и содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215 и SEQ ID NO:216 и второй одноцепочечный Fab, образующий вторую антигенсвязывающую единицу, специфичную для CD3 и содержащую последовательность SEQ ID NO:305.

В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, специфичную для B7H6 и содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215 и SEQ ID NO:216 и второй одноцепочечный Fab, образующий вторую антигенсвязывающую единицу, специфичную для CD3 и содержащую последовательность SEQ ID NO:305.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первый одноцепочечный Fab, содержащий последовательность SEQ ID NO:204 и второй одноцепочечный Fab, содержащий последовательность SEQ ID NO:305, необязательно каждый одноцепочечный Fab дополнительно связан с доменом Fc и, таким образом, образует первую полипептидную цепь («цепь B7H6») и вторую полипептидную цепь («цепь CD3»). В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первый одноцепочечный Fab, содержащий последовательность SEQ ID NO:206 и второй одноцепочечный Fab, содержащий последовательность SEQ ID NO:305, необязательно каждый одноцепочечный Fab дополнительно связан с доменом Fc и, таким образом, образует первую полипептидную цепь (цепь B7H6) и вторую

полипептидную цепь (цепь CD3). В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первый одноцепочечный Fab, содержащий последовательность SEQ ID NO:207 и второй одноцепочечный Fab, содержащий последовательность SEQ ID NO:305, 5 необязательно каждый одноцепочечный Fab дополнительно связан с доменом Fc и, таким образом, образует первую полипептидную цепь (цепь В7Н6) и вторую полипептидную цепь (цепь CD3). В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первый одноцепочечный Fab, содержащий последовательность SEQ ID NO:208 и 10 второй одноцепочечный Fab, содержащий последовательность SEQ ID NO:305, необязательно каждый одноцепочечный Fab дополнительно связан с доменом Fc и, таким образом, образует первую полипептидную цепь (цепь В7Н6) и вторую полипептидную цепь (цепь CD3). В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит 15 первый одноцепочечный Fab, содержащий последовательность SEQ ID NO:215 и второй одноцепочечный Fab, содержащий последовательность SEQ ID NO:305, необязательно каждый одноцепочечный Fab дополнительно связан с доменом Fc и, таким образом, образует первую полипептидную цепь (цепь В7Н6) и вторую полипептидную цепь (цепь CD3).

20 В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая единица (например, любая из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18 В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23 или В7Н6#24 как определено последовательностями CDR 25 и/или VH/VL, представленными в Таблице 1) и/или вторая антигенсвязывающая единица (например, любая из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6, как определено последовательностями CDR и/или VH/VL, представленными в Таблице 1) содержит домен VL, ковалентно связанный (предпочтительно непосредственно связанный) с доменом CL, а домен VH связан с доменом CH1 30 (вместе образуя фрагмент Fab), и указанный домен CH1 дополнительно ковалентно связан (например, непосредственно связан) с доменом Fc, тем самым образуя плечо обычной молекулы антитела Y-образной формы с одной легкой и одной тяжелой цепью. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая

антигенсвязывающая единица, каждая образуют фрагмент Fab, т.е. первый и второй фрагмент Fab, каждый из которых ковалентно связан (предпочтительно непосредственно связан) с первым и вторым доменом Fc, соответственно, тем самым образуя обычную гетеротетрамерную биспецифическую и бивалентную (моновалентную для В7Н6 и CD3, соответственно) молекулу антитела.

В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую антигенсвязывающую единицу, содержащую первый одноцепочечный Fab, специфически связывающийся с В7Н6, т.е. легкую цепь антитела (VL-CL), ковалентно связанную с доменами VH-CH1 тяжелой цепи (домен VL и VH любой из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18 В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, или В7Н6#24 как определено последовательностями CDR и/или VH/VL, представленными в Таблице 1) через пептидный линкер (например, линкер Gly/Ser любой из от 26 до 42 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, или от 36 до 39 аминокислот, предпочтительно 38 аминокислот, еще более предпочтительно линкер SEQ ID NO:250), первая антигенсвязывающая единица которого ковалентно связана (например, непосредственно связана) с первым доменом Fc и (ii) вторая антигенсвязывающая единица, содержащая второй одноцепочечный Fab, специфически связывающийся с CD3, т.е. легкая цепь антитела (VL-CL) ковалентно связана с доменами VH-CH1 тяжелой цепи (домен VL и VH любой из CD3#1 CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5, CD3#6, как определено соответствующей CDR или последовательностями VH/VL, представленными в Таблице 1), при этом вторая антигенсвязывающая единица ковалентно связана (например, непосредственно связана) со вторым доменом Fc. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую (а) первую антигенсвязывающую единицу, специфичную для В7Н6, причем указанная первая антигенсвязывающая единица содержит первый одноцепочечный Fab, специфичный для В7Н6 (предпочтительно один из В7Н6#12, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16 или В7Н6#23, как определено посредством CDR и или последовательностями VH/VL, как представлено в

Таблице 1) и (б) первый домен Fc (эта первая полипептидная цепь в настоящей заявке называется также как «цепь В7Н6») и (ii) вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, содержащую (а) вторую антигенсвязывающую единицу, содержащую второй одноцепочечный Fab, специфичный для CD3

5 (предпочтительно CD3#1, как определено посредством CDR и/или последовательностями VL/VH, представленными в Таблице 1) и (б) второй домен Fc (эта вторая полипептидная цепь также называется в настоящей заявке как «цепь CD3»). Соответственно, используемый в настоящей заявке термин «полипептидная цепь» включает в себя по меньшей мере домен scFab и Fc. В

10 некоторых вариантах осуществления первый и второй домен Fc являются одними и теми же. В предпочтительных вариантах осуществления первый и второй домены Fc различаются. Полученные в результате связывающие белки в соответствии с изобретением содержат две разные полипептидные цепи, несущие полный Fc и имеющие два независимых участка связывания, первую

15 антигенсвязывающую единицу, образованную первым scFab, специфичным для В7Н6, и вторую связывающую единицу, образованную вторым scFab, специфичным для CD3.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит две разные полипептидные цепи, каждая

20 из которых содержит антигенсвязывающую единицу, образованную посредством scFab, с различной специфичностью, каждая из которых ковалентно связана с доменом Fc, причем полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, или через дисульфидные связи, или возможно через пептидный линкер. В

25 предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением представляет собой биспецифический двухвалентный (моновалентный для В7Н6 и CD3, соответственно) гетеродимерный белок, содержащий две полипептидные цепи, одна полипептидная цепь (первая полипептидная цепь или цепь В7Н6) содержит антигенсвязывающую единицу, образованную посредством scFab, специфически связывающимся с В7Н6

30 (например, любой из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18 В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23, или В7Н6#24 как определено последовательностями CDR и/или

VH/VL, представленными в Таблице 1) и домен Fc (предпочтительно домен Fc SEQ ID NO:242) и другую полипептидную цепь (вторую полипептидную цепь или цепь CD3), содержащую антигенсвязывающую единицу, образованную посредством scFab, специфически связывающимся с CD3 (например, любой из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 или CD3#6) и домен Fc (предпочтительно домен Fc SEQ ID NO:243). В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая единица состоит из первого одноцепочечного Fab, а вторая антигенсвязывающая единица состоит из второго одноцепочечного Fab. В некоторых вариантах осуществления связывающего белка первая полипептидная цепь, специфичная для B7H6 (цепь B7H6) включает в себя: а) первую антигенсвязывающую единицу, состоящую из scFab (предпочтительно одну из B7H6#12, B7H6#14, B7H6#15, B7H6#16 или B7H6#23, как определено последовательностями CDR, VH/VL и/или scFab, как представлено в Таблице 1) и б) первый домен Fc, а вторая полипептидная цепь, специфичная для CD3 (цепь CD3) включает в себя а) вторую антигенсвязывающую единицу, состоящую из scFab (предпочтительно CD3#1, как определено последовательностями CDR, VH/VL и/или scFab, как представлено в Таблице 1) и б) второй Fc домен. Предпочтительно С-конец scFab связан с N-концом домена Fc посредством прямой ковалентной связи. Предпочтительно первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом посредством дисульфидных связей и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1), схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

В контексте настоящего изобретения домен Fc получают, например, из тяжелой цепи IgG, например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> или IgG<sub>4</sub>. Например, домен Fc в соответствии с настоящим изобретением представляет собой домен Fc тяжелой цепи IgG<sub>1</sub> или IgG<sub>4</sub> и содержит шарнирную область и два константных домена (C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>). Примеры доменов Fc (включая шарнирную область) показаны в SEQ ID NOs:241 и 244.

Нумерация аминокислот в аминокислотных цепях белка в соответствии с настоящим изобретением приведена в настоящей заявке в соответствии с системой нумерации Eu (Edelman et al, PNAS USA 1969 май, 63(1):78-85;, Cunningham и соавт. PNAS USA 1969, Nov, 64(3):997-1003), если не указано иное. Это означает, что указанные номера аминокислот соответствуют

положениям в тяжелой цепи соответствующего подтипа (например, IgG<sub>1</sub> или IgG<sub>4</sub>), в соответствии с системой нумерации Eu, если не указано иное.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого домена Fc и второго домена Fc в белке в соответствии с настоящим изобретением содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают образование гомодимеров первой или второй полипептидных цепей вместо гетеродимеров первой и второй полипептидной цепи. Благодаря этим изменениям в одном из доменов Fc образуется «ответвление» за счет замены одной или нескольких небольших боковых цепей аминокислот на границе одной из тяжелых цепей более крупными боковыми цепями (например, тирозин или триптофан). Компенсационные «полости» идентичного или сходного размера создаются на поверхности раздела другого домена Fc путем замены больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (например, аланин или треонин (например, аланин или треонин)). Это обеспечивает механизм повышения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры, в частности гомодимеры домена Fc с «ответвлением» (см., например, Ridgway и соавт. *Protein Eng*, 1996. 9(7): сс. 617-21; Atwell et al, *JMB*, 1997, 270, 26-35). В некоторых вариантах осуществления такими аминокислотными заменами являются тирозин (Y) в положении 366 [T366Y] первого домена Fc и треонин (T) в положении 407 [Y407T] второго домена Fc. В некоторых вариантах осуществления первый домен Fc содержит серин (S) в положении 366 [T366S], а второй домен Fc содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V]. В предпочтительных вариантах осуществления первый домен Fc содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], а второй домен Fc содержит серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V]. Например, положение 366 домена Fc в соответствии с нумерацией Eu, соответствующее положению аминокислоты 146 в последовательности Fc IgG1 человека SEQ ID NO:241, заменено с T в положении 146 в SEQ ID NO:241 на W в положении 146 в SEQ ID NO:242; и положения 366, 368 и 407 согласно нумерации Eu, соответствующие положениям аминокислот 146, 148 и 187, соответственно, в SEQ ID NO:241, заменены с T, L и Y в этих положениях в SEQ ID NO:241 на S, A и V в этих

положениях в SEQ ID NO:243. В любом из этих вариантов осуществления замены аминокислот, описанные для первого домена Fc, могут быть расположены во втором домене Fc, а соответствующие замены аминокислот для второго домена Fc могут быть расположены в первом домене Fc. Другими  
5 словами, в этих вариантах осуществления термины «первый» и «второй» могут быть поменяны местами. В некоторых вариантах осуществления такой домен Fc представляет собой домен Fc, полученный из тяжелой цепи IgG<sub>1</sub> или IgG<sub>4</sub>.

В некоторых вариантах осуществления первый домен Fc содержит цистеин (C) в положении 354 [S354C] в добавок к триптофану (W) в положении 366  
10 [T366W], а второй домен Fc содержит цистеин (C) в положении 349 [Y349C] в добавок к серину (S) в положении 366 [T366S], аланину (A) в положении 368 [L368A] и валину (V) в положении 407 [Y407V]. В одном аспекте такой домен Fc представляет собой домен Fc, полученный из тяжелой цепи IgG<sub>4</sub>.

В некоторых вариантах осуществления первый домен Fc или второй домен  
15 Fc в связывающем белке в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают связывание домена Fc с белком A. В некоторых вариантах осуществления такие аминокислотные замены представляют собой аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F] одного из  
20 доменов Fc. Обе замены происходят из последовательности IgG3 человека (IgG3 не связывается с белком A). Эти две мутации расположены в домене СН3 и включены в один из доменов Fc для снижения связывания с белком A (см., например, Jendeberg и соавт. J Immunol Methods, 1997. 201(1): p. 25-34). Эти две замены облегчают удаление гомодимеров тяжелых цепей, содержащих эти  
25 замены, во время очистки белка.

В некоторых вариантах осуществления в связывающем белке в соответствии с настоящим изобретением, домен Fc, который содержит треонин (T) в положении 407 [Y407T], дополнительно содержит аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F]. В этом случае другая  
30 тяжелая цепь содержит тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], но не включает две замены в положениях 435 и 436. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления в белке в соответствии с настоящим изобретением, домен Fc, который содержит серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении

368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V], дополнительно содержит аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F]. В этом случае другой домен Fc содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], но не включает две замены в положениях 435 и 436. Таким образом, домен Fc, содержащий аминокислотную замену, приводящую к «полости» как описано выше, также включает аминокислотные замены, которые уменьшают связывание с белком А. Гомодимеры, содержащие этот домен Fc, удаляются за счет снижения связывания с белком А. Продуцирование гомодимеров другого домена Fc, который содержит «ответвление», снижается наличием «ответвления».

В некоторых вариантах осуществления, домен Fc белка в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно содержать или не содержать мутации YTE (M252Y/S254T/T256E, нумерация Eu (Dall'Acqua и соавт. J. Biol. Chem. 2006, 281(33):23514-24). Было показано, что эти мутации улучшают фармакокинетические свойства доменов Fc за счет предпочтительного повышения аффинности связывания с неонатальным рецептором FcRn при pH 6,0.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй домен Fc в соответствии с настоящим изобретением, полученный из IgG1, также включает мутации «КО» (L234A, L235A) (Xu et al, Cellular Immunology 2000 Feb 25, 200(1):16-26). В еще одном аспекте первый и/или второй домен Fc в соответствии с настоящим изобретением, полученный из IgG4, также включает шарнирную мутацию Pro (S228P) (Angal et al, Molecular Immunology 1993, 30(1):105-108; Labrijn и соавт., Nature Biotechnology 2009, 27:767-771).

В предпочтительных вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением первый домен Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:242, а второй домен Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:243.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения связывающий белок содержит: i) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:217 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#1/CD3#1), или ii) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность





NO:240 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#24/CD3#1). Предпочтительно первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1), схожую с  
5 обычной молекулой антитела Y-образной формы.

В предпочтительных вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность из группы, состоящей из любой из SEQ ID NOs:217, 218, 219, 220, 221, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 240, а вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную  
10 последовательность SEQ ID NO:311. Еще более предпочтительно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 240, а вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311, первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или  
15 несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1) схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для B7H6, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228 и вторую полипептидную  
20 цепь, специфичную для CD3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для B7H6, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:230 и вторую полипептидную  
25 цепь, специфичную для CD3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для B7H6, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:231 и вторую полипептидную  
30 цепь, специфичную для CD3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для B7H6, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:232 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311.

5 В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для В7Н6, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:239 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311.

10 Для всех описанных в настоящей заявке вариантов осуществления следует понимать, что использование термина «содержащий» подразумевает также включение варианта осуществления, в котором соответствующий белок, молекула, антигенсвязывающая единица или полипептидная цепь «состоит из» аминокислотной последовательности, как указано.

15 В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для В7Н6, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:228 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:311. Предпочтительно, первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1) схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

20 В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для В7Н6, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:230 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:311. Предпочтительно, первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1) схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

30 В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для В7Н6, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:231 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, состоящую из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:311. Предпочтительно, первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1) схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

5 В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для В7Н6, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:232 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:311. Предпочтительно, первая и вторая  
10 полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1) схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для В7Н6, состоящую из  
15 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:239 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:311. Предпочтительно, первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1) схожую с обычной  
20 молекулой антитела Y-образной формы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к связывающему белку, содержащему первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6 ( цепь В7Н6) и вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3 (цепь CD3), причем первая полипептидная цепь,  
25 специфически связывающаяся с В7Н6 содержит первую легкую цепь, ковалентно связанную (предпочтительно непосредственно связанную) с первым линкером, который сам является ковалентно связанным (например, непосредственно связанным) с первой тяжелой цепью, и причем вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3, содержит вторую  
30 легкую цепь, ковалентно связанную (предпочтительно непосредственно связанный) со вторым линкером, который сам является ковалентно связанным (например, непосредственно связанным) со второй тяжелой цепью.

Все определения и предпочтительные варианты осуществления, представленные в настоящей заявке выше в отношении связывающего белка в соответствии с изобретением, имеющего конкретно указанные антигенсвязывающие единицы, применимы с соответствующими изменениями также к этим связывающим белкам, предлагаемым в изобретении, содержащим первую и вторую полипептидную цепь, если в данной заявке не указано иное.

В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь (также упоминаемая в настоящей заявке как цепь В7Н6), начиная с ее N-конца, содержит первый вариабельный домен легкой цепи, специфически связывающийся с В7Н6, первый константный домен легкой цепи, первый линкер, первый вариабельный домен тяжелой цепи, специфичный для В7Н6, и первую константную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления вторая полипептидная цепь (также упоминаемая в настоящей заявке как цепь CD3), начинающаяся с ее N-конца, содержит второй вариабельный домен легкой цепи, специфически связывающийся с CD3, второй константный домен легкой цепи, второй линкер, второй вариабельный домен тяжелой цепи, специфичный для CD3 и второй константный домен тяжелой цепи.

Полученные белки несут полный Fc, и больше, чем IgG (из-за наличия линкера между легкой цепью и тяжелой цепью) и имеют два независимых участка связывания (например, каждый участок связывания является моновалентным для соответствующего антигена), первый участок связывания для В7Н6 и второй участок связывания для CD3. Предпочтительно первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями. Таким образом, белки в соответствии с изобретением представляют собой антителоподобные структуры, имеющие Y-образную структуру обычного полноразмерного антитела (см. Фигуру 1), включающие две полипептидные цепи, каждая из которых содержит домен scFab и Fc. В предпочтительных вариантах осуществления белки в соответствии с изобретением содержат (i) первую полипептидную цепь, специфичную для В7Н6 (цепь В7Н6), состоящую из первого scFab, специфичного для В7Н6 и первого домена Fc и (ii) вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3 (цепь CD3), состоящую из второго одноцепочечного Fab, специфичного для CD3, и второго домена Fc.

Предпочтительно первый scFab связан с первым доменом Fc через прямую ковалентную связь, а второй scFab связан со вторым доменом Fc через прямую ковалентную связь. Этот биспецифический формат значительно снижает гетерогенность после экспрессии и очистки (например, за счет предотвращения  
5 неправильного спаривания переменных доменов легкой и тяжелой цепей с различной специфичностью связывания), сохраняя при этом функциональные свойства связывающих фрагментов в структуре с меньшей вероятностью возникновения нежелательных иммуногенных реакций. Это также обеспечивает хорошую экспрессию гетеродимерных белков, например, в клетках  
10 млекопитающих.

В предпочтительных вариантах осуществления белка в соответствии с изобретением первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с B7H6 (цепь B7H6), содержит первый переменный домен легкой цепи и первый  
15 переменный домен тяжелой цепи, которые содержат последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из i) - xxiv):

i) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6  
20 (CDR3);

ii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID  
25 NO:12 (CDR3);

iii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID  
30 NO:18 (CDR3);

iv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные

последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID NO:24 (CDR3);

v) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID NO:30 (CDR3);

vi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID NO:36 (CDR3);

vii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) и SEQ ID NO:39 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:40 (CDR1), SEQ ID NO:41 (CDR2) и SEQ ID NO:42 (CDR3);

viii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) и SEQ ID NO:45 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:46 (CDR1), SEQ ID NO:47 (CDR2) и SEQ ID NO:48 (CDR3);

ix) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:49 (CDR1), SEQ ID NO:50 (CDR2) и SEQ ID NO:51 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:52 (CDR1), SEQ ID NO:53 (CDR2) и SEQ ID NO:54 (CDR3);

x) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) и SEQ ID NO:60 (CDR3);

xi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3);

xii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3);

xiii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:73 (CDR1), SEQ ID NO:74 (CDR2) и SEQ ID NO:75 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:76 (CDR1), SEQ ID NO:77 (CDR2) и SEQ ID NO:78 (CDR3);

xiv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3);

xv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3);

xvi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID NO:93 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3);

xvii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:97 (CDR1), SEQ ID NO:98 (CDR2) и SEQ ID NO:99 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные

последовательности SEQ ID NO:100 (CDR1), SEQ ID NO:101 (CDR2) и SEQ ID NO:102 (CDR3);

xviii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:103 (CDR1), SEQ ID NO:104 (CDR2) и SEQ ID NO:105 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:106 (CDR1), SEQ ID NO:107 (CDR2) и SEQ ID NO:108 (CDR3);

xix) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:109 (CDR1), SEQ ID NO:110 (CDR2) и SEQ ID NO:111 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:112 (CDR1), SEQ ID NO:113 (CDR2) и SEQ ID NO:114 (CDR3);

xx) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:115 (CDR1), SEQ ID NO:116 (CDR2) и SEQ ID NO:117 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:118 (CDR1), SEQ ID NO:119 (CDR2) и SEQ ID NO:120 (CDR3);

xxi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:121 (CDR1), SEQ ID NO:122 (CDR2) и SEQ ID NO:123 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:124 (CDR1), SEQ ID NO:125 (CDR2) и SEQ ID NO:126 (CDR3);

xxii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:127 (CDR1), SEQ ID NO:128 (CDR2) и SEQ ID NO:129 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:130 (CDR1), SEQ ID NO:131 (CDR2) и SEQ ID NO:132 (CDR3);

xxiii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3); и

xxiv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3).

Соответствующие переменные домены легкой/тяжелой цепи, определяемые этими последовательностями CDR, называются В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23 и В7Н6#24, соответственно.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся CD3 (цепь CD3), содержит второй переменный домен легкой цепи и второй переменный домен тяжелой цепи, которые содержат последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из:

i) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3);

ii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:263 (CDR1), SEQ ID NO:264 (CDR2) и SEQ ID NO:265 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:266 (CDR1), SEQ ID NO:267 (CDR2) и SEQ ID NO:268 (CDR3);

iii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:269 (CDR1), SEQ ID NO:270 (CDR2) и SEQ ID NO:271 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:272 (CDR1), SEQ ID NO:273 (CDR2) и SEQ ID NO:274 (CDR3);

iv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:275 (CDR1), SEQ ID NO:276 (CDR2) и SEQ ID NO:277 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные

последовательности SEQ ID NO:278 (CDR1), SEQ ID NO:279 (CDR2) и SEQ ID NO:280 (CDR3);

v) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:281 (CDR1), SEQ ID NO:282 (CDR2) и SEQ ID NO:283 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:284 (CDR1), SEQ ID NO:285 (CDR2) и SEQ ID NO:286 (CDR3); и

vi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:287 (CDR1), SEQ ID NO:288 (CDR2) и SEQ ID NO:289 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:290 (CDR1), SEQ ID NO:291 (CDR2) и SEQ ID NO:292 (CDR3).

Соответствующие переменные домены легкой/тяжелой цепи, определяемые этими последовательностями CDR, называются CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 и CD3#6, соответственно.

Предпочтительно последовательности CDR легкой цепи и тяжелой цепи выбирают из группы, состоящей из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23 и В7Н6#24, как определено выше.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6 (цепь В7Н6), содержащую первый переменный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и первый переменный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3); и (ii) вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3, содержащую второй переменный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и второй переменный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3).

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6 (цепь В7Н6), содержащую первый переменный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и первый переменный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3); и (ii) вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3, содержащую второй переменный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и второй переменный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3).

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6, содержащую первый переменный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и первый переменный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3); и (ii) вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3, содержащую второй переменный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и второй переменный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3).

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6, содержащую первый переменный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID

NO:93 (CDR3) и первый вариабельный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3); и (ii) вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3, содержащую второй вариабельный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и второй вариабельный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3).

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с B7H6, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3) и первый вариабельный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3); и (ii) вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3, содержащую второй вариабельный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и второй вариабельный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3).

В предпочтительных вариантах осуществления белка в соответствии с изобретением указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с B7H6 (цепь B7H6), содержит вариабельный домен легкой цепи (первый вариабельный домен легкой цепи) и вариабельный домен тяжелой цепи (первый вариабельный домен тяжелой цепи), выбранный из группы, состоящей из i) - xiv):

i) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:146 (B7H6#1);





xxiv) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:191 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:192 (B7H6#24).

Предпочтительно последовательности вариабельных доменов легкой цепи и тяжелой цепи выбирают из группы, состоящей из B7H6#1, B7H6#2, B7H6#, B7H6#4, B7H6#5, B7H6#12, B7H6#13, B7H6#14, B7H6#15, B7H6#16, B7H6#17, B7H6#18, B7H6#19, B7H6#20, B7H6#21, B7H6#22, B7H6#23 и B7H6#24, как определено выше.

В предпочтительных вариантах осуществления белка в соответствии с изобретением указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3 (цепь CD3), содержит вариабельный домен легкой цепи (второй вариабельный домен легкой цепи) и вариабельный домен тяжелой цепи (второй вариабельный домен тяжелой цепи), выбранный из группы, состоящей из:

i) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294 (CD3#1);

ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:295 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:296 (CD3#2);

iii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:297 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:298 (CD3#3)

iv) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:299 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:300 (CD3#4)

v) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:301 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:302 (CD3#5)

vi) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:303 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:304 (CD3#6).

В некоторых вариантах осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую и вторую полипептидную цепь, содержащие последовательности CDR и/или VH и VL переменных доменов легкой/тяжелой цепи, выбранных из перечня, включающего в себя В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#6/CD3#1, В7Н6#7/CD3#1, В7Н6#8/CD3#1, В7Н6#9/CD3#1, В7Н6#10/CD3#1, В7Н6#11/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1, в предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит первую и вторую полипептидную цепь, содержащие последовательности CDR и/или VH и VL переменных доменов легкой/тяжелой цепи, выбранных из перечня, включающего в себя В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1. Еще более предпочтительно первая полипептидная цепь содержит домен Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:242, а указанная вторая полипептидная цепь содержит домен Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:243.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6 (цепь В7Н6), содержащую переменный домен легкой цепи SEQ ID NO:167 и переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:168; и (ii) вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3 (цепь CD3), содержащую переменный домен легкой цепи SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:294.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6 (цепь В7Н6), содержащую переменный домен легкой цепи SEQ ID NO:171 и переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:172; и (ii) вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3 (цепь CD3), содержащую переменный домен легкой цепи SEQ ID NO:293 а переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:294.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6 (цепь В7Н6), содержащую вариabельный домен легкой цепи SEQ ID NO:173 и вариabельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:174; и (ii) вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3 (цепь CD3), содержащую вариabельный домен легкой цепи SEQ ID NO:293 и вариabельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:294.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6 (цепь В7Н6), содержащую вариabельный домен легкой цепи SEQ ID NO:175 и вариabельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:176; и (ii) вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3 (цепь CD3), содержащую вариabельный домен легкой цепи SEQ ID NO:293 и вариabельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:294.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок в соответствии с изобретением содержит (i) первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6 (цепь В7Н6), содержащую вариabельный домен легкой цепи SEQ ID NO:189 и вариabельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:190; и (ii) вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3 (цепь CD3), содержащую вариabельный домен легкой цепи SEQ ID NO:293 и вариabельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:294.

В предпочтительных вариантах осуществления первая полипептидная цепь, специфичная для В7Н6, содержит одноцепочечный Fab с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:201, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:203, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215 или SEQ ID NO:216, а вторая полипептидная цепь, специфичная для CD3, содержит одноцепочечный Fab с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:305.

Предпочтительно первая полипептидная цепь содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы,

состоящей из SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215 и SEQ ID NO:216, более предпочтительно аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215 и SEQ ID NO:216, а вторая полипептидная цепь содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO.305.

В одном предпочтительном варианте осуществления первая полипептидная цепь, специфичная для В7Н6 (цепь В7Н6), содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:204, а вторая полипептидная цепь, специфичная для CD3 (цепь CD3), содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305.

В одном предпочтительном варианте осуществления первая полипептидная цепь, специфичная для В7Н6 (цепь В7Н6), содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:206, а вторая полипептидная цепь, специфичная для CD3 (цепь CD3), содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305.

В одном предпочтительном варианте осуществления первая полипептидная цепь, специфичная для В7Н6 (цепь В7Н6), содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:207, а вторая полипептидная цепь, специфичная для CD3 (цепь CD3), содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305.

В одном предпочтительном варианте осуществления первая полипептидная цепь, специфичная для В7Н6 (цепь В7Н6), содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:208, а вторая полипептидная цепь, специфичная для CD3 (цепь CD3), содержит

одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305.

В одном предпочтительном варианте осуществления первая полипептидная цепь, специфичная для B7H6 (цепь B7H6), содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:215, а вторая полипептидная цепь, специфичная для CD3 (цепь CD3), содержит одноцепочечный Fab, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305.

Также в отношении этого конкретного варианта осуществления, относящегося к scFab, подразумевается, что термин «содержащий» также включает «состоящий из» аминокислотной последовательности, как определено в настоящей заявке выше в более общих терминах.

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением первая и вторая полипептидная цепь содержит домен Fc, полученный из тяжелой цепи IgG, например, IgG1, IgG2 или IgG4. Например, домен Fc в соответствии с настоящим изобретением представляет собой домен Fc тяжелой цепи IgG1 или IgG4 и содержит шарнирную область и два константных домена (CH2 и CH3). Примеры доменов Fc IgG человека показаны в SEQ ID NO:241 и SEQ ID NO:244.

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением тяжелая цепь содержит одну или несколько аминокислотных замен. Например, такими заменами аминокислот являются тирозин (Y) в положении 366 [T366Y] первой тяжелой цепи и треонин (T) в положении 407 [Y407T] второй тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления первая тяжелая цепь содержит серин (S) в положении 366 [T366S], а вторая тяжелая цепь содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V]. В предпочтительных вариантах осуществления первая тяжелая цепь содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], а вторая тяжелая цепь содержит серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V]. Например, положение 366 домена Fc в соответствии с нумерацией Eu, соответствующее положению аминокислоты 146 в IgG1 человека Fc последовательности SEQ ID NO:241, заменено с T в положении 146 в SEQ ID

NO:241 на W в положении 146 в SEQ ID NO:242; и положения 366, 368 и 407 в соответствии с нумерацией Eu, соответствующие положениям аминокислот 146, 148 и 187, соответственно, в SEQ ID NO:241, заменены с T, L и Y в этих положениях в SEQ ID NO:241 на S, A и V в этих положениях в SEQ ID NO:243.

5 В любом из этих вариантов осуществления замены аминокислот, описанные для первой тяжелой цепи, могут быть расположены во второй тяжелой цепи, а соответствующие замены аминокислот для второй тяжелой цепи могут быть расположены в первой тяжелой цепи. Другими словами, в этих вариантах осуществления термины «первый» и «второй» могут быть поменяны местами. В  
10 некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь получена из тяжелой цепи IgG<sub>1</sub> или IgG<sub>4</sub>.

В некоторых вариантах осуществления первая тяжелая цепь или вторая тяжелая цепь в белке в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают  
15 связывание тяжелой цепи с белком А. В некоторых вариантах осуществления такие аминокислотные замены представляют собой аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F] одной из тяжелых цепей.

В некоторых вариантах осуществления в белке в соответствии с настоящим изобретением тяжелая цепь, которая содержит треонин (T) в положении 407  
20 [Y407T], дополнительно содержит аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F]. В этом случае другая тяжелая цепь содержит тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], но не включает две замены в положениях 435 и 436. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления в белке в соответствии с настоящим изобретением, тяжелая цепь, которая  
25 содержит серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V], дополнительно содержит аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F].

В этом случае другая тяжелая цепь содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], но не включает две замены в положениях 435 и 436. Таким  
30 образом, тяжелая цепь, содержащая замену аминокислоты, приводящую к образованию «полости», как описано выше, также содержит замены аминокислот, которые снижают связывание с белком А. Гомодимеры, содержащие эти тяжелые цепи, удаляются за счет уменьшения связывания с

белком А. Продукция гомодимеров другой тяжелой цепи, которая содержит «ответвление», снижается в присутствии «ответвления».

В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь белка в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно содержать или не содержать мутации YTE (M252Y/S254T/T256E, нумерация Eu (Dall'Acqua и соавт., J. Biol. Chem. 2006, 281(33):23514-24)). Было показано, что эти мутации улучшают фармакокинетические свойства тяжелой цепи за счет предпочтительного повышения аффинности связывания с неонатальным рецептором FcRn при pH 6,0.

В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая тяжелая цепь в соответствии с настоящим изобретением, полученная из IgG1, также включает мутации «КО» (L234A, L235A) (Xu et al, Cellular Immunology 2000 Feb 25, 200(1):16-26). В другом аспекте первая и/или вторая тяжелая цепь в соответствии с настоящим изобретением, полученная из IgG4, также включает шарнирную мутацию Pro (S228P) (Angal и соавт., Molecular Immunology 1993, 30(1):105-108; Labrijn и соавт., Nature Biotechnology 2009, 27:767-771).

В предпочтительных вариантах осуществления связывающего белка в соответствии с изобретением, первая полипептидная цепь содержит домен Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:242, а вторая полипептидная цепь содержит домен Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:243.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения связывающий белок содержит i) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:217 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#1/CD3#1), или ii) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:218 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#2/CD3#1), или iii) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:219 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#3/CD3#1), или iv) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:220 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную



последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#15/CD3#1), или xvi) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:232 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#16/CD3#1); или xvii) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:233 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#17/CD3#1); или xviii) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:234 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#18/CD3#1); или xix) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:235 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#19/CD3#1); или xx) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:236 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#20/CD3#1); или xxi) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:237 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#21/CD3#1); или xxii) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:238 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#22/CD3#1); или xxiii) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:239 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#23/CD3#1); или xxiv) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:240 и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311 (B7H6#24/CD3#1). Предпочтительно, первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антители (Фигура 1) схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для B7H6, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311. Предпочтительно, первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1) схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

В одном предпочтительном варианте осуществления связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для B7H6, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:230 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311. Предпочтительно, первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1) схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для B7H6, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:231 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311. Предпочтительно, первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1) схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, специфичную для B7H6, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:232 и вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311. Предпочтительно, первая и вторая полипептидные цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями и образуют структуру, подобную антителу (Фигура 1), схожую с обычной молекулой антитела Y-образной формы.

В другом аспекте белки в соответствии с изобретением содержат первую антигенсвязывающую единицу или полипептидную цепь, специфичную для B7H6 с аффинностью предпочтительно  $\leq 10$  нМ, более предпочтительно  $\leq 1$  нМ,

еще более  $\leq 0,1$  нМ, к В7Н6 человека и яванского макака. Аффинность можно измерить в анализе SPR (система BIAcore® SPR (GE Healthcare Life Sciences)) с использованием рекомбинантного белка В7Н6, как описано, например, в примерах или другими способами, хорошо известными специалисту в данной области техники. Белки содержат вторую антигенсвязывающую единицу или полипептидную цепь с аффинностью предпочтительно  $\leq 500$  нМ, более предпочтительно  $\leq 100$  нМ, еще более предпочтительно  $\leq 10$  нМ к комплексу CD3 $\epsilon$  $\gamma$  человека и яванского макака.

В еще одном аспекте связывающие белки В7Н6/CD3 в соответствии с изобретением, не связываются с В7Н6-отрицательными клетками и не вступают в перекрестную реакцию с В7Н1 (см., например, пример 10 и пример 4 соответственно).

В предпочтительных вариантах осуществления связывающие белки В7Н6/CD3 в соответствии с настоящим изобретением (например, любой из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1) не ингибируют активацию естественных клеток-киллеров.

Примечательно, что связывающие белки В7Н6/CD3 в соответствии с изобретением, которые не ингибируют активацию естественных клеток-киллеров *in vitro*, связываются с В7Н6 в котором сайты взаимодействия НКp30 были заменены аланином.

В7Н6 на клеточной поверхности связывается с НКp30 на клеточной поверхности клеток НК, что запускает НКp30-опосредованную активацию клеток НК, цитотоксичность НК-клеток и секрецию цитокинов (Brandt et al, J. Exp. Med. 2009, 206(7):1495-503). Эту ситуацию можно воспроизвести *in vitro* путем культивирования линий НК-клеток (например, НК92MI) или первичных клеток НК на чашках, покрытых рекомбинантным белком внеклеточного домена В7Н6, с последующим анализом активации маркеров активации, таких как CD25 или CD69, или секреции цитокинов НК-клетками. Эту настройку анализа использовали для оценки того, ингибируют ли наши белки, связывающие

В7Н6/CD3, взаимодействие В7Н6 и НКp30, приводящее к ингибированию секреции IFN $\gamma$  (Пример 11).

Используя рекомбинантные Ala-мутированные внеклеточные белки, в которых сайты взаимодействия НКp30 были заменены аланином, было видно, что существуют две группы связывающих белков: 1) было обнаружено, что связывающие белки, которые сильно связываются с В7Н6 дикого типа, но которые не связываются или только слабо связываются с рекомбинантным Ala-мутированным внеклеточным В7Н6 белки ингибируют зависимую от В7Н6 секрецию IFN $\gamma$  клетками НК *in vitro* («ингибиторы В7Н6-зависимой активации клеток НК») и 2) было обнаружено, что связывающие белки, которые сильно связываются с В7Н6 дикого типа и сохраняют способность связываться также с рекомбинантными Ala-мутированными внеклеточными белками В7Н6, не ингибируют зависимую от В7Н6 активацию НК-клеток и связанную с ними секрецию IFN $\gamma$  *in vitro* («неингибиторы В7Н6-зависимой активации клеток НК») (см. примеры 6 и 11, фигуры 4 и 9). Неожиданно связывающие белки в соответствии с изобретением, которые не являются ингибиторами В7Н6-зависимой активации клеток НК являются более эффективными в перенаправленном Т-клетками лизисе опухолевых клеток, экспрессирующих В7Н6 (см. пример 12, Фигуры 10 и 11). Не привязываясь к какой-либо теории, вполне вероятно, что неингибиторы В7Н6-зависимой активации клеток НК допускают взаимодействие В7Н6 НКp30, не влияя на естественную роль В7Н6 в опосредовании врожденного иммунитета.

В еще одном аспекте белки, связывающие В7Н6/CD3 в соответствии с настоящим изобретением, способны опосредовать перенаправленную Т-клетками цитотоксичность против опухолевых клеток независимо от активности клеток НК (как показано на модели ксенотрансплантата мыши, где клетки НК, см., Пример 19, Фигуры 20 и 23, а также в анализе лизиса клеток в отсутствие клеток НК, см. Пример 12, Фигуры 10 и 11).

Для измерения цитотоксичности, опосредованной связывающими белками В7Н6/CD3 в соответствии с настоящим изобретением, можно использовать различные способы. Например, цитотоксичность можно измерить, используя метод, описанный в примере 12. Эффекторные клетки могут представлять собой, например, стимулированные или нестимулированные (человека или яванского

макака) Т-клетки или их субпопуляции (например, CD4, CD8) или нестимулированные (человек или яванский макак) мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС). Клетки-мишени должны экспрессировать по меньшей мере внеклеточный домен (человека или яванского макака) В7Н6 и могут представлять собой клетки с эндогенной (природной) экспрессией В7Н6, такие как клеточные линии мелкоклеточной карциномы легкого человека SHP77, NCI-H82, альтернативно также рекомбинантные клетки, которые экспрессируют или полноразмерный В7Н6, или внеклеточный домен В7Н6. Отношение эффектора к клетке-мишени (Е:Т) обычно составляет около 10:1, но может варьироваться. Цитотоксическую активность связывающих молекул В7Н6/CD3 можно определить, например, в анализе высвобождения LDH после 48 или 72 часов инкубации. Модификации времени инкубации и показаний, используемых для определения цитотоксичности, возможны и известны специалисту в данной области. Системы считывания цитотоксичности могут включать анализы МТТ/MTS, анализы на основе АТФ, анализы на основе FACS, анализы на высвобождение 51-хрома, анализы на сульфородамин В (SRB), колориметрические анализы (WST), клоногенные анализы, технологию ECIS и биолюминесцентные анализы.

Цитотоксическую активность, опосредованную связывающими белками В7Н6/CD3 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно измеряют в анализе цитотоксичности на основе клеток. Цитотоксичность представлена значениями  $EC_{90}$ , измеренными в анализе цитотоксичности. Специалисту в данной области техники известно, что можно ожидать, что  $EC_{90}$  будет ниже при использовании очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток по сравнению с РВМС, специалист также знает, что  $EC_{90}$  может быть еще ниже при использовании стимулированных Т-клеток. Кроме того, можно ожидать, что значения  $EC_{90}$  будут ниже, когда клетки-мишени экспрессируют большое количество В7Н6 на клеточной поверхности по сравнению с клеткой, экспрессирующей небольшое количество молекул В7Н6 на клеточной поверхности.  $EC_{90}$  связывающего В7Н6/CD3 белка предпочтительно составляет  $\leq 10$  нМ, более предпочтительно  $\leq 5$  нМ и еще более предпочтительно  $\leq 1$  нМ.

Предпочтительно мультиспецифические связывающие белки в соответствии с изобретением не индуцируют/опосредуют лизис В7Н6-

негативных клеток. Термин «не индуцировать/опосредовать лизис» В7Н6-негативных клеток означает, что молекула, связывающая В7Н6/CD3, не индуцирует или опосредует лизис более чем на 30%, предпочтительно не более чем на 20%, более предпочтительно не более чем на 10% и в частности, не более 5% или В7Н6-негативных клеток, тогда как лизис В7Н6-положительной линии колоректальных клеток установлен на уровне 100%. Обычно это относится к концентрациям связывающего белка до 1000 нМ.

Кроме того, показано, что белки, связывающие В7Н6/CD3 в соответствии с изобретением достигают содержания мономера выше 95% в двухстадийном процессе очистки (см. пример 20), обладают благоприятными фармакокинетическими свойствами и хорошей технологичностью на последующих стадиях, и, как ожидается, также будут иметь хорошие характеристики биораспределения (см., например, Пример 18). Кроме того, белки в соответствии с настоящим изобретением имеют благоприятный профиль иммуногенности (см. пример 22) и обладают хорошей стабильностью *in vitro* и *in vivo* (см., например, примеры 21 и 18). Кроме того, белки, связывающие В7Н6/CD3 в соответствии с изобретением демонстрируют благоприятную эффективность в мышинной модели с гуманизированным ксенотрансплантатом *in vivo*. Белки, связывающие В7Н6/CD3, индуцировали сильную регрессию опухоли, начинающуюся уже после введения первой дозы белков, связывающих В7Н6/CD3 (см., например, Пример 19). Кроме того, связывающие В7Н6/CD3 белки в соответствии с изобретением индуцируют регрессию опухоли при очень низких дозах 0,05 мг/кг, вводимых один раз в неделю (q7d), что дополнительно подтверждает их терапевтическую применимость. В частности, связывающие В7Н6/CD3 белки в соответствии с изобретением индуцируют селективную пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток, дегрануляцию Т-клеток и секрецию цитокинов (см. примеры 16, 14, 15, 17, соответственно) только в присутствии В7Н6-положительных клеток-мишеней, а не в присутствии В7Н6-негативных клеток-мишеней, и дополнительно значительно увеличивают инфильтрацию Т-клеток в опухолевую ткань (см. Пример 24).

Другой аспект в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие первую и/или вторую антигенсвязывающую единицу (любую из антигенсвязывающих единиц В7Н6#1,

В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9,  
В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17,  
В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23 и В7Н6#24 и/или  
любую из антигенсвязывающих единиц CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 и  
5 CD3#6 как определено последовательностями CDR, VH/VL или scFab, как  
представлено в Таблице 1, соответственно) мультиспецифического  
связывающего белка в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах  
осуществления молекулы нуклеиновых кислот помимо этого, кодируют первый  
и/или второй домен Fc, как описано в настоящей заявке, первый и/или второй  
10 домен Fc, связанный с 3' концом молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей  
первую и/или вторую антигенсвязывающую единицу, соответственно. В  
некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует i)  
первую полипептидную цепь, содержащую первый одноцепочечный Fab,  
специфичный для В7Н6 (например, любой из В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4,  
15 В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12,  
В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20,  
В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23 и В7Н6#24) и первый домен Fc и/или ii) вторую  
цепь, содержащую второй одноцепочечный Fab, специфичный для CD3  
(например, любой из CD3#1, CD3#2, CD3#3, CD3#4, CD3#5 и CD3#6,  
20 предпочтительно CD3#1) и второй домен Fc.

Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную  
последовательность, кодирующую первый одноцепочечный Fab, специфичный  
для В7Н6 любой из SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID  
NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:200, SEQ  
25 ID NO:201, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:203, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205,  
SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:209, SEQ ID  
NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ  
ID NO:215 или SEQ ID NO:216 и/или второй одноцепочечный Fab SEQ ID  
NO:305. В предпочтительных вариантах осуществления молекула нуклеиновой  
30 кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый  
scFab, специфичный для В7Н6 любой из SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:206, SEQ  
ID NO:207, SEQ ID NO:208 или SEQ ID NO:215, и/или нуклеотидную

последовательность, кодирующую второй scFab, специфичный для CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305.

Еще один аспект изобретения относится к вектору экспрессии, содержащему молекулу ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый и/или второй антигенсвязывающий домен (например, первый и/или второй одноцепочечный Fab в соответствии с изобретением). Предпочтительно вектор экспрессии содержит, кроме того, молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулу ДНК, кодирующую первый и/или второй домен Fc, связанный с молекулой нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулой ДНК, кодирующей первый и/или второй антигенсвязывающий домен (например, первый и/или второй одноцепочечный Fab) соответственно. Таким образом, вектор экспрессии содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную цепь, содержащую первый одноцепочечный Fab, связанный с первым доменом Fc, и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную цепь, содержащую второй одноцепочечный Fab, связанный со вторым доменом Fc.

В предпочтительном варианте осуществления вектор экспрессии содержит молекулу ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую первую полипептидную цепь, специфичную для B7H6 и/или вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3 в соответствии с изобретением. В предпочтительном варианте осуществления вектор экспрессии содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую полипептидную цепь любой из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239 или SEQ ID NO: 240 и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую полипептидную цепь, содержащую SEQ ID NO:311.

В других предпочтительных вариантах осуществления вектор экспрессии содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую полипептидную цепь любой из SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231,

SEQ ID NO:232, и SEQ ID NO:239 и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую полипептидную цепь, содержащую SEQ ID NO:311.

В особенно предпочтительном варианте осуществления могут быть использованы два вектора экспрессии, один из них для экспрессии первой полипептидной цепи, специфичной для В7Н6, другой для экспрессии второй полипептидной цепи, специфичной для CD3, причем эти два вектора экспрессии могут быть затем оба трансфицированы в клетку-хозяина для экспрессии рекомбинантного белка.

Предпочтительно вектор экспрессии представляет собой вектор, содержащий указанную молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты, функционально связанные по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью, где такая регуляторная последовательность может представлять собой промоторную, энхансерную или терминаторную последовательность, и наиболее предпочтительно гетерологичный промотор, энхансер, или терминаторную последовательность.

В другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, имеющей вектор экспрессии, кодирующий первую полипептидную цепь, специфичную для В7Н6 в соответствии с изобретением и вектор экспрессии, кодирующий вторую полипептидную цепь, специфичную для CD3 изобретения.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом указанные клетки-хозяева представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. В другом варианте осуществления такими клетками-хозяевами являются бактериальные клетки. Другими пригодными клетками являются дрожжевые клетки или клетки других грибов.

Пригодные клетки млекопитающих включают в себя, например, клетки СНО, клетки ВНК, клетки HeLa, клетки COS и т.п. Однако также можно использовать клетки амфибий, клетки насекомых, клетки растений и любые другие клетки, используемые в данной области техники для экспрессии гетерологичных белков.

#### АНТИТЕЛА ПРОТИВ В7Н6

В другом аспекте изобретения обеспечивают молекулы антитела против В7Н6, содержащие:

- i) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3); или
- 5
- ii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID
- 10 NO:12 (CDR3); или
- iii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID
- 15 NO:18 (CDR3); или
- iv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID
- 20 NO:24 (CDR3); или
- v) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID
- 25 NO:30 (CDR3); или
- vi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID
- 30 NO:36 (CDR3); или
- vii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) и SEQ ID NO:39 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные

последовательности SEQ ID NO:40 (CDR1), SEQ ID NO:41 (CDR2) и SEQ ID NO:42 (CDR3); или

viii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) и SEQ ID NO:45 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:46 (CDR1), SEQ ID NO:47 (CDR2) и SEQ ID NO:48 (CDR3); или

ix) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:49 (CDR1), SEQ ID NO:50 (CDR2) и SEQ ID NO:51 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:52 (CDR1), SEQ ID NO:53 (CDR2) и SEQ ID NO:54 (CDR3); или

x) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) и SEQ ID NO:60 (CDR3); или

xi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3); или

xii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3); или

xiii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:73 (CDR1), SEQ ID NO:74 (CDR2) и SEQ ID NO:75 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:76 (CDR1), SEQ ID NO:77 (CDR2) и SEQ ID NO:78 (CDR3); или

xiv) содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3); или

xv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3); или

xvi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID NO:93 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3); или

xvii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:97 (CDR1), SEQ ID NO:98 (CDR2) и SEQ ID NO:99 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:100 (CDR1), SEQ ID NO:101 (CDR2) и SEQ ID NO:102 (CDR3); или

xviii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:103 (CDR1), SEQ ID NO:104 (CDR2) и SEQ ID NO:105 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:106 (CDR1), SEQ ID NO:107 (CDR2) и SEQ ID NO:108 (CDR3); или

xix) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:109 (CDR1), SEQ ID NO:110 (CDR2) и SEQ ID NO:111 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:112 (CDR1), SEQ ID NO:113 (CDR2) и SEQ ID NO:114 (CDR3); или

xx) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:115 (CDR1), SEQ ID NO:116 (CDR2) и SEQ ID NO:117 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные

последовательности SEQ ID NO:118 (CDR1), SEQ ID NO:119 (CDR2) и SEQ ID NO:120 (CDR3); или

xxi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:121 (CDR1), SEQ ID NO:122 (CDR2) и SEQ ID NO:123 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:124 (CDR1), SEQ ID NO:125 (CDR2) и SEQ ID NO:126 (CDR3); или

xxii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:127 (CDR1), SEQ ID NO:128 (CDR2) и SEQ ID NO:129 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:130 (CDR1), SEQ ID NO:131 (CDR2) и SEQ ID NO:132 (CDR3); или

xxiii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3); или

xxiv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3).

Антитела i) - xxiv) как указано выше, называются В7Н6#1, В7Н6#2, В7Н6#3, В7Н6#4, В7Н6#5, В7Н6#6, В7Н6#7, В7Н6#8, В7Н6#9, В7Н6#10, В7Н6#11, В7Н6#12, В7Н6#13, В7Н6#14, В7Н6#15, В7Н6#16, В7Н6#17, В7Н6#18, В7Н6#19, В7Н6#20, В7Н6#21, В7Н6#22, В7Н6#23 и В7Н6#24, соответственно. В настоящей заявке представлена таблица последовательностей, которая позволяет легко идентифицировать отдельные аминокислотные последовательности специфических антител в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления антитело против В7Н6 в соответствии с изобретением представляет собой химерную, гуманизованную человеческую или оптимизированную молекулу антитела. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела представляет собой

моноклональное антитело Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv или scFv. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела против В7Н6 в соответствии с изобретением содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из константных областей IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи молекулы антитела против В7Н6 в соответствии с изобретением представляет собой цепь каппа или лямбда.

В некоторых вариантах осуществления, антитело против В7Н6 изобретения имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85% идентичный с любой из SEQ ID NOs: 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190 и 192. Предпочтительно молекула антитела имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190 или 192.

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела против В7Н6 имеет переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85% идентичный с любой из SEQ ID NO: 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189 и 191. Предпочтительно молекула антитела имеет переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189 и 191.

Методы расчета идентичности аминокислотных последовательностей хорошо известны в данной области и дополнительно обсуждаются в настоящей заявке в разделе «Определения» описания.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела против В7Н6 имеет i) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145 (В7Н6#1), или ii) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147 (В7Н6#2);





В некоторых вариантах осуществления антитело против В7Н6 в соответствии с изобретением собой мышиное моноклональное антитело. В контексте данного изобретения мышиное моноклональное антитело включает антитело, в котором VH и VL получают путем иммунизации мышей

5    человеческим белком В7Н6, последующего отбора подходящих последовательностей VH и VL, связывающихся с определенной аффинностью с человеческим В7Н6, и последующего присоединения таких последовательностей VH и VL к константным доменам, которые получены от мыши (например, от мышинового IgG2a) рекомбинантными методами; и которые продуцируются

10   рекомбинантной экспрессией в клетках-хозяевах. Кроме того, изобретение охватывает химерные антитела, например, содержащие переменные и константные области разных видов. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела в соответствии с изобретением представляет собой химерное антитело, содержащее домены VH и VL, полученные от мыши, как описано

15   выше, и дополнительно содержащие константные домены, полученные от других видов, таких как человек, кролик, крыса, коза, осел.

В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит домены VH VL, полученные от мыши и дополнительно гуманизированные или оптимизированные по последовательности, как определено выше, и

20   дополнительно содержит константные домены, полученные от другого вида. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит домены VH и VL, полученные от трансгенного животного (например, мыши), содержащие последовательности IgG человека, таким образом, содержит последовательности VH и VL человека, и дополнительно содержит константные домены, полученные

25   от другого вида. В любом из вариантов осуществления химерных антител, как описано выше, константная область тяжелой цепи представляет собой область тяжелой цепи мыши, человека, кролика, крысы, козы или осла.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела против В7Н6 в соответствии с изобретением имеет константный домен, выбранный из группы,

30   состоящей из константных доменов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE. В предпочтительном варианте осуществления антитело против В7Н6 имеет константный домен IgG2a. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела против В7Н6 имеет константный домен легкой цепи, представляющий

собой каппа или лямбда, предпочтительно константный домен легкой цепи представляет собой константный домен легкой цепи каппа, предпочтительно содержащий последовательность SEQ ID NO:247.

Представленные в настоящей заявке специфичные к В7Н6 антитела можно использовать для мечения, локализации, идентификации или нацеливания на клетки, экспрессирующие В7Н6 (например, в анализах ELISA, анализах FACS, иммуногистологии или т.п.) путем присоединения красителя, лекарственного средства или другой молекулы со специфичностью связывания для другого антигена.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим переменный домен тяжелой цепи и/или переменный домен легкой цепи молекулы антитела против В7Н6 в соответствии с изобретением.

Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменный домен тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, или 192. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменный домен легкой цепи любой из SEQ из SEQ ID NO: 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189 или 191.

Другой аспект изобретения относится к вектору экспрессии, содержащему молекулу ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую переменный домен тяжелой цепи и/или переменный домен легкой цепи молекулы антитела против В7Н6 в соответствии с изобретением.

Предпочтительно вектор экспрессии содержит, кроме того, молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулу ДНК, кодирующую константные домены тяжелой цепи и/или константный домен легкой цепи, соответственно, связанные с молекулой нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулой ДНК, кодирующей переменный домен тяжелой цепи и/или переменный домен легкой цепи, соответственно.

В особо предпочтительном варианте осуществления можно использовать два вектора экспрессии, один из них для экспрессии тяжелой цепи, а другой -

для экспрессии легкой цепи, причем эти два вектора экспрессии затем оба могут быть трансфицированы в клетку-хозяина для экспрессии рекомбинантного белка.

Предпочтительно вектор экспрессии представляет собой вектор, содержащий указанную молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты, функционально связанные по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью, где такая регуляторная последовательность может представлять собой промоторную, энхансерную или терминаторную последовательность, и наиболее предпочтительно гетерологичный промотор, энхансер, или терминаторную последовательность.

В другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, имеющей вектор экспрессии, кодирующий тяжелую цепь молекулы антитела против В7Н6 по изобретению, и вектор экспрессии, кодирующий легкую цепь молекулы антитела против В7Н6 в соответствии с изобретением.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом указанные клетки-хозяева представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. В другом варианте осуществления такими клетками-хозяевами являются бактериальные клетки. Другими пригодными клетками являются дрожжевые клетки или клетки других грибов.

Подходящие клетки млекопитающих включают, например, клетки СНО, клетки ВНК, клетки HeLa, клетки COS и т.п. Однако также можно использовать клетки амфибий, клетки насекомых, клетки растений и любые другие клетки, используемые в данной области техники для экспрессии гетерологичных белков.

#### СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ

Изобретение дополнительно обеспечивает способы получения мультиспецифического связывающего белка в соответствии с изобретением, такие способы, как правило, включают следующие стадии:

- культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую связывающий белок в соответствии с изобретением в условиях, которые позволяют образование связывающего белка в соответствии с изобретением; и,

- выделение связывающего белка, экспрессируемого клетками-хозяевами, из культуры; и

- необязательно дальнейшая очистка, и/или модификация, и/или введение в состав связывающего белка в соответствии с изобретением.

Изобретение дополнительно обеспечивает способы получения антител против В7Н6 в соответствии с изобретением, такие способы, как правило, включают следующие стадии:

- культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу антитела в соответствии с изобретением, в условиях, которые позволяют образование молекулы антитела; и,

- выделение молекулы антитела, экспрессируемой клетками-хозяевами, из культуры; а также

- необязательно дальнейшая очистка, и/или модификация, и/или введение в состав молекулы антитела в соответствии с изобретением.

Нуклеиновая кислота в соответствии с изобретением может представлять собой, например, молекулу ДНК, содержащую кодирующие последовательности, а также регуляторные последовательности и необязательно природные или искусственные интроны, или может быть молекулой кДНК. Она может иметь свои исходные кодоны или может иметь оптимизированное использование кодонов, которое было специально адаптировано для экспрессии в предполагаемой клетке-хозяине или организме-хозяине. Согласно одному варианту осуществления изобретения нуклеиновая кислота в соответствии с изобретением находится в основном в выделенной форме, как определено выше.

Нуклеиновые кислоты в соответствии с изобретением могут быть приготовлены или получены способом, известным *per se* (например, с помощью автоматизированного синтеза ДНК и/или технологии рекомбинантной ДНК), на основании информации об аминокислотных последовательностях белков по изобретению, приведенной в настоящей заявке.

Нуклеиновая кислота в соответствии с изобретением обычно включается в вектор экспрессии, т.е. вектор, который может обеспечить экспрессию белка при трансфекции в подходящую клетку-хозяина или другую систему экспрессии.

Для получения связывающих белков или антител в соответствии с изобретением специалист в данной области техники может выбрать из

множества систем экспрессии, хорошо известных в данной области, например, рассмотренные у Kipriyanow and Le Gall, 2004.

Векторы экспрессии включают плазмиды, ретровирусы, космиды, эписомы, происходящие от EBV, и т.п. Вектор экспрессии и последовательности контроля экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином. Нуклеотидная последовательность, кодирующая первую антигенсвязывающую единицу (например, В7Н6-специфический одноцепочечный Fab или полноразмерная цепь В7Н6 связывающего белка в соответствии с изобретением), нуклеотидная последовательность, кодирующая вторую антигенсвязывающую единицу (например, CD3-специфичный одноцепочечный Fab или полноразмерная CD3 связывающего белка в соответствии с изобретением) связывающего белка В7Н6/CD3 может быть встроена в отдельные векторы. В некоторых вариантах осуществления обе последовательности ДНК встраиваются в один и тот же вектор экспрессии. Нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь антитела В7Н6, и нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь антитела В7Н6, могут быть вставлены в отдельные векторы. В некоторых вариантах осуществления обе последовательности ДНК встраиваются в один и тот же вектор экспрессии.

Подходящими векторами являются те, которые кодируют функционально полную последовательность СН (константной тяжелой) иммуноглобулина человека с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, чтобы любую антигенсвязывающую единицу, такую как последовательность одноцепочечного Fab или любой вариабельный домен тяжелой/легкой цепи можно было легко вставить и экспрессировать, как описано выше. Тяжелая цепь антитела может представлять собой, без ограничения, любой изотип IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) или другие иммуноглобулины, включая аллельные варианты.

Рекомбинантный вектор экспрессии может также кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции полноразмерной цепи CD3 или В7Н6 из клетки-хозяина или легкой/тяжелой цепи антитела против В7Н6. ДНК, кодирующая белковую цепь, может быть клонирована в вектор таким образом, чтобы сигнальный пептид был связан в рамке считывания с аминоконцом зрелой полноразмерной цепи ДНК. Сигнальный пептид может быть сигнальным

пептидом иммуноглобулина или гетерологичным пептидом из неиммуноглобулинового белка. Альтернативно, последовательность ДНК, кодирующая полноразмерные цепи белка по изобретению, может уже содержать последовательность сигнального пептида.

5           Помимо последовательностей ДНК, кодирующих цепь В7Н6/CD3, или последовательностей ДНК, кодирующих тяжелую/легкую цепь антитела В7Н6, рекомбинантные векторы экспрессии обычно несут регуляторные последовательности, необязательно гетерологичные регуляторные последовательности, включая промоторы, энхансеры, сигналы терминации и полиаденилирования и другие элементы контроля экспрессии, которые  
10           контролируют экспрессию белковых цепей в клетке-хозяине. Примерами промоторных последовательностей (представленных для экспрессии в клетках млекопитающих) являются промоторы и/или энхансеры, полученные из CMV (такие как промотор/энхансер CMV Simian Virus 40 (SV40)), аденовируса, (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)), полиомы и  
15           сильных промоторов млекопитающих, такие как промоторы нативного иммуноглобулина и актина. Примерами сигналов полиаденилирования являются BGH полиА, SV40 поздний или ранний полиА; в качестве альтернативы можно использовать 3'UTR генов иммуноглобулинов и т.д.

20           Рекомбинантные векторы экспрессии могут также нести последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективные маркерные гены. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полноразмерную цепь с первой антигенсвязывающей единицей (одноцепочечный домен Fab и Fc) или ее  
25           антигенсвязывающую часть и/или полноразмерную цепь со второй антигенсвязывающей единицей (одноцепочечный домен Fab и Fc) или ее антигенсвязывающую часть, и векторы, содержащие эти молекулы ДНК, могут быть введены в клетки-хозяева, например, бактериальные клетки или высшие эукариотические клетки, например, клеток млекопитающих в соответствии со  
30           способами трансфекции, хорошо известными в данной области, включая трансфекцию, опосредованную липосомами, трансфекцию, опосредованную поликатионами, слияние протопластов, микроинъекции, преципитацию фосфатом кальция, электропорацию или перенос вирусными векторами.

Предпочтительно молекулы ДНК, кодирующие цепи В7Н6 и CD3 белка в соответствии с изобретением присутствуют на двух векторах экспрессии, котрансфицированных в клетку-хозяина, предпочтительно в клетку млекопитающего.

5 Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NS0, SP2/0, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки карциномы человека (например, клетки Нер G2 и А-549), клетки 3Т3 или  
10 производные/потомства любой такой клеточной линии. Можно использовать другие клетки млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, линии клеток человека, мышей, крыс, обезьян и грызунов, или другие эукариотические клетки, включая, но не ограничиваясь ими, клетки дрожжей, насекомых и растений, или прокариотические клетки, такие как бактерии.

15 Белки в соответствии с изобретением получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения экспрессии белка в клетках-хозяевах. Молекулы белков предпочтительно выделяют из культуральной среды в виде секретлируемого полипептида или могут быть выделены из лизатов клеток-хозяев, если, например, они  
20 экспрессируются без секреторного сигнала. Необходимо очищать молекулы белков, используя стандартные способы очистки белков, используемые для рекомбинантных белков и белков клеток-хозяев, таким образом, чтобы получить по существу гомогенные препараты белка. Например, способы очистки  
25 современного уровня техники, применимые для получения молекул белка в соответствии с изобретением, включают в себя, в качестве первой стадии, удаление клеток и/или частиц клеточного дебриса из культуральной среды или лизата. Затем белок очищают от загрязняющих растворимых белков, полипептидов и нуклеиновых кислот, например, путем фракционирования на  
30 иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждения этанолом, обращенно-фазовой ВЭЖХ, хроматографии на сефадексе, хроматографии на диоксиде кремния или на катионообменной смоле. В качестве конечной стадии процесса получения молекулы белка, очищенную молекулу белка можно

высушить, например, подвергнуть лиофилизации, как описано ниже для терапевтического применения.

Настоящее изобретение относится к связывающим белкам, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными мишенями. В отношении настоящего изобретения связывающие молекулы получают из антител. Методы получения связывающих молекул включают, но не ограничиваются ими, рекомбинантную коэкспрессию двух цепей иммуноглобулина, обладающих различной специфичностью (см., Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, и Traunecker и соавт., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), и конструирование «выступ-во-впадину» (см., например, патент США № 5,731, 168; Atwell et al, *JMB*, 1997, 270, 26-35). Связывающие белки в соответствии с изобретением также могут быть получены путем конструирования эффектов электростатического управления для получения Fc-гетеродимерных молекул антитела (WO 2009/089004A1); перекрестного связывания двух или большего количества антител или фрагментов (см., например, патент США № 4,676,980, и Brennan и соавт., *Science*, 229: 81 (1985)); использования лейциновых застежек для получения биспецифических белков (см., например, Kostelny и соавт., *Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); использования технологии «диатело» для получения фрагментов биспецифических антител (см., например, Hollinger и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444- 6448 (1993)); и использования одноцепочечных димеров Fv (sFv) (см., например, Gruber и соавт., *Immunol.*, 152:5368 (1994)); и получение триспецифических антител, как описано, например, в Tutt и соавт. *Immunol.* 147: 60 (1991).

Композиции (например, мультиспецифические связывающие белки и антитела против В7Н6) и способы, раскрытые в настоящей заявке, охватывают полипептиды и нуклеиновые кислоты, имеющие указанные последовательности, или последовательности, практически идентичные или подобные им, например, последовательности по меньшей мере на 85%, 90%, 95% идентичные или выше с указанной последовательностью. В контексте аминокислотной последовательности термин «практически идентичный» используют в настоящей заявке для обозначения первой аминокислотной последовательности, которая содержит достаточное или минимальное количество аминокислотных остатков,

которые являются i) идентичными или ii) консервативными заменами выровненных аминокислотных остатков во второй аминокислотной последовательности, так что первая и вторая аминокислотные последовательности могут иметь общий структурный домен и/или общую функциональную активность. Например, аминокислотные последовательности, которые содержат общий структурный домен, имеют по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с эталонной последовательностью, например, последовательностью, представленной в настоящей заявке. В контексте нуклеотидной последовательности термин «по существу идентичный» используют в настоящей заявке для обозначения первой последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит достаточное или минимальное количество нуклеотидов, идентичных выровненным нуклеотидам во второй последовательности нуклеиновой кислоты, таким образом, что первая и вторые нуклеотидные последовательности кодируют полипептид, обладающий общей функциональной активностью, или кодируют общий структурный полипептидный домен или общей функциональной полипептидной активностью, например, нуклеотидные последовательности, имеющие по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с эталонной последовательностью.

Молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением включают в себя, но не ограничиваются ними, молекулы ДНК, кодирующие полипептидные последовательности, показанные в перечне последовательностей. Также настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые гибридизуются с молекулами ДНК, кодирующими полипептидные последовательности, показанные в перечне последовательностей в условиях связывания и промывки высокой жесткости, как определено в WO 2007/042309. Предпочтительными молекулами (с точки зрения мРНК) являются те, которые имеют по меньшей мере 75% или 80% (предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%) гомологию или идентичность последовательности с одной из молекул ДНК, описанной в настоящей заявке. В качестве примера, с точки зрения экспрессии антител в

эукариотических клетках, последовательности ДНК, представленные в перечне последовательностей, были разработаны для соответствия использованию кодонов в эукариотических клетках. Если желательно экспрессировать антитела в *E. coli*, то эти последовательности можно изменить в соответствии с использованием кодона *E. coli*. Варианты молекул ДНК в соответствии с изобретением могут быть сконструированы несколькими различными способами, как описано, например, в WO 2007/042309.

Белки в соответствии с изобретением могут иметь модифицированную N-концевую последовательность, например, делецию одной или нескольких N-концевых аминокислот или замену, например, первой, N-концевой аминокислоты (например, от глутамата до аланина), для оптимизации молекулы для экспрессии с использованием определенных систем экспрессии (таких как определенные векторы или клетки-хозяева), или для экспрессии в виде телец включения или в растворимой форме, или для секреции в среду или периплазматическое пространство, или для содержания внутри клетки, или для получения более гомогенного продукта. Полипептиды в соответствии с изобретением могут иметь модифицированную C-концевую последовательность, такую как дополнительный аланин, и/или дополнительные замены аминокислот в C-концевой части или в других определенных положениях в любой из каркасных областей, как объяснено, например, в WO2012/175741, WO2011/075861 или WO2013/024059, чтобы, например, дополнительно повышать стабильность или снижать иммуногенность таких полипептидов.

Во избежание сомнений, все варианты осуществления, относящиеся к фармацевтическим композициям, наборам, способам лечения, медицинскому применению, комбинациям, способам введения и дозировкам, как описано в настоящей заявке, рассматриваются для любого из мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, или отдельно, или в сочетании с дополнительными терапевтическими средствами (как указано более подробно ниже).

### **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ, ДОЗИРОВКИ**

Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям для лечения заболевания (как более подробно указано ниже), при этом такие

композиции содержат по меньшей мере один мультиспецифический связывающий белок в соответствии с изобретением. Изобретение дополнительно охватывает способы лечения заболевания (как более подробно указано ниже) с использованием по меньшей мере одного мультиспецифического связывающего белка в соответствии с изобретением или фармацевтической композиции, как  
5      указано ниже, и дополнительно включает приготовление лекарственного средства для лечения таких заболеваний путем применения такого связывающего белка в соответствии с изобретением или фармацевтической композиции.

Связывающие белки в соответствии с изобретением (например, любой из  
10      В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#6/CD3#1, В7Н6#7/CD3#1, В7Н6#8/CD3#1, В7Н6#9/CD3#1, В7Н6#10/CD3#1, В7Н6#11/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1,  
15      В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1, как определено последовательностями, представленными в Таблице 1) и/или содержащие их композиции можно вводить нуждающемуся в этом пациенту любым пригодным способом, в зависимости от конкретного используемого фармацевтического состава или композиции. Таким образом, связывающие белки в соответствии с  
20      изобретением и/или содержащие их композиции можно, например, вводить внутривенно (в/в), подкожно (п/к), внутримышечно (в/м), внутрибрюшинно (в/б), чрескожно, перорально, сублингвально (например, в виде сублингвальной таблетки, спрея или капли, помещаемой под язык и адсорбирующей через слизистые оболочки в капиллярную сеть под языком), (интра-)назально  
25      (например, в виде назального спрея и/или в виде аэрозоля), местно, с помощью суппозиториев, путем ингаляции или любым другим подходящим способом в эффективном количестве или дозе. Связывающий белок можно вводить путем инфузии, болюса или инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления введение осуществляют путем внутривенной инфузии или подкожной инъекции.

30      Связывающие белки в соответствии с изобретением и/или содержащие их композиции вводят в соответствии со схемой лечения, которая подходит для лечения и/или облегчения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению или облегчению. Клинический врач, как правило, может

определить подходящую схему лечения в зависимости от таких факторов, как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению или облегчению, тяжесть заболевания, тяжесть его симптомов, используемый специфический связывающий белок в соответствии с изобретением, конкретный способ введения и фармацевтический состав или композиция, возраст, пол, вес, диета, общее состояние пациента и подобные факторы, хорошо известные врачу. Как правило, схема лечения будет включать введение одного или нескольких связывающих белков в соответствии с изобретением, или одной или нескольких композиций, содержащих их, в терапевтически эффективных количествах или дозах.

Как правило, для лечения и/или облегчения заболеваний, расстройств и состояний, упомянутых в настоящей заявке, и в зависимости от конкретного заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, активности используемого специфического связывающего белка в соответствии с изобретением, конкретного пути введения и конкретного используемого фармацевтического состава или композиции, связывающие белки в соответствии с изобретением обычно вводят в количестве от 0,005 до 20,0 мг на килограмм массы тела и в дозе, предпочтительно от 0,05 до 10,0 мг/кг/дозу, либо непрерывно (например, путем инфузии) или более предпочтительно в виде разовых доз (таких как, например, два раза в неделю, еженедельно, один раз в две или три недели или ежемесячные дозы; см. ниже), но могут значительно варьироваться, особенно в зависимости от ранее упомянутых параметров. Таким образом, в некоторых случаях может быть достаточно использовать меньшую дозу, чем указанная выше минимальная доза, тогда как в других случаях может потребоваться превышение верхнего предела. При введении больших количеств может быть целесообразно разделить их на несколько меньших доз, распределенных в течение определенного периода времени, т.е. два или более дня.

В зависимости от специфического связывающего белка в соответствии с изобретением и его конкретных фармакокинетических и других свойств его можно вводить ежедневно, каждый второй, третий, четвертый, пятый или шестой день, еженедельно, один раз каждые две или три недели, ежемесячно и т.п. Схема введения может включать длительное лечение. Под «длительным»

подразумевается продолжительность по меньшей мере две недели и предпочтительно месяцы или годы.

Эффективность мультиспецифического связывающего белка в соответствии с изобретением и содержащих его композиций можно протестировать с использованием любого подходящего анализа *in vitro*, клеточного анализа, анализа *in vivo* и/или модели на животных, известных *per se*, или любой их комбинации в зависимости от конкретного заболевания. Подходящие анализы и модели на животных будут понятны специалисту в данной области техники и, например, включают анализы и модели на животных, используемые в приведенных ниже примерах.

### СОСТАВЫ

Для применения в фармацевтике связывающие белки в соответствии с изобретением могут быть приготовлены в виде фармацевтического препарата, содержащего (i) по меньшей мере один связывающий белок в соответствии с изобретением (например, любой из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#6/CD3#1, В7Н6#7/CD3#1, В7Н6#8/CD3#1, В7Н6#9/CD3#1, В7Н6#10/CD3#1, В7Н6#11/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1) и (ii) по меньшей мере фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество, адъювант и/или стабилизатор и (iii) необязательно один или несколько дополнительных фармакологически активных полипептидов и/или соединений.

Под «фармацевтически приемлемым» подразумевается, что соответствующий материал не проявляет каких-либо биологических или иных нежелательных эффектов при введении индивидууму и не взаимодействует вредным образом с какими-либо другими компонентами фармацевтической композиции (такими как, например, фармацевтически активное вещество), в котором он содержится. Конкретные примеры можно найти в стандартных руководствах, таких как, например Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., Mack Publishing Company, США (1990). Например, связывающие белки в соответствии с изобретением могут быть составлены и введены любым способом,

известным *per se* для обычных антител и фрагментов антител и других фармацевтически активных белков. Таким образом, согласно еще одному варианту осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции или препарату, который содержит по меньшей мере один связывающий белок в соответствии с изобретением и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество, адъювант и/или стабилизатор и необязательно один или несколько других фармакологически активных веществ в форме лиофилизированных или иным образом высушенных составов или водных или неводных растворов или суспензий.

Фармацевтические препараты для парентерального введения, такие как внутривенная, внутримышечная, подкожная инъекция или внутривенная инфузия, могут, например, представлять собой стерильные растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии или порошки, которые содержат активное вещество и которые пригодны, необязательно после дополнительной стадии растворения или разбавления, для инфузий или инъекций. Подходящие носители или разбавители для таких препаратов, например, включают, без ограничения, стерильную воду и фармацевтически приемлемые водные буферы и растворы, такие как физиологический раствор с фосфатным буфером, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хенкса; водные масла; глицерин; этиловый спирт; гликоли, такие как пропиленгликоль, а также минеральные масла, животные масла и растительные масла, например, арахисовое масло, соевое масло, а также их подходящие смеси.

Растворы связывающих белков в соответствии с изобретением могут также содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов, такой как антибактериальные и противогрибковые средства, например, *n*-гидроксibenзоаты, парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота, тиомерсал, (соли щелочных металлов) этилендиаминтетрауксусная кислота и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара, буферы или хлорид натрия. Необязательно могут быть использованы эмульгаторы и/или диспергаторы. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет образования липосом, поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий или за счет использования поверхностно-

активных веществ. Также могут быть добавлены другие средства, замедляющие всасывание, например, моностеарат алюминия и желатин. Растворы могут быть помещены во флаконы для инъекций, ампулы, инфузионные флаконы и т.п.

Во всех случаях конечная лекарственная форма должна быть стерильной, 5 текучей и стабильной в условиях производства и хранения. Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В случае стерильных порошков 10 для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными методами приготовления являются вакуумная сушка и лиофилизация, которые дают порошок активного вещества плюс любой дополнительный желаемый ингредиент, присутствующий в предварительно стерильно отфильтрованных растворах.

Обычно предпочтительны водные растворы или суспензии. Как правило, 15 подходящие составы для терапевтических белков, таких как связывающие белки в соответствии с изобретением представляют собой буферные растворы, такие как растворы, содержащие белок в подходящей концентрации (например, от 0,001 до 400 мг/мл, предпочтительно от 0,005 до 200 мг/мл, более 20 предпочтительно от 0,01 до 200 мг/мл, более предпочтительно от 1,0 до 100 мг/мл, например, 1,0 мг/мл (в/в введение) или 100 мг/мл (п.к. введение) и водный буфер, такой как:

- фосфатно-солевой буфер, рН 7,4,
- другие фосфатные буферы, рН от 6,2 до 8,2,
- 25 - ацетатные буферы, рН от 3,2 до 7,5, предпочтительно рН от 4,8 до 5,5
- гистидиновые буферы, рН от 5,5 до 7,0,
- сукцинатные буферы, рН от 3,2 до 6,6, и
- цитратные буферы, рН от 2,1 до 6,2,

и необязательно соли (например, NaCl) и/или сахара (такие как, например, 30 сахароза и трегалоза) и/или другие многоатомные спирты (такие как, например, маннит и глицерин) для обеспечения изотоничности раствора.

Кроме того, другие агенты, такие как моющие средства, например, 0,02 % TWEEN™ 20 или TWEEN™ 80 могут быть включены в такие растворы. Составы

для подкожного применения могут включать значительно более высокие концентрации антитела по изобретению, такие как до 100 мг/мл или даже выше 100 мг/мл. Однако специалисту в данной области будет ясно, что указанные выше ингредиенты и их количества представляют собой только один предпочтительный вариант. Специалисту в данной области техники будут сразу очевидны их альтернативы и варианты, или их можно легко понять, исходя из приведенного выше описания. Вышеописанные составы необязательно могут быть предоставлены в виде лиофилизированных составов, которые должны быть восстановлены в растворе, т.е. в воде для инъекций (WFI).

В соответствии с еще одним аспектом изобретения связывающий белок по изобретению можно использовать в сочетании с устройством, подходящим для введения белка, таким как шприц, шприц-ручка, микронасос или другое устройство.

#### СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

Другой аспект изобретения относится к способу лечения рака, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества связывающего белка в соответствии с изобретением.

Другой аспект изобретения относится к связывающему белку в соответствии с изобретением для применения в способе лечения рака.

Еще одним аспектом изобретения является применение связывающего белка в соответствии с изобретением для получения фармацевтической композиции для лечения рака.

Во избежание сомнений, аспекты медицинского применения изобретения могут включать любой из специфически связывающих белков изобретения, как описано выше (например, любой из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#6/CD3#1, В7Н6#7/CD3#1, В7Н6#8/CD3#1, В7Н6#9/CD3#1, В7Н6#10/CD3#1, В7Н6#11/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1).

Используемый в настоящей заявке термин «рак» подразумевает включение всех типов раковых новообразований или онкогенных процессов,

метастатических тканей или злокачественно трансформированных клеток, тканей или органов, независимо от гистопатологического типа или стадии агрессивности.

5 Типичными видами рака, рост которых можно ингибировать с использованием мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, являются любые опухоли, экспрессирующие V7H6, предпочтительно колоректальный рак (например, метастатический колоректальный рак, мКРК), немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ).

10 Рак, рост которого можно ингибировать с помощью мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, представляет собой любые опухоли, экспрессирующие V7H6, включая, но не ограничиваясь этим, Т-клеточную лимфому, миелоидный лейкоз, рак молочной железы; рак яичников, плоскоклеточный рак полости рта и рак желудочно-кишечного тракта. Рак  
15 желудочно-кишечного тракта включает, но не ограничивается этим, рак пищевода (например, рак желудочно-пищеводного соединения), рак желудка, гепатоцеллюлярную карциному, рак желчных путей (например, холангиокарциному), рак желчного пузыря, рак поджелудочной железы или колоректальный рак (КРР).

20 В некоторых вариантах осуществления с помощью мультиспецифических связывающих белков в соответствии с изобретением можно лечить следующие виды рака, опухоли и другие пролиферативные заболевания: рак головы и шеи, предпочтительно ПКРГШ; рак легких; предпочтительно НМРЛ; рак молочной железы; рак щитовидной железы; рак шейки матки; рак яичников; рак  
25 эндометрия; рак печени (гепатобластома или гепатоцеллюлярная карцинома); панкреатический рак; рак предстательной железы; саркома желудка; гастроинтестинальная стромальная опухоль, рак пищевода; рак толстой кишки; колоректальный рак; рак почки; рак кожи; опухоль головного мозга; глиобластома; Неходжкинские лимфомы (Т- или В-клеточная лимфома);  
30 лейкемия (хронический или острый миелоидный лейкоз, нелимфоцитарный лейкоз) или множественная миелома.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения рак представляет собой мКРР.

Подразумевают, что все виды рака, опухоли, новообразования и т.д., упомянутые выше, которые характеризуются их специфическим расположением/происхождением в организме, включают в себя как первичные опухоли, так и метастатические опухоли, происходящие от них.

5 Возможно, что пациент с большей вероятностью ответит на лечение связывающим белком в соответствии с изобретением (как описано в настоящей заявке), если у этого пациента рак, характеризующийся высокой экспрессией В7Н6. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий  
10 лечению связывающими белками в соответствии с изобретением представляет собой рак с высокой экспрессией В7Н6, например, экспрессия В7Н6 выше, чем средняя экспрессия в раковых клетках популяции пациентов, страдающих от того же типа рака, экспрессирующего В7Н6.

Связывающие белки в соответствии с изобретением могут быть использованы в терапевтических схемах в контексте лечения первой линии,  
15 второй линии или любой другой линии лечения и поддерживающей терапии.

Связывающие белки в соответствии с изобретением можно использовать для профилактики, кратковременного или длительного лечения вышеупомянутых заболеваний, необязательно также в сочетании с лучевой терапией, одним или несколькими дополнительными терапевтическими  
20 средствами и/или хирургическим вмешательством.

В предпочтительных вариантах осуществления белок в соответствии с изобретением используют для лечения рака в сочетании с антагонистом PD-1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PDL-1. Предпочтительно  
25 указанное антитело против PD-1 выбирают из группы, которая включает в себя пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5, как описано в настоящей заявке (как определено последовательностями в Таблице А ниже) и в WO2017/198741 (включенной в настоящую заявку посредством ссылки). Предпочтительно указанное антитело против PDL-1  
30 выбирают из группы, которая включает в себя атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии с изобретением (предпочтительно один из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1,

В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1,  
В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1,  
В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1,  
В7Н6#24/CD3#1) используют для лечения рака в сочетании с PD1-1. В особенно  
5 предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии  
с изобретением (предпочтительно один из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1,  
В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1,  
В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1,  
В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1,  
10 В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1)  
используют для лечения рака в сочетании с PD1-2. В особенно  
предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии  
с изобретением (предпочтительно один из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1,  
В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1,  
15 В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1,  
В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1,  
В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1)  
используют для лечения рака в сочетании с PD1-3. В особенно  
предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии  
20 с изобретением (предпочтительно один из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1,  
В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1,  
В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1,  
В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1,  
В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1)  
25 используют для лечения рака в сочетании с PD1-4. В особенно  
предпочтительных вариантах осуществления связывающий белок в соответствии  
с изобретением (предпочтительно один из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1,  
В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1,  
В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1,  
30 В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1,  
В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1).

Таблица А: Аминокислотные последовательности и SEQ ID NO последовательностей тяжелой и легкой цепей антител против PD1 PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5.

Номер SEQ ID:	Краткое описание последовательности	Последовательность
SEQ ID NO:331	PD1-1 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAP GKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLG
SEQ ID NO:332	PD1-1 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWIYQQK PGQAPKLLIYVASNQSGGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
SEQ ID NO:333	PD1-2 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAP GKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHSNPVNYAMDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLG
SEQ ID NO:334	PD1-2 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWIYQQK PGQAPKLLIYVASNQSGGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
SEQ ID NO:335	PD1-3 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMSWVRQAP GKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLG
SEQ ID NO:336	PD1-3 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWIYQQK PGQAPKLLIYVASNQSGGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF

Номер SEQ ID:	Краткое описание последовательности	Последовательность
		NRGEC
SEQ ID NO:337	PD1-4 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWVRQAP GKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLLTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLG
SEQ ID NO:338	PD1-4 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWIYQQK PGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGSDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
SEQ ID NO:339	PD1-5 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWVRQAP GKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLLTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLG
SEQ ID NO:340	PD1-5 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWIYQQK PGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGSDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

В соответствии с этими предпочтительными вариантами осуществления и любыми другими аспектами настоящего изобретения антитела PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5 представляют собой молекулы антител, как описано в WO2017/198741, и определены последовательностями, как представлено в Таблице А выше.

Соответственно, PD1-1 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:331, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:332;

PD1-2 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:333, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:334;

PD1-3 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:335 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:336;

5 PD1-4 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:337 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:338; и

PD1-5 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:339 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:340.

10 Вышеизложенное также включает в себя применение связывающих белков в соответствии с изобретением в различных способах лечения вышеуказанных заболеваний путем введения терапевтически эффективной дозы нуждающемуся в этом пациенту, а также применение этих связывающих белков для изготовления лекарственных средств для лечения таких заболеваний, а также  
15 фармацевтических композиций, включающих в себя такие связывающие белки в соответствии с изобретением, а также получение и/или производство лекарственных средств, включающих такие связывающие белки в соответствии с изобретением, и т.п.

## 20 КОМБИНАЦИИ С ДРУГИМИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯМИ

Связывающий белок в соответствии с изобретением (например, любой из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#6/CD3#1, В7Н6#7/CD3#1, В7Н6#8/CD3#1, В7Н6#9/CD3#1, В7Н6#10/CD3#1, В7Н6#11/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1,  
25 В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1) может быть использован сам по себе или в сочетании с другими способами лечения рака, например, хирургия, лучевая терапия, химиотерапия, таргетная терапия, иммунотерапия  
30 или их комбинации. Например, связывающий белок в соответствии с изобретением можно использовать для лечения рака в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, в частности, в сочетании с цитотоксическим или цитостатическим химиотерапевтическим

средством, терапевтически активным соединением, ингибирующим ангиогенез, ингибитором пути трансдукции сигналов, например, ингибитором EGFR, иммуномодулятором, ингибитором иммунных контрольных точек, ингибитором митотических контрольных точек или средством гормональной терапии.

5           Дополнительный терапевтическое средство можно вводить одновременно необязательно в качестве компонента того же фармацевтического препарата, или до или после введения связывающего белка V7H6/CD3.

          Цитостатические и/или цитотоксические активные вещества, которые можно вводить в комбинации со связывающими молекулами в соответствии с  
10           изобретением включает в себя, не ограничиваясь ими, гормоны, аналоги гормонов и антигормоны, ингибиторы ароматазы, агонисты и антагонисты LHRH, ингибиторы факторов роста (факторов роста, таких как например, фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF),  
15           инсулиноподобные факторы роста (IGF), человеческий эпидермальный фактор роста (HER, например HER2, HER3, HER4) и фактор роста гепатоцитов (HGF)), ингибиторы представляют собой, например, антитела (против) фактора роста, антитела (против) рецептора фактора роста и ингибиторы тирозинкиназы, такие как, например, цетуксимаб, gefитиниб, афатиниб, нинтеданиб, иматиниб,  
20           лапатиниб, бозутиниб и трастузумаб; антиметаболиты (например, антифолаты, такие как метотрексат, ралтитрексед, аналоги пиримидина, такие как 5-фторурацил (5-FU), FOLFOX (комбинированный режим фолиновой кислоты, 5-ФУ и оксалиплатина), FOLFIRI (комбинированный режим фолиновой кислоты, 5-ФУ и иринотекана), гемцитабин, иринотекан, доксорубицин, TAS-102,  
25           капецитабин и гемцитабин, аналоги пурина и аденозина, такие как меркаптопурин, тиогуанин, кладрибин и пентостатин, цитарабин (ара С), флударабин); противоопухолевые антибиотики (например, антрациклины); производные платины (например, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин); алкилирующие средства (например эстрамустин, меклоретамин, мелфалан,  
30           хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид, темозоломид, нитрозомочевины, такие как, например, кармустин и ломустин, тиотепа); антимитотические средства (например, алкалоиды барвинка, такие как, например, винбластин, виндезин, винорелбин и винкристин; и таксаны, такие

как паклитаксел, доцетаксел); ингибиторы ангиогенеза, включая бевацизумаб, рамуцирумаб и афлиберцепт, ингибиторы тубулина; ингибиторы синтеза ДНК, ингибиторы PARP, ингибиторы топоизомеразы (например, эпиподофиллотоксины, такие как, например, этопозид и этопифос, тенипозид, амсакрин, топотекан, иринотекан, митоксантрон), ингибиторы серин/треонинкиназы (например PDK1 ингибиторы, ингибиторы Raf, ингибиторы A-Raf, ингибиторы B-Raf, ингибиторы C-Raf, ингибиторы mTOR, ингибиторы mTORC1/2, ингибиторы PI3K, ингибиторы PI3K $\alpha$ , двойные ингибиторы mTOR/PI3K, ингибиторы STK33, ингибиторы АКТ, ингибиторы PLK1 (такие как воласертиб), ингибиторы CDK, включая CDK9 ингибиторы, ингибиторы киназы Аврора), ингибиторы тирозинкиназы (например, ингибиторы PTK2/FAK), ингибиторы белок-белкового взаимодействия, ингибиторы MEK, ингибиторы ERK, ингибиторы FLT3, ингибиторы BRD4, ингибиторы IGF-1R, ингибиторы Bcl-xL, ингибиторы Bcl-2, ингибиторы Bcl-2/Bcl-xL, ингибиторы рецепторов ErbB, ингибиторы BCR-ABL, ингибиторы ABL, ингибиторы Src, аналоги рапамицина (например, эверолимус, темсиролимус, ридафоролимус, сиролимус), ингибиторы синтеза андрогенов, ингибиторы андрогеновых рецепторов, ингибиторы DNMT, ингибиторы HDAC, ингибиторы ANG1/2, ингибиторы CYP17, радиофармацевтические препараты, иммунотерапевтические средства, такие как ингибиторы иммунных контрольных точек (например, связывающие молекулы CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3 и TIM3/иммуноглобулины, такие как ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб) и различные химиотерапевтические средства, такие как амифостин, анагрелид, клодронат, филграстин, интерферон, интерферон альфа, лейковорин, ритуксимаб, прокарбазин, левамизол, месна, митотан, памидронат и порфирмер; ингибиторы протеасом (такие как бортезомиб); миметики Smac и ВН3; средства, восстанавливающие функциональность p53, включая антагонист mdm2-p53; ингибиторы сигнального пути Wnt/бета-катенин; и/или ингибиторы циклинзависимой киназы 9.

Особенно предпочтительными являются способы лечения связывающими молекулами в соответствии с изобретением в комбинации с одним или несколькими иммунотерапевтическими средствами, включая средства против PD-1 и против PD-L1 и средства против LAG3: примерные средства против PD1

включают в себя, но не ограничиваются ними, антитело PDR-001 против PD-1, пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб и PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5, как описано в настоящей заявке (Таблица А) и в WO2017/198741. Примерные средства против PDL-1 включают в себя, но не ограничиваются ними

5 атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб. В предпочтительных вариантах осуществления связывающая молекула в соответствии с изобретением (предпочтительно одним из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1,

10 В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1) сочетается с PD1-1. В предпочтительных вариантах осуществления связывающая молекула изобретения (предпочтительно одним из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1,

15 В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1) сочетается с PD1-2. В предпочтительных вариантах осуществления связывающая молекула в соответствии с изобретением (предпочтительно одним из В7Н6#1/CD3#1,

20 В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1) сочетается с PD1-3. В предпочтительных вариантах

25 осуществления связывающая молекула в соответствии с изобретением (предпочтительно одним из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1,

30 В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1) сочетается с PD1-4. В предпочтительных вариантах осуществления связывающая молекула в соответствии с изобретением (предпочтительно одним из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1,

B7H6#12/CD3#1, B7H6#13/CD3#1, B7H6#14/CD3#1, B7H6#15/CD3#1, B7H6#16/CD3#1, B7H6#17/CD3#1, B7H6#18/CD3#1, B7H6#19/CD3#1, B7H6#20/CD3#1, B7H6#21/CD3#1, B7H6#22/CD3#1, B7H6#23/CD3#1, B7H6#24/CD3#1)) сочетается с PD1-5.

5 В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство может представлять собой дополнительное иммунотерапевтическое средство, такое как модуляторы: TIM-1, TIM-3, TIM-4, PD-L2, LAG3, CTLA-4, галектин 9, галектин-1, CD69, CD113, GPR56, CD48, GARP, CAECAM-1, BTLA, TIGIT, CD160, LAIR1, 2B4, CEACAM, CD39, TGF $\beta$ , IL-10, лиганд Fas, ICOS, семейство B7 (B7-1, B7-2, B7-H1 (PDL-1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-Н3, B7-Н4, B7-Н5 (VISTA)), gp49B, PIR-B, рецепторы семейства KIR, SIRPalpha (CD47), ILT-2, ILT-4, IDO, CD39, аргиназа, CD73 HHLA2, бутирофилины или A2aR.

15 В некоторых вариантах осуществления дополнительное иммунотерапевтическое средство может представлять собой член семейства молекул TNF, которые связываются с родственными членами семейства рецепторов TNF, включая CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, CD137/FAP, GITR, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, 20 TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин  $\alpha$ /TNF $\beta$ , TNFR2, TNF $\alpha$ , LT $\beta$ R, лимфотоксин  $\alpha$ 1 $\beta$ 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR. Предпочтительно дополнительное иммунотерапевтическое средство представляет собой CD137/FAP.

25 В некоторых вариантах осуществления дополнительное иммунотерапевтическое средство выбрано из (i) антагонистов цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF; «иммуносупрессивные цитокины») и/или (ii) агонисты цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток и/или цитокины, такие как IL2, для стимуляции иммунного ответа, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как рак.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное иммунотерапевтическое средство представляет собой агонист белка, который

стимулирует активацию Т-клеток, такой как CD28, GITRL, OX40L, CD27 и CD28H или агонист STING.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой онколитический вирус, включая, помимо прочего, онколитический вирус, полученный из вируса коровьей оспы, аденовирус (AdV), вирус простого герпеса (HSV1 или HSV2), реовирус, вирус миксомы (MYXV), полиовирус, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус Мароба, вирус ветряной оспы, вирус кори (MV) или вирус болезни Ньюкасла (NDV).

#### Наборы

Изобретение также охватывает наборы, содержащие по меньшей мере мультиспецифический связывающий белок в соответствии с изобретением (например, любого из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#6/CD3#1, В7Н6#7/CD3#1, В7Н6#8/CD3#1, В7Н6#9/CD3#1, В7Н6#10/CD3#1, В7Н6#11/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1) и необязательно один или несколько других компонентов, выбранных из группы, состоящей из других лекарственных средств, используемых для лечения заболеваний и нарушений, как описано выше.

В одном варианте осуществления набор включает в себя композицию, содержащую эффективное количество связывающего белка в соответствии с изобретением в стандартной лекарственной форме.

Изобретение также охватывает наборы, включающие в себя по меньшей мере мультиспецифический связывающий белок в соответствии с изобретением и один или несколько других компонентов, выбранных из группы, состоящей из других лекарственных средств, используемых для лечения заболеваний и нарушений, как описано выше.

В одном варианте осуществления набор включает в себя композицию, содержащую эффективное количество мультиспецифического связывающего белка в соответствии с изобретением в стандартной лекарственной форме (предпочтительно одним из любой из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1,

В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1). В другом варианте осуществления набор включает в себя как композицию, содержащую эффективное количество мультиспецифического связывающего белка в соответствии с изобретением в стандартной лекарственной форме (предпочтительно любой из В7Н6#1/CD3#1, В7Н6#2/CD3#1, В7Н6#3/CD3#1, В7Н6#4/CD3#1, В7Н6#5/CD3#1, В7Н6#12/CD3#1, В7Н6#13/CD3#1, В7Н6#14/CD3#1, В7Н6#15/CD3#1, В7Н6#16/CD3#1, В7Н6#17/CD3#1, В7Н6#18/CD3#1, В7Н6#19/CD3#1, В7Н6#20/CD3#1, В7Н6#21/CD3#1, В7Н6#22/CD3#1, В7Н6#23/CD3#1, В7Н6#24/CD3#1) и композицию, содержащую эффективное количество антагониста PD-1 в стандартной лекарственной форме, такой как антитело против PD-1, наиболее предпочтительно PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5, как описано в настоящей заявке (например Таблица А) и в WO2017/198741.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит стерильную емкость, содержащую такую композицию; такие емкости могут представлять собой коробки, ампулы, бутылочки, флаконы, тьюбики, пакеты, саше, блистерные упаковки или другие подходящие формы емкостей, известные в данной области техники. Такие емкости могут быть изготовлены из пластика, стекла, ламинированной бумаги, металлической фольги или других материалов, пригодных для хранения лекарственных средств. Кроме того, набор может содержать фармацевтическую композицию в первой емкости со связывающим белком в соответствии с изобретением в лиофилизированной форме и во втором контейнере с фармацевтически приемлемым разбавителем (например, стерильной водой) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения связывающего белка.

При желании, мультиспецифический связывающий белок в соответствии с изобретением предоставляется вместе с инструкциями по введению мультиспецифических связывающих белков субъекту, страдающему от рака. Инструкции обычно содержат информацию о применении композиции для лечения или профилактики рака. В других вариантах осуществления инструкции содержат по меньшей мере одно из следующего: описание терапевтического

средства; график дозирования и введения для лечения или профилактики рака или его симптомов; меры предосторожности; предупреждения; показания; противопоказания; информация о передозировке; неблагоприятные реакции; фармакология животных; клинические исследования; и/или ссылки. Инструкции могут быть напечатаны непосредственно на емкости (при наличии), или в виде этикетки, прикрепленной к емкости, или в виде отдельного листа, брошюры, карточки или папки, поставляемых в емкости или вместе с ней.

При необходимости эти предлагаемые компоненты набора могут быть упакованы способом, обычным для использования специалистами в данной области. Например, эти предлагаемые компоненты набора могут быть предоставлены в виде раствора или в виде жидкой дисперсии и т.п.

#### ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры иллюстрируют изобретение. Эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

#### Пример 1: Дизайн и конструирование белков, связывающих В7Н6/CD3

Авторы настоящего изобретения разработали мультиспецифические связывающие белки, которые связывают В7Н6 и CD3 и индуцируют активацию Т-клеток, приводящую к лизису опухолевых клеток, экспрессирующих В7Н6. Используемая молекулярная конструкция имеет каркас антитела IgG и структуру, подобную IgG. В ней использована технологию «выступ-во-впадину» Fc для гетеродимеризации плечей выступа и впадины. Кроме того, связывающий белок имеет гибкие пептидные последовательности между легкой и соответствующей тяжелой цепью в каждом плече. Таким образом, связывающий белок содержит два плеча, одно из которых связывается с CD3, а другое связывается с В7Н6, причем каждое плечо содержит одноцепочечный Fab и область Fc (см. Фигуру 1).

Предпочтительно связывающая молекула является биспецифической и двухвалентной (моновалентной для каждой из двух мишеней).

Получение связывающих доменов, которые распознают В7Н6 и CD3, с использованием высокопроизводительного восстановления гена V из гибридом и культивируемых одиночных В-клеток.

Для получения связывающих антител против В7Н6, гибридомы или отдельные В-клетки, полученные от иммунизированных В7Н6 мышей дикого

типа и гуманизированных мышей ALIVAMAB™ (Ablexis, Сан-Франциско, Калифорния, США: платформа трансгенных мышей ALIVAMAB MOUSE™ с локусами иммуноглобулина человека) культивировали *in vitro*. Супернатанты подвергали скринингу на связывание с рекомбинантным человеческим B7H6 с помощью набора ALPHALISA® Immunoassay (PerkinElmer, Waltham, MA, США), с клетками NCI-H716 (ATCC®, CCL-251™), экспрессирующими человеческий B7H6, а также на связывание с рекомбинантно экспрессированным B7-H6 яванского макака на клетках CHO, с помощью проточной цитометрии.

Затем из идентифицированных положительных клонов амплифицировали гены иммуноглобулина (Ig) VH и VL. Для выделения РНК из гибридом осаждали приблизительно  $2 \times 10^6$  клеток из отдельных клонов и использовали в качестве исходного материала. Для одиночных В-клеток в качестве исходного материала использовали от 100 до 500 клеток, выращенных из единично выделенных В-клеток. РНК выделяли с использованием набора для выделения мини-РНК RNeasy® Plus (Qiagen, Hilden, Германия). Затем кДНК синтезировали с использованием набора для синтеза кДНК SMARTer® (Clontech, Mountain View, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя. Для облегчения синтеза кДНК использовали для праймирования обратной транскрипции всех матричных РНК с последующим «5'-кэпированием» с олигонуклеотидом SMARTer ПА. Последующую амплификацию фрагментов VH и VL проводили с помощью двухэтапной ПЦР-амплификации с использованием 5'-праймеров, нацеленных на кэп SMARTer ПА и 3'-праймеров, нацеленных на консенсусные области в CH1. Вкратце, каждые 50 мкл ПЦР реакции состоит из 20 мкМ смесей прямых и обратных праймеров, 25 мкл премикса полимеразы ДНК PrimeSTAR® Max (Clontech), 2 мкл неочищенной кДНК и 21 мкл дважды дистиллированной H<sub>2</sub>O. Циклическая программа начинается при 94 °С в течение 3 мин., затем следует 35 циклов (94°С в течение 30 сек., 50°С в течение 1 мин., 68 °С в течение 1 мин.), и заканчивается при 72°С в течение 7 мин. ПЦР второго раунда проводили с праймерами второго раунда VL и VH, содержащими комплементарные удлинения из 15 пар оснований, которые «перекрываются» с соответствующими областями в их соответствующем материнском векторе рТТ5 (VH и VL). Второй раунд ПЦР проводили с той же программой циклов ПЦР.

Набор In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech, США) использовали для направленного клонирования гена VL в вектор pTT5 huIgK и гена VH в вектор pTT5 huIgG1KO. Чтобы облегчить клонирование In-Fusion® HD, продукты ПЦР перед клонированием In-Fusion HD очищали и обрабатывали усилителем клонирования. Клонирование и трансформацию проводили согласно протоколу производителя (Clontech, U.S.A.). Мини-препараты ДНК подвергали секвенированию по Сэнгеру для подтверждения того, что были получены полные фрагменты V-гена.

Используя эту методологию, были получены пары генов Ig VH и VL, кодирующих связывающие домены со специфичностью в отношении B7H6. Рекомбинантные антитела получали путем транзиторной трансфекции клеток СНО-Е37 соответствующими плазмидами, кодирующими тяжелые и легкие цепи.

Для получения дополнительных связывающих молекул против CD3, иммунизацию мышей ДТ проводили с использованием конструкции huCD3ε пептид1-27. Супернатанты гибридом проверяли на связывание с рекомбинантным белком huCD3E+G-Fc и с рекомбинантным белком суCD3E+G-Fc, а также на связывание с huCD3-позитивными и суCD3-позитивными клетками. Вариабельные области положительных клонов выделяли и клонировали в виде IgG или IgG-подобной биспецифической конструкции для дальнейшей оценки.

#### Гуманизация/оптимизация связывающих молекул B7H6 и CD3

Последовательности связывающих молекул B7H6 или CD3, как описано выше, а также связывающих молекул CD3, описанных в литературных источниках (Pessano и соавт., EMBO J. 1985 Feb; 4(2): 337-44; Salmerón A и соавт., J Immunol. 1991 Nov 1;147(9):3047-52) были гуманизированы и/или оптимизированы. Оптимизация последовательности/гуманизация антител представляет собой методологию создания антител, выращенных у нечеловеческих видов (против определенного антигена/эпитопа), для использования в качестве терапевтических средств, которые напоминают антитела, вырабатываемые у человека, и тем самым устраняют потенциальные побочные эффекты, такие как иммуногенность, при сохранении специфичности. Используемый в данном случае подход к оптимизации/гуманизации последовательности был описан у Singh и соавт., 2015 (Singh S и соавт., mAbs

2015: 7(4):778-91). Вкратце, близко совпадающие человеческие зародышевые линии были идентифицированы *in silico*, и варианты оптимизации/гуманизации были оценены с использованием метода скрининга фагов. Окончательные кандидатные последовательности были выбраны на основе связывания, процентной оценки человека и оценки EpiVax® (инструмент для прогнозирования потенциальной иммуногенности *in silico*).

#### Конструирование биспецифических белков, связывающих В7Н6 и CD3

Вариабельные области связывающих молекул В7Н6 и CD3 клонировали в вектор экспрессии рТТ5 (National Research Council, Канада), с использованием общепринятых методов молекулярной биологии для образования биспецифических связывающих белков с одним плечом, специфичным для связывания В7Н6, включающим одноцепочечный Fab, связывающийся с В7Н6 и область Fc (такая связывающая единица также упоминается в настоящей заявке как «плечо В7Н6» или «цепь В7Н6») и специфическое для CD3 связывающее плечо, содержащее одноцепочечный Fab, связывающийся с CD3, и область Fc (такая связывающая единица также упоминается в настоящей заявке как «плечо CD3» или «цепь CD3»). Области Fc плеч В7Н6 и CD3 включают в себя мутации «W» или «SAV» (Atwell и соавт., JMB, 1997, 270, 26-35) и соответствующие цепи обозначаются как цепи W или SAV. Для сборки многофрагментной ДНК использовали подходы сборки по Гибсону и NEBuilder® HiFi DNA Assembly в соответствии с протоколами производителя (New England Biolabs, Ipswich, MA, США). Мини-препараты ДНК секвенировали.

Каждый вектор экспрессии содержит эукариотические промоторные элементы для гена, кодирующего цепь (плечо/цепь В7Н6 или CD3), т.е. ген, кодирующий сигнальную последовательность, а также легкую и тяжелую цепи, кассету экспрессии для прокариотического маркерного гена селекции, такого как ампициллин, и начало репликации. Эти плазмиды ДНК размножали в устойчивых к ампициллину колониях и культурах *E. coli* и очищали.

#### Пример 2: Экспрессия и очистка биспецифических белков, связывающих В7Н6 и CD3

Биспецифические молекулы, связывающие В7Н6 и CD3, получали путем транзиторной трансфекции клеток CHO-E векторами рТТ5, несущими гены, кодирующие В7Н6/CD3-цепь (одна цепь как W-цепь, а другая как SAV-цепь).

Вкратце, трансфицированные клетки CHO-E, растущие в суспензии в бессывороточной среде, культивировали во встряхиваемых колбах при перемешивании при 140 об./мин., 37°C и 5% CO<sub>2</sub> и содержали в условиях экспоненциального роста. В день трансфекции клетки химически трансфицировали плазмидой W-цепи и плазмидой SAV-цепи в массовом соотношении 1:3 с использованием реагента для трансфекции Mirus Bio TransIT Pro®. Затем клетки высевали в количестве от 1 до 2x10<sup>6</sup> клеток/мл в 1 л экспрессионной среды Gibco® FreeStyle™ CHO (LifeTechnologies, NY, США). Затем клетки инкубировали при орбитальном встряхивании в течение 10 дней с однократным кормлением на 7-й день 200 мл коммерческого питательного раствора для оптимизации экспрессии белков. Титры антител в супернатантах клеточных культур определяли с использованием прибора Octet® (Pall ForteBio, CA, US) и наконечников биосенсора proTA в соответствии с инструкциями производителя.

Рекомбинантные белки, связывающие B7H6/CD3, очищали из культурального супернатанта в двухстадийном процессе с использованием системы очистки белков ÄKTA™ Pure от GE Healthcare Life Sciences. Во-первых, образец был получен из собранной клеточной культуральной жидкости с помощью аффинной хроматографии с белком А с использованием колонки MabSelect™ (GE Healthcare). Белок связывается с белком А при нейтральном рН и промывается высоким содержанием соли (1 М NaCl) для удаления компонентов среды для культивирования клеток и любых белков или компонентов, которые неспецифически связываются с белком А. Образец антитела или антителоподобной конструкции элюировали в изократический режим с использованием 30 мМ ацетата натрия, рН 3,5. Элюированный образец нейтрализовали до рН 5,0 с помощью 1% раствора 3М ацетата натрия, рН 9,0. Нейтрализованный белок стерильно фильтровали с помощью системы фильтрации 0,22 мкм. Концентрацию измеряли с помощью UV280 на спектрофотометре nanodrop 8000. При второй очистке применяли катионообменную хроматографию с использованием колонки с катионообменной смолой POROS™50 HS (Applied Biosystems, Карлсбад, Калифорния, США) или эксклюзионную хроматографию с использованием колонки HiLoad® 26/600 Superdex® 200 пг (GE Healthcare). Двухстадийно

очищенный материал хранили в конечном буфере из 50 mM ацетата натрия и 100 mM NaCl, pH 5,0. Чистоту и степень неоднородности образцов оценивали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии, масс-спектрометрии и аналитического ультрацентрифугирования. Образцы, подготовленные для функционального тестирования, представляли собой двухстадийно очищенный материал с содержанием мономера от 95 до 99%.

Таблица 1: Аминокислотные последовательности и SEQ ID NO CDR, VH, VL, scFabs, плеча B7H6 и последовательности плеча CD3 конструкций белков/антитела, описанных в настоящей заявке:

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
SEQ ID NO: 1	B7H6#1 LCCDR1	KSSQSLFYSSNQKNYLA
SEQ ID NO:2	B7H6#1 LCCDR2	WASTRES
SEQ ID NO:3	B7H6#1 LCCDR3	QQYYNYPRT
SEQ ID NO:4	B7H6#1 HCCDR1	GYTFTDYMN
SEQ ID NO:5	B7H6#1 HCCDR2	YIYPKTGGNGYNQKFKD
SEQ ID NO:6	B7H6#1 HCCDR3	ENWDGYTMAY
SEQ ID NO:7	B7H6#2 LCCDR1	RATSSLYSMH
SEQ ID NO:8	B7H6#2 LCCDR2	ATFNLAS
SEQ ID NO:9	B7H6#2 LCCDR3	QQWSTNPPKLT
SEQ ID NO:10	B7H6#2 HCCDR1	GFNIKNTFIH
SEQ ID NO:11	B7H6#2 HCCDR2	RIDPANGNTIYASKFQG
SEQ ID NO:12	B7H6#2 HCCDR3	TYGGTNYFDY
SEQ ID NO:13	B7H6#3 LCCDR1	KASHNVGVYVA
SEQ ID NO:14	B7H6#3 LCCDR2	SASNRYS
SEQ ID NO:15	B7H6#3 LCCDR3	QQYNSYPLT
SEQ ID NO:16	B7H6#3 HCCDR1	GFTFSDYYMT
SEQ ID NO:17	B7H6#3 HCCDR2	NIDYDGSRIYYLDSLKS
SEQ ID NO:18	B7H6#3 HCCDR3	DDPAWLAY
SEQ ID NO:19	B7H6#4 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:20	B7H6#4 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:21	B7H6#4	QQYISYPLT

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
	LCCDR3	
SEQ ID NO:22	B7H6#4 HCCDR1	GYTFTNYWMN
SEQ ID NO:23	B7H6#4 HCCDR2	GIYLNQDSTDYNEKFKG
SEQ ID NO:24	B7H6#4 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO:25	B7H6#5 LCCDR1	RASQDIRNDLG
SEQ ID NO:26	B7H6#5 LCCDR2	AASSLES
SEQ ID NO:27	B7H6#5 LCCDR3	LQYYNHPLT
SEQ ID NO:28	B7H6#5 HCCDR1	GYTFTGYIYH
SEQ ID NO:29	B7H6#5 HCCDR2	WINPHSGATNYAQNFQG
SEQ ID NO:30	B7H6#5 HCCDR3	ERWGSQTFNI
SEQ ID NO:31	B7H6#6 LCCDR1	KASQSVSNDVV
SEQ ID NO:32	B7H6#6 LCCDR2	STSNRYI
SEQ ID NO:33	B7H6#6 LCCDR3	QQDYSSPYT
SEQ ID NO:34	B7H6#6 HCCDR1	GYTFTDYTMH
SEQ ID NO:35	B7H6#6 HCCDR2	GINPNYDNTGYSEKFKD
SEQ ID NO:36	B7H6#6 HCCDR3	SGSRRSFYFDY
SEQ ID NO: 37	B7H6#7 LCCDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID NO:38	B7H6#7 LCCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO:39	B7H6#7 LCCDR3	QQANSFPRT
SEQ ID NO:40	B7H6#7 HCCDR1	GGISISYNYWS
SEQ ID NO:41	B7H6#7 HCCDR2	HIYYSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO:42	B7H6#7 HCCDR3	VGTWGSFDD
SEQ ID NO: 43	B7H6#8 LCCDR1	RSSQSLLYNNRYNYLD
SEQ ID NO:44	B7H6#8 LCCDR2	LGSNRAS
SEQ ID NO:45	B7H6#8 LCCDR3	MQTLQIPIT
SEQ ID NO:46	B7H6#8 HCCDR1	GDTLNSYGIS
SEQ ID NO:47	B7H6#8 HCCDR2	GIIPIFDTTKYAQKFOG
SEQ ID NO:48	B7H6#8 HCCDR3	ERGYRFSEDYFFYYGMDV
SEQ ID NO: 49	B7H6#9 LCCDR1	RASESVDNFGVSEFMN

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
SEQ ID NO:50	B7H6#9 LCCDR2	AASNQGS
SEQ ID NO:51	B7H6#9 LCCDR3	QQSKEVPWT
SEQ ID NO:52	B7H6#9 HCCDR1	DYTFTHYWIH
SEQ ID NO:53	B7H6#9 HCCDR2	IIGPSDNEIHYNQDFKD
SEQ ID NO:54	B7H6#9 HCCDR3	QIISMVVGTEYFDV
SEQ ID NO: 55	B7H6#10 LCCDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID NO:56	B7H6#10 LCCDR2	VASSLQR
SEQ ID NO:57	B7H6#10 LCCDR3	QQANSFPRT
SEQ ID NO:58	B7H6#10 HCCDR1	GDISISSYWS
SEQ ID NO:59	B7H6#10 HCCDR2	HIYTSEKNNYNPSLKS
SEQ ID NO:60	B7H6#10 HCCDR3	VGNWGSHTA
SEQ ID NO: 61	B7H6#11 LCCDR1	RSSQSLHNSNGYNYLD
SEQ ID NO:62	B7H6#11 LCCDR2	LGSNRAS
SEQ ID NO:63	B7H6#11 LCCDR3	MQALQTPLT
SEQ ID NO:64	B7H6#11 HCCDR1	GITFSYTMN
SEQ ID NO:65	B7H6#11 HCCDR2	SISSRSSYIYYADSVKG
SEQ ID NO:66	B7H6#11 HCCDR3	DKGDYSKDIYYYYGMDV
SEQ ID NO: 67	B7H6#12 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:68	B7H6#12 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:69	B7H6#12 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:70	B7H6#12 HCCDR1	GYTFTNYWMN
SEQ ID NO:71	B7H6#12 HCCDR2	GIYLNQDSTDYNEKFKG
SEQ ID NO:72	B7H6#12 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 73	B7H6#13 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:74	B7H6#13 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:75	B7H6#13 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:76	B7H6#13 HCCDR1	GYTFTSYWMN
SEQ ID NO:77	B7H6#13 HCCDR2	GIYLNQDSTDYNEKFKG
SEQ ID NO:78	B7H6#13	RGDYFGDF

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
	HCCDR3	
SEQ ID NO: 79	B7H6#14 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:80	B7H6#14 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:81	B7H6#14 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:82	B7H6#14 HCCDR1	GYTFTNYWMN
SEQ ID NO:83	B7H6#14 HCCDR2	GIYLNQDSTDYNEKFKG
SEQ ID NO:84	B7H6#14 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 85	B7H6#15 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:86	B7H6#15 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:87	B7H6#15 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:88	B7H6#15 HCCDR1	GYTFTNYWMN
SEQ ID NO:89	B7H6#15 HCCDR2	GIYLSGDSTDYNEKFKG
SEQ ID NO:90	B7H6#15 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 91	B7H6#16 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:92	B7H6#16 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:93	B7H6#16 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:94	B7H6#16 HCCDR1	GYTFTSYWMN
SEQ ID NO:95	B7H6#16 HCCDR2	GIYLSGESTDYNEKFKG
SEQ ID NO:96	B7H6#16 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 97	B7H6#17 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:98	B7H6#17 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:99	B7H6#17 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:100	B7H6#17 HCCDR1	GYTFTSYWMN
SEQ ID NO:101	B7H6#17 HCCDR2	GIYLSGDSTDYNEKFKG
SEQ ID NO:102	B7H6#17 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 103	B7H6#18 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:104	B7H6#18 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:105	B7H6#18 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:106	B7H6#18 HCCDR1	GYTFTSYWMN

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
SEQ ID NO:107	B7H6#18 HCCDR2	GIYLSGDSTDYNEKFKG
SEQ ID NO:108	B7H6#18 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 109	B7H6#19 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:110	B7H6#19 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:111	B7H6#19 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:112	B7H6#19 HCCDR1	GYTFTSYWMN
SEQ ID NO:113	B7H6#19 HCCDR2	GIYLSGESTDYNEKFKG
SEQ ID NO:114	B7H6#19 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 115	B7H6#20 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:116	B7H6#20 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:117	B7H6#20 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:118	B7H6#20 HCCDR1	GYTFTSYWMN
SEQ ID NO:119	B7H6#20 HCCDR2	GIYLSGDSTDYNEKFKG
SEQ ID NO:120	B7H6#20 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 121	B7H6#21 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:122	B7H6#21 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:123	B7H6#21 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:124	B7H6#21 HCCDR1	GYTFTSYWMN
SEQ ID NO:125	B7H6#21 HCCDR2	GIYLSGESTDYNEKFKG
SEQ ID NO:126	B7H6#21 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 127	B7H6#22 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:128	B7H6#22 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:129	B7H6#22 LCCDR3	QQYISYPLT
SEQ ID NO:130	B7H6#22 HCCDR1	GYTFTSYWMN
SEQ ID NO:131	B7H6#22 HCCDR2	GIYLSGDSTDYNEKFKG
SEQ ID NO:132	B7H6#22 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 133	B7H6#23 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:134	B7H6#23 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:135	B7H6#23	QQYISYPLT

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
	LCCDR3	
SEQ ID NO:136	B7H6#23 HCCDR1	GYTFTSYWMN
SEQ ID NO:137	B7H6#23 HCCDR2	GIYLSGESTDYNEKFKG
SEQ ID NO:138	B7H6#23 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO: 139	B7H6#24 LCCDR1	KASQNVGKYVA
SEQ ID NO:140	B7H6#24 LCCDR2	SASNRYD
SEQ ID NO:141	B7H6#24 LCCDR3	QOYISYPLT
SEQ ID NO:142	B7H6#24 HCCDR1	GYTFTNYWMN
SEQ ID NO:143	B7H6#24 HCCDR2	GIYLSGDSTDYNEKFKG
SEQ ID NO:144	B7H6#24 HCCDR3	RGDYFGDF
SEQ ID NO:145	B7H6#1 VL	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMNCSSQSLFYSSNQKNY LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTD FTLTISSVKAEDLAVYYCQOYYNYPRTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:146	B7H6#1 VH	EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKASGYTFTDYMNWVK QSQGNLEWIAIYIPKTTGGNGYNQKFKDKATLTVDKSS NTAYMELRSLTSDDSAVYYCGRENWDGYTMAYWGQGT STVSS
SEQ ID NO:147	B7H6#2 VL	EIVLTQSPDFLSASPGEKVTMTCRATSSLYSMHWYQQ PGSSPKPWIYATFNLAGVPPARFSGSGSGTSSYSLTITR VEAEDAATYYCQQWSTNPPKLTFFGAGTKLELK
SEQ ID NO:148	B7H6#2 VH	EVQLQQSGAELVLRPGASVKLSCTASGFNIKNTFIHVVN QRPEQGLEWIGRIDPANGNTIYASKFQGRATITTDTS NTAYMHLSSLTSGDTAVYYCARTYGGTNYFDYWGQGT LTVSS
SEQ ID NO:149	B7H6#3 VL	DIVMTQSQKLLSTSVGDRI SVTCKASHNVGVYVAWYQQ KPGHSPKALIHASASNRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT NVQSEDLAEYFCQOYNSYPLTFGAGTKLELI
SEQ ID NO:150	B7H6#3 VH	EVKLVESEGGVLPVPGSSMKLSCTASGFTFSDYMTWVR QVPEKGLEWVGNIDYDGSRIYYLDSLKSRFII SRDNAK NILYLQMNLSKSEDTATYYCARDPAWLAYWGQGT LTVSS
SEQ ID NO:151	B7H6#4 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGKYVAWYQQ KPGQSPKALIYSASNRYDGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIT NVQSEDLTEYFCQOYISYPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:152	B7H6#4 VH	QVQLQQPGSVLVRPGASVRLSCKASGYTFTNYWMNWMK QRPQGQLEWIGGIYLNQDSTDYNEKFKGKATLTVDTSS STTYMDLSSLTYEDSAVYYCTTRGDYFGDFWGQGT LTVSS
SEQ ID NO:153	B7H6#5 VL	AIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDIRNDLGFQQ RPGKAPNLLIYAASSLESVPSRFSGRGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCLQYYNHPLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO:154	B7H6#5 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYIHWVR QAPGQGLEWGMWINPHSGATNYAQNFGQGRVTMTRDTSI STAYMELRSLRSDDAVYYCARERWGSFTFNIWGQGT MVTVSS
SEQ ID NO:155	B7H6#6 VL	DIVMTQSPDPLPVSAGDRVTITCKASQSVSNDVVWYQQ KPGQSPKLLMYSTSNRYIGVPDRFTGSGYGTDFFTIS TVQAEDLAVYFCQDYSSPYTFGGGKLEIK
SEQ ID NO:156	B7H6#6	EVQLQQSGPELLKPGASVKISCKTSGYFTDYTMHWVK

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
	VH	QSHGKSLEWIGGINPNYDNTGYSEKFKDKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCTRSRSRYSFYFDYWGQGT TLTVSS
SEQ ID NO:157	B7H6#7 VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:158	B7H6#7 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYTVSGGSIYNYWSWIR QPPEKGLEWIGHIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLN SVTAADTAVYYCARVGTWGSFDDWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:159	B7H6#8 VL	DIVMTQSPLSLPVTPEGEPASISCRSSQSLLYNNRYNYL DWYLQKPGQSPVLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDFGVYYCMQTLQIPITFGQGT RLEIK
SEQ ID NO:160	B7H6#8 VH	QVQVQSGAEVKKPGSSVKVSKGSGDTLNSYGISWMR QAPGQGLEWMGGIIPIDFTTKYAQKFGQGRVTITADKST TTVYMELSSSLRFEDTAVYYCARERGRYFSEDYFYFGM DVWGQGT TTVTVSS
SEQ ID NO:161	B7H6#9 VL	DIVLTQSPVSLAVSLGQRATISCRASESVDNFGVSMN WFQKPGQPPKLLIYAASNQSGVPPARFSGSGSGTDF LNHPLLEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTRLEIK
SEQ ID NO:162	B7H6#9 VH	QVQLQQPGAEMVRPGSSVKLSCKASDYTFTHYWIHWVK QRPLEGLEWIGIIGPSDNEIHYNQDFKDKATLTVDKSS NTAYLHLNSLTSEDSAVYYCARQIISMVVGTEYFDVWG TGTTTVTVSS
SEQ ID NO:163	B7H6#10 VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYVASSLQRGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS NLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:164	B7H6#10 VH	QVHLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGDISISSYWSWIR QPAGKGLEWIGHIYTSEKNNYPSLKSRTVMSVDTSKN QFSLNLS SVTAADTAVYYCARVGNWGSWDAGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:165	B7H6#11 VL	DIVMTQSPLSLPVTPEGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYL DWYLQKPGQSPQVLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTLPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO:166	B7H6#11 VH	ELQLVNSGGGLVKSGGSLRLSCAASGITFSYTMNWVR QAPGKGLEWVSSISSRYSYIYADSVKGRFTISRDAE NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGDYSKDIYFYGGMD VWGQGT TTVTVSS
SEQ ID NO:167	B7H6#12 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:168	B7H6#12 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFNTYWMNWVK QAPGQGLEWMGGIYLNQDSTDYNEKFKGKATMTVDTST STVYMELSSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:169	B7H6#13 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:170	B7H6#13 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFNTYWMNWVK QAPGQGLEWMGGIYLNQDSTDYNEKFKGKATMTVDTST STVYMELSSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:171	B7H6#14 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:172	B7H6#14 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFNTYWMNWVK QAPGQGLEWIGGIYLNQDSTDYNEKFKGKATMTVDTST STVYMELSSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		VSS
SEQ ID NO:173	B7H6#15 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYYCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:174	B7H6#15 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMNWMR QAPGQGLEWMMGGIYLSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:175	B7H6#16 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYYCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:176	B7H6#16 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWMR QAPGQGLEWMMGGIYLSGESTDYNEKFKGRVTMTVDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:177	B7H6#17 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYYCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:178	B7H6#17 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWMR QAPGQGLEWMMGGIYLSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:179	B7H6#18 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYYCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:180	B7H6#18 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWMR QAPGQGLEWMMGGIYLSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:181	B7H6#19 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYYCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:182	B7H6#19 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVK QAPGQGLEWMMGGIYLSGESTDYNEKFKGKATMTVDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:183	B7H6#20 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYYCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:184	B7H6#20 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVK QAPGQGLEWMMGGIYLSGDSTDYNEKFKGKATMTVDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:185	B7H6#21 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:186	B7H6#21 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWMK QAPGQGLEWIGGIYLSGESTDYNEKFKGKVTMTVDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:187	B7H6#22 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:188	B7H6#22 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWMK QAPGQGLEWIGGIYLSGDSTDYNEKFKGKVTMTVDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRGDYFGDFWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO:189	B7H6#23	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
	VL	KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:190	B7H6#23 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTSYWMNWMK QAPGQGLEWIGGIYLSGESTDYNEKFKGKVTMTVDTST STVYMELSSLRSEDVAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTV VSS
SEQ ID NO:191	B7H6#24 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIK
SEQ ID NO:192	B7H6#24 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTSYWMNWMR QAPGQGLEWMMGGIYLSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTST STVYMELSSLRSEDVAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTV VSS
SEQ ID NO:193	B7H6#1 scFab	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMNCKSSQSLFYSSNQKNY LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTD FTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYNYPRTFGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGK SSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLQQSG PELVKPGTSVKMSCKASGYTFDYMNWVKQSQGNLE WIAIYIPKTTGGNGYNQKFKDKATLTVDKSNTAYMELR SLTSDDSAVYYCGRENWDGYTMAYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSC
SEQ ID NO:194	B7H6#2 scFab	EIVLTQSPDFLSASPGKVTMTCRATSSLYSMHWYQQK PGSSPKPIYATFNLASGVPARFSGSGSGTYSITR VEAEDAATYYCQQWSTNPPKLTFGAGTKLELKRVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSG SESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLQQSGAELVR PGASVKLSCTASGFNIKNTFIHWVNRPEQGLEWIGRI DPANGNTIYASKFQGRATITDTSSNTAYMHLSSLTSG DTAVYYCARTYGGTNYFDYWGQGLTTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPEPKSC
SEQ ID NO:195	B7H6#3 scFab	DIVMTQSQKLLSTSVGDRI SVTCKASHNVGVYVAWYQQ KPGHSPKALIHASASNRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT NVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELIRTVAAAP VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVKLVESEGLVQP GSSMKLSCTASGFTFSDYYMTWVRQVPEKGLEWVGNID YDGSRIYYLDSLKSRFII SRDNAKNILYLQMNLSKSED TATYYCARDPAWLAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQ VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSC
SEQ ID NO:196	B7H6#4 scFab	DIVMTQSQKFMSTSVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGQSPKALIYSASNRYDGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIT NVQSEDLTEYFCQQYISYPLTFGAGTKLELKRVAAP VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		ESKSTEGKSSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQQPGSVLVRP GASVRLSCKASGYTFTNYWMNWMKQRFQGLEWIGGIY LNGDSTDYNEKFKGKATLTVDTSSSTTYMDLSSLTIED SAVYYCTTRGDYFGDFWQGTTLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:197	B7H6#5 scFab	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNDLGFQQ RPGKAPNLLIYAASSLESQVPSRFSGRGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCLQYNNHPLTFGGGKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGS ESKSTEGKSSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCASGYTFTGYIHWVRQAPQGLEWGMWIN PHSGATNYAQNFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDD AAVYYCARERWGSQGFNIWQGTMTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:198	B7H6#6 scFab	DIVMTQSPDSL PVSAGDRVTITCKASQSVSNDVVWYQQ KPGQSPKLLMYSTSNRYIGVPDRFTGSGYGTDFFTTIS TVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGS ESKSTEGKSSSGSGSESKSTGGGGSEVQLQQSGPELLKP GASVKISCKTSGYTFTDYTMHWVKQSHGKSLEWIGGIN PNYDNTGYSEKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED SAVYYCTRSRGSRRSFYFDYWQGTTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:199	B7H6#7 scFab	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGS ESKSTEGKSSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQESGPGLVKP SETLSLTYTVSGGSI SYNYWSWIRQPPEKGLEWIGHIY YSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADT AVYYCARVGTWGSFDDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:200	B7H6#8 scFab	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLYNNRYNYL DWYLQKPGQSPVLIYLGSNRASGVDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDFGVYYCMQTLQIPITFGQGTTRLEIKRT VAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSSGSGSESKSTGGGGSQVQVQSGA EVKKPGSSVKVSCKSGDNLNSYGISWMRQAPQGLEW MGGI IPI FDTTKYAQKFQGRVTITADKSTTTVYMESS LRFEDTAVYYCARERGRFSEDIYFYGMVDVWQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:201	B7H6#9 scFab	DIVLTQSPVSLAVSLGQRATISCRASESVDNFVGSFMN WFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSVGFARFSGSGSGTDFSL LNHPLEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTRLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSS GSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQPGAE MVRPQSSVKLSCKASDYSFTTHYWIHWVKQRPLEGLEWI GIIGPSDNEIHYNQDFKDKATLTVDKSSNTAYLHLNSL TSEDSAVYYCARQIIISMVVGTEYFDVWGTGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:202	B7H6#10 scFab	DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYVASSLQRGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS NLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGGQTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVHLQESGPGLVK SETLSLTCTVSGDSISSYYWSWIRQFAGKGLEWIGHIY TSEKNNYNPSLKSRLVMSVDTSKNQFSLNLSVTAADT AVYYCARVGNWGSHTDAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:203	B7H6#11 scFab	DIVMTQSPSLPVTGPGEFASISCRSSQSLHNSGYNL DWYLQKPGQSPQVLIYLGSNRASGVDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPFTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSS GSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVNSGG GLVKSGSLRLSCAASGITFSYITMNVWRQAPGKGLEW VSSISSRSSYIYADSVKGRFTISRDAENSLYLQMN LRAEDTAVYYCARDKGDYSKDIYIYGMVWVWQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:204	B7H6#12 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFITNYWMNWKQAPGQGLEWVGGIY LNGDSTDYNEKFKGKATMTVDTSTSTVYMELESLRSED TAVYYCTRGRDYFDFWQGTGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:205	B7H6#13 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHK

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYWMNWMKQAPGQGLEWMGGIY LNGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:206	B7H6#14 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTNYWMNWMKQAPGQGLEWIGGIY LNGDSTDYNEKFKGKVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:207	B7H6#15 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTNYWMNWMRQAPGQGLEWMGGIY LSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:208	B7H6#16 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYWMNWMRQAPGQGLEWMGGIY LSGESTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:209	B7H6#17 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYWMNWMRQAPGQGLEWMGGIY LSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:210	B7H6#18 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYWMNWMRQAPGQGLEWMGGIY LSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRGGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:211	B7H6#19 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYWMNWKQAPGQGLEWMGGIY LSGESTDYNEKFKGKATMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRGGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:212	B7H6#20 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYWMNWKQAPGQGLEWMGGIY LSGDSTDYNEKFKGKATMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRGGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:213	B7H6#21 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYWMNWMKQAPGQGLEWIGGIY LSGESTDYNEKFKGKVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRGGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:214	B7H6#22 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCASGYTFTSYWMNWMKQAPGQGLEWIGGIY LSGDSTDYNEKFKGKVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:215	B7H6#23 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCASGYTFTSYWMNWMKQAPGQGLEWIGGIY LSGESTDYNEKFKGKVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:216	B7H6#24 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCASGYTFTNYWMNWMRQAPGQGLEWMMGGIY LSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:217	B7H6#1 цепь	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMNCKSSQSLFYSSNQNY LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTD FTLTISSVKAEDLAVYYCQQYNYPRTFGGGKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGK SSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLQQSG PELVKPGTSVKMSCKASGYTFTDYMNWVKQSQGNLE WIAIYIPKTTGGNGYNQFKDKATLTVDKSSNTAYMELR SLTSDDSAVYYCGRENWDGYTMAYWGQTSVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:218	B7H6#2 цепь	EIVLTQSPDFLSASPEKVTMTCRATSSLYSMHWYQQK PGSSPKPWIYATFNLASGVPARFSGSGSGTYSLTITR VEAEDAATYYCQQWSTNPKLTFGAGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		<p>NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHK  KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSG  SESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLQQSGAELVLR  PGASVKLSCTASGFNIKNTFIHWVNQRPEQGLEWIGRI  DPANGNTIYASKFQGRATITTTDTSSNTAYMHLSSLTSG  DTAVYYCARTYGGTNYFDYWGGTTLTVSSASTKGPSV  FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN  VNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPS  VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH  EALHNHYTQKSLSLSPG</p>
SEQ ID NO:219	B7H6#3 цепь	<p>DIVMTQSQKLLSTSVGDRI SVTCKASHNVGVYVAWYQQ  KPGHSPKALIHASNRYSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIT  NVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELIRTVAAAPS  VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN  ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHK  VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS  ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVKLVESEGLVQP  GSSMKLSCTASGFTFSDYYMTWVRQVPEKGLEWVGNID  YDGSRIYYLDSLKSRFII SRDNAKNILYLQMNLSKSED  TATYYCARDPPAWLAYWGQTLVTVSSASTKGPSVFPL  APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH  KPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL  FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE  EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL  HNHYTQKSLSLSPG</p>
SEQ ID NO:220	B7H6#4 цепь	<p>DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGKYVAWYQQ  KPGQSPKALIYASNRYDGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIT  NVQSEDLTEYFCQQYISYPLTFGAGTKLELKRVAAPS  VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN  ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHK  VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS  ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQQPGSVLVRP  GASVRLSCKASGYTFTNYWMNWMKQRPQGLEWIGGIY  LNGDSTDYNEKFKGKATLTVDTSSSTTYMDLSSLTIED  SAVYYCTTRGDYFGDFWGQTTTLTVSSASTKGPSVFPL  APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH  KPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL  FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE  EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL  HNHYTQKSLSLSPG</p>
SEQ ID NO:221	B7H6#5 цепь	<p>AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNDLGFQQ  RPGKAPNLLIYAASSLESQVPSRFSGRGSGTDFTLTIS  SLQPEDFATYYCLQYNNHPLTFGGGKVEIKRTVAAPS  VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN  ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHK</p>

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTGYIHWVRQAPGQGLEWGWIN PHSGATNYAQNFGQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDD AAVYYCARERWGSFTFNIWGQTMVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:222	B7H6#6 цепь	DIVMTQSPDLSLPVSAAGDRVTITCKASQSVSNDVWVYQQ KPGQSPKLLMYSTSNRYIGVPRDFTGSGYGTDFFTTIS TVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLQQSGPELLKP GASVKISCKTSGYTFTDYMHWVKQSHGKSLIEWIGGIN PNYDNTGYSEKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED SAVYYCTRSGSRRSFFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:223	B7H6#7 цепь	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISWLAWAYQQ KPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQANSFPRTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQESGPGLVKP SETLSLTYTVSGGSI SYNYWSWIRQPEKGLEWIGHIY YSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNVSVAADT AVYYCARVGTWGSFDDWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:224	B7H6#8 цепь	DIVMTQSPPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLYNNRYNYL DWYLQKPGQSPVLIYLGSRASGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDFVYYCMQTLQIPITFGQTRLEIKRT VAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSS

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		SSGSGSESKSTEGKSSSGSGSESKSTGGGGSQVQVQVQSGA EVKKPGSSVKVSCCKGSGDTLNSYGI SWMRQAPGQGLEW MGGI I P I F D T T K Y A Q K F Q G R V T I T A D K S T T T V Y M E L S S L R F E D T A V Y Y C A R E R G Y R F S E D Y Y F Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
SEQ ID NO:225	B7H6#9 цепь	D I V L T Q S P V S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D N F G V S F M N W F Q Q K P G Q P P K L L I Y A A S N Q G S G V P A R F S G S G S G T D F S L N I H P L E E D D T A M Y F C Q Q S K E V P W T F G G G T R L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C G G G G S E G K S S G S G S E S K S T E G K S S G S G S E S K S T G G G G S Q V Q L Q Q P G A E M V R P G S S V K L S C K A S D Y T F T H Y W I H W V K Q R P L E G L E W I G I I G P S D N E I H Y N Q D F K D K A T L T V D K S S N T A Y L H L N S L T S E D S A V Y Y C A R Q I I S M V V G T E Y F D V W G T G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
SEQ ID NO:226	B7H6#10 цепь	D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y V A S S L Q R G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S N L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S F P R T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C G G G G S E G K S S G S G S E S K S T E G K S S G S G S E S K S T G G G G S Q V H L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G D S I S S Y Y W S W I R Q P A G K G L E W I G H I Y T S E K N N Y N P S L K S R V I M S V D T S K N Q F S L N L S S V T A A D T A V Y Y C A R V G N W G S H D A W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
SEQ ID NO:227	B7H6#11 цепь	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L H S N G Y N Y L D W Y L Q K P G Q S P Q V L I Y L G S N R A S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T P L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C G G G G S E G K S S G S G S E S K S T E G K S S G S G S E S K S T G G G G S E L Q L V N S G G

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		GLVKSGGSLRLSCAASGITFSYYTMNWVRQAPGKGLEW VSSISSRSSYIYYADSVKGRFTISRDNNAENSLYLQMN LRAEDTAVYYCARDKGDYSKDIYYYYGMDVWGQGT VTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCD KTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
SEQ ID NO:228	B7H6#12 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAVYQ QKPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTL TISLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSE GKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPKP GASVKVSCKASGYTFITNYWMNWVKQAPGQGLEW MGGIYLNGDSTDYNEKFKGKATMTVDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCTRGGDYFGDFWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPK SCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:229	B7H6#13 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAVYQ QKPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTL TISLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSE GKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPKP GASVKVSCKASGYTFITSYWMNWMKQAPGQGLEW MGGIYLNGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCTRGGDYFGDFWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPK SCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:230	B7H6#14 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAVYQ QKPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTL TISLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSE GKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPKP GASVKVSCKASGYTFITNYWMNWMKQAPGQGLEW IGGIY

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		LNGDSTDYNEKFKGKVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:231	B7H6#15 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTNYWMNWMRQAPGQGLEWMGGIY LSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:232	B7H6#16 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYWMNWMRQAPGQGLEWMGGIY LSGESTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:233	B7H6#17 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYWMNWMRQAPGQGLEWMGGIY LSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:234	B7H6#18 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFSTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGGIY LSGDSTDYNEKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:235	B7H6#19 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFSTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGGIY LSGESTDYNEKFKGKATMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:236	B7H6#20 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFSTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGGIY LSGDSTDYNEKFKGKATMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:237	B7H6#21 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFITSYWMNWMMKQAPGQGLEWIGGIY LSGESTDYNEKFKGKVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:238	B7H6#22 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFITSYWMNWMMKQAPGQGLEWIGGIY LSGDSTDYNEKFKGKVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:239	B7H6#23 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFITSYWMNWMMKQAPGQGLEWIGGIY LSGESTDYNEKFKGKVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRRGDYFGDFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:240	B7H6#24 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGKYVAWYQQ KPGKAPKSLIYSASNRYDAVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFTTYCQQYISYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFITNYWMNWMRQAPGGLEWMMGGIY LSGDSTDYNEKFKGRVMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRGGDYFGDFWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:241	Домен Fc * (IgG1)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:242	Домен Fc W (IgG1, LALA)	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:243	Домен Fc, SAV (IgG1, RF/LALA)	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:244	Домен Fc (IgG4Pro)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSL G
SEQ ID NO:245	Домен Fc W (IgG4Pro)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSL G
SEQ ID NO:246	Домен Fc SAV	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT



Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
	HCCDR1	
SEQ ID NO:273	CD3#3 HCCDR2	WIYPGGGNIKYAQKFQG
SEQ ID NO:274	CD3#3 HCCDR3	DQYSAYYFAY
SEQ ID NO:275	CD3#4 LCCDR1	KSSQSLNLSRTRKVYLA
SEQ ID NO:276	CD3#4 LCCDR2	WASTRES
SEQ ID NO:277	CD3#4 LCCDR3	KQSFILRT
SEQ ID NO:278	CD3#4 HCCDR1	GYSFTSYVVH
SEQ ID NO:279	CD3#4 HCCDR2	WIYPGGGNIKYNQKFQG
SEQ ID NO:280	CD3#4 HCCDR3	DHYSAYYFAY
SEQ ID NO:281	CD3#5 LCCDR1	KSSQSLNLSRTRKTYLA
SEQ ID NO:282	CD3#5 LCCDR2	WASTRES
SEQ ID NO:283	CD3#5 LCCDR3	KQSFILRT
SEQ ID NO:284	CD3#5 HCCDR1	GYTFTGYVVH
SEQ ID NO:285	CD3#5 HCCDR2	WIYPGGGSTKYAQKFQG
SEQ ID NO:286	CD3#5 HCCDR3	DQYSAYYFAY
SEQ ID NO:287	CD3#6 LCCDR1	KSSQSLNLSRTRKTYLA
SEQ ID NO:288	CD3#6 LCCDR2	WASTRES
SEQ ID NO:289	CD3#6 LCCDR3	KQSFILRT
SEQ ID NO:290	CD3#6 HCCDR1	GYTFTSYVVH
SEQ ID NO:291	CD3#6 HCCDR2	WIYPGGGNIKYAQKFQG
SEQ ID NO:292	CD3#6 HCCDR3	DQYSAYYFAY
SEQ ID NO:293	CD3#1 VL	EAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:294	CD3#1 VH	EVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY WGQGLVTVSA
SEQ ID NO:295	CD3#2 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYCKQSFILRTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:296	CD3#2 VH	QVQLVQSGAEVVKKPGASVKVSKASGYSFTDYVHWVR QAPGQGLEWMGWIYPGNNGIKYNERFRGRVTMTRDTS STVYMEISSLRSEDTAVYYCARDNYSAYYFAYWGQGT VTVSS
SEQ ID NO:297	CD3#3 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKVY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYCKQSFILRTFGQGTKLEIK

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
SEQ ID NO:298	CD3#3 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTSYYVHWVR QAPGQGLEWIGWIYPGGGNIKYAQKFQGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYYCARDQYSAYYFAYWGQGT VTVSS
SEQ ID NO:299	CD3#4 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKVV LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSSLQAEDVAVYYCKQSFILRTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:300	CD3#4 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYYVHWVR QAPGQGLEWIGWIYPGGGNIKYNQKFQGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYYCARDHYSAYYFAYWGQGT VTVSS
SEQ ID NO:301	CD3#5 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSRTRKTY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSSLQAEDVAVYYCKQSFILRTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:302	CD3#5 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVHWVR QAPGQGLEWIMGWIYPGGGSTKYAQKFQGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYYCARDQYSAYYFAYWGQGT VTVSS
SEQ ID NO:303	CD3#6 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSRTRKTY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSSLQAEDVAVYYCKQSFILRTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:304	CD3#6 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVHWVR QAPGQGLEWIGWIYPGGGNIKYAQKFQGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYYCARDQYSAYYFAYWGQGT VTVSS
SEQ ID NO:305	CD3#1 scFab	EAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWK ADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECSSGGGSEGKSSGSG SESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSAAS TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:306	CD3#2 scFab	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSSLQAEDVAVYYCKQSFILRTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGA EVKPKPGASVKVSCKASGYFTDYVHWVRQAPGQGLEW MGWIYPGNIGNIKYNERFRGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDVAVYYCARDNYSAYYFAYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:307	CD3#3 scFab	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKVV LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSSLQAEDVAVYYCKQSFILRTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGA

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		EVKKPGASVKVSCASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEW IGWIYPGGGNIKYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARDQYSAYYFAYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:308	CD3#4 scFab	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKVV LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSSLQAEDVAVYYCKQSFILRRTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEW IGWIYPGGGNIKYNQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARDHYSAYYFAYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:309	CD3#5 scFab	DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCKSSQSLNLSRTRKTY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSSLQAEDVAVYYCKQSFILRRTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCASGYTFTGYVHWVRQAPGQGLEW MGWIYPGGGSTKYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARDQYSAYYFAYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:310	CD3#6 scFab	DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCKSSQSLNLSRTRKTY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSSLQAEDVAVYYCKQSFILRRTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEW IGWIYPGGGNIKYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARDQYSAYYFAYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:311	CD3#1 цепь	EAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLGGAALTL LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWK ADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPAQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECSSGGGSEGKSSGSG SESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSAAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPCCPAPE

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:312	CD3#2 цепь	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCKQSFILRRTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGA EVKPKGASVKVCKASGYSFTDYVHWVRQAPGQGLEW MGWIYPGNIGNIKYNERFRGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARDNYSAYYFAYWGQGTITVTVSSASTK GPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:313	CD3#3 цепь	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKVY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCKQSFILRRTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGA EVKPKGASVKVCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEW IGWIYPGGGNIKYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARDQYSAYYFAYWGQGTITVTVSSASTK GPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:314	CD3#4 цепь	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKVY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCKQSFILRRTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGA EVKPKGASVKVCKASGYSFTSYVHWVRQAPGQGLEW IGWIYPGGGNIKYNQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARDHYSAYYFAYWGQGTITVTVSSASTK GPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
		KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:315	CD3#5 цепь	DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCKSSQSLLSRTRKTY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCKQSFILRTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGA EVKPKPGASVKVCKASGYTFTGYYVHWVRQAPGQGLEW MGWIYPGGGSTKYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARDQYSAYYFAYWGQGTITVTVSSASTK GPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:316	CD3#6 цепь	DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCKSSQSLLSRTRKTY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCKQSFILRTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGA EVKPKPGASVKVCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEW IGWIYPGGGNIKYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARDQYSAYYFAYWGQGTITVTVSSASTK GPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNRFTQKSLSLSPG

### Пример 3: Создание рекомбинантных белков

#### • Человеческий B7H6-His

5      Полный внеклеточный домен человеческого B7H6 экспрессировали с помощью метки His6 с использованием вектора pTT (кодирующего человеческий B7H6-His, SEQ ID NO: 317) путем транзиторной трансфекции с использованием лентивирусной системы Lenti-X™ (Clontech). Клетки НЕК 293F (Thermo Fisher) использовали в концентрации  $1,6 \times 10^6$  клеток/мл во время трансфекции в экспрессионной среде Gibco™ Freestyle™ F17 (Thermo Fisher Scientific).

Комплекс DNA:PEI в соотношении 1:3 и 1 мг/л ДНК предварительно инкубировали в течение 5 минут, фильтровали и предварительно инкубировали при комнатной температуре еще 15 минут перед добавлением к клеткам. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и встряхивании при 140 об/мин. Через 24 часа после трансфекции к клеткам добавляли Tryptone N1 до конечной концентрации 0,5%. Клетки снова подпитывали через 48 часов после трансфекции с 2 мМ глутамина и 2 г/л глюкозы. При этом температура была снижена до 33°C. Последнюю подпитку добавляли через 120 часов после трансфекции с 2 мМ глутамина и 1 г/л глюкозы. Клетки собирали через 144 часа после трансфекции путем центрифугирования при 6000 об/мин в течение 15 минут. Супернатант осветляли с помощью фильтра G4.

Очистку белков проводили в две стадии. Сначала для аффинной хроматографии использовали колонку Ni-NTA с промывочным буфером 1x PBS, pH 7,2 + 10 мМ имидазола для 10 CV, затем промывочным буфером 1x PBS, pH 7,2 + 20 мМ имидазола для 10 CV и градиентом элюирования 4-60% 1x PBS, pH 7,2 с добавлением 0,5М имидазола. Фракции собирали и анализировали с помощью SDS-PAGE перед объединением и концентрированием. Во-вторых, для гель-фильтрационной хроматографии использовали колонку Superdex® 200, 16/600, 120 мл (GE Healthcare Life Sciences). Концентрированный пул после аффинной хроматографии, 5 мл, загружали на колонку со скоростью потока 0,5 мл/мин. Буфер состава представлял собой 20 мМ HEPES, 100 мМ NaCl, 5% сахарозы, pH 7,4. Фракции собирали и анализировали с помощью SDS-PAGE перед объединением, а затем стерилизовали с использованием фильтра 0,2 мкм.

#### • Цино В7Н6-His

Полный внеклеточный домен Цино-В7Н6 экспрессировали с меткой His6 с использованием вектора рТТ (кодирующего Цино В7Н6-His, SEQ ID NO: 320) путем транзитной трансфекции с использованием лентивирусной системы Lenti-X™ (Clontech). Клетки НЕК 293F (Thermo Fisher) использовали в концентрации  $1,6 \times 10^6$  клеток/мл во время трансфекции в экспрессионной среде Gibco™ Freestyle™ F17 (Thermo Fisher Scientific). Комплекс DNA:PEI в соотношении 1:3 и 1 мг/л ДНК предварительно инкубировали в течение 5 минут, фильтровали и предварительно инкубировали при комнатной температуре еще 15 минут перед добавлением к клеткам. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

и встряхивании при 140 об/мин. Через 24 часа после трансфекции к клеткам добавляли Tryptone N1 до конечной концентрации 0,5%. Клетки снова подпитывали через 48 часов после трансфекции с 2 мМ глутамина и 2 г/л глюкозы. При этом температура была снижена до 33°C. Последнюю подпитку добавляли через 120 часов после трансфекции с 2 мМ глутамина и 1 г/л глюкозы. Клетки собирали через 144 часа после трансфекции путем центрифугирования при 6000 об/мин в течение 15 минут. Супернатант осветляли с помощью фильтра G4.

Очистку белков проводили в две стадии. Во-первых, колонку Ni-NTA использовали для аффинной хроматографии с промывочным буфером 1x PBS, 0,2 М сахарозы, 0,01% CHAPS, 5% глицерина, pH 7,2, + 10 мМ имидазола для 10 CV, затем промывочным буфером 1x PBS, pH 7,2 + 20 мМ имидазола для 10 CV, и градиент элюирования 4-60% 1x PBS, 0,2 М сахарозы, 0,01% CHAPS, 5% глицерина, pH 7,2 с добавлением 0,5 М имидазола. Фракции собирали и анализировали с помощью SDS-PAGE перед объединением и концентрированием. Во-вторых, Superdex® 200, 16/600 использовали для гель-фильтрационной хроматографии (GE Healthcare Life Sciences). Концентрированный пул после аффинной хроматографии, 10 мл, загружали на колонку со скоростью потока 1,0 мл/мин. Буфер состава представлял собой 1X PBS, 0,2 М сахарозы, 0,01% CHAPS, 5% глицерина, pH 7,2. Фракции собирали и анализировали с помощью SDS-PAGE перед объединением, а затем стерилизовали с использованием фильтра 0,2 мкм.

• Человеческий CD3 E+G HuFc-6xHis (E+G указывает субъединицы  $\epsilon\gamma$ )

Линию клеток для продукции человеческого CD3 E+G HuFc-6xHis получали с использованием клеток HEK-293 (Thermo Fisher), лентивирусной системы Lenti-X™ (Clontech) и плазмиды, кодирующей человеческий CD3 E+G HuFc-6xHis (человеческий CD3E номер доступа P07766; человеческий CD3E+G-HuFc-His: SEQ ID NO:322). Для экспрессии клетки культивировали и размножали в среде Freestyle™ 293 (Thermo Fisher Scientific), при 37°C, увлажненной среде с 8% CO<sub>2</sub> и встряхивании при 135 об/мин. Кондиционированный культуральный супернатант собирали на 6-й день центрифугированием в течение 30 минут при 9300 xg. Экспрессию контролировали с помощью SDS-PAGE и Western Blotting. Кондиционированный

культуральный супернатант доводили посредством 0,2 М сахарозы, 5% глицерина, 0,01% CHAPS и 10 мМ имидазола. Затем pH доводили до 7,2.

Очистку проводили в две стадии: аффинная очистка с использованием смолы Ni/NTA (инкубация в течение ночи при 4°C и элюирование с 250 мМ

5 имидазола); с последующей эксклюзионной хроматографией на колонке Superdex® 200 (GE Healthcare Life Sciences) в целевом буфере PBS с 0,2 М сахарозы, 5% глицерина, 0,01% CHAPS, 1 мМ ТСЕР, pH 7,2. Объединенный материал концентрировали с использованием устройства центрифугирования 10K MWCO PES с мембраной Vivacell® 100 перед окончательным анализом и  
10 хранением. Очищенный материал был квалифицирован масс-спектрометрией и аналитическим ультрацентрифугированием.

• Цино CD3 E+G HuFc-6xHis (E+G указывает субъединицы  $\epsilon\gamma$ )

Линию клеток для продукции Цино CD3 E+G HuFc-6xHis получали с использованием клеток НЕК-293 (Thermo Fisher), лентивирусной системы Lenti-X™ (Clontech) и плазмиды, кодирующей Цино CD3 E+G HuFc-6xHis  
15 (Циномолгус CD3E номер доступа: Q95LI5 <, цино CD3 E+G huFc-His: SEQ ID NO:323). Для экспрессии клетки культивировали и размножали в среде Freestyle™ 293 (Thermo Fisher Scientific), при 37°C, увлажненной среде с 8% CO<sub>2</sub>, и встряхивании при 135 об/мин. Кондиционированный культуральный  
20 супернатант собирали на 6-й день центрифугированием в течение 30 минут при 9300 xg. Экспрессию контролировали с помощью SDS-PAGE и Western Blotting. Кондиционированный культуральный супернатант доводили посредством 0,2 М сахарозы, 5% глицерина, 0,01% CHAPS, и 10 мМ имидазола. Затем pH доводили до 7,2. Очистку проводили в две стадии: аффинная очистка с использованием  
25 смолы Ni/NTA (инкубация в течение ночи при 4°C и элюирование с 250 мМ имидазола); с последующей эксклюзионной хроматографией на колонке Superdex® 200 (GE Healthcare Life Sciences) в целевом буфере PBS с 0,2 М сахарозы, 5% глицерина, 0,01% CHAPS, 1 мМ ТСЕР, pH 7,2. Объединенный материал концентрировали с использованием устройства центрифугирования  
30 10K MWCO PES с мембраной Vivacell® 100 перед окончательным анализом и хранением. Очищенный материал был квалифицирован масс-спектрометрией и аналитическим ультрацентрифугированием.

• Fc-His-меченный В7Н6 ЕСD человека

В этой конструкции за huB7H6 ECD следует линкер GS, затем домен huIgG1-Fc и С-концевая метка His6 (SEQ ID NO:318). Конструкцию экспрессировали путем транзитной трансфекции с использованием клеток НЕК293-6Е, с соотношением DNA:PEI 1:3 и 1 мг ДНК на л культуры. Реагент PEI представлял собой линейный PEI MAX [Mw 40,000] (Polysciences: Cat# 24765-2). Трансфицированные клетки инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> и 130 об/мин. Через 24 часа после трансфекции добавляли tryptone N1 (Organotechnie; кат. № 19553) и глюкозу до конечной концентрации 0,5% и 1 г/л соответственно. Клетки собирали через 5 дней. После центрифугирования супернатант фильтровали через мембранный фильтр 0,2 мкм. Белок huB7H6-ECD-Fc-His очищали в две стадии: сначала по аффинности на матрице Ni NTA Agarose, а затем гель-фильтрацией с использованием колонки Superdex® 200, 26/600 (GE Healthcare Life Sciences). Объединенные фракции фильтровали и хранили в 1 x PBS, 0,2 М сахарозы, 5% глицерина, 0,01% CHAPS, буфере для составов с pH 7,2.

• Fc-His-меченый Ala-мутированный B7H6 ECD человека (участки взаимодействия NKp30 aa35-38 и aa102-105 замененные на Ala).

Эта конструкция (SEQ ID NO:319) имеет huB7H6 с заменами Ala в положениях 35-38 и 102-105, поэтому она не связывает NKp30. За huB7H6-Ala-ECD следует линкер GS, затем домен huIgG1Fc и С-концевая метка His6. Эту конструкцию экспрессировали в клетках НЕК293-6Е путем транзитной трансфекции, очищали в процессе двухстадийной очистки и хранили, как описано выше для конструкции huB7H6-ECD, меченной Fc-His.

• B7H1-Fc человека

Эта конструкция (SEQ ID NO:324) содержит huB7H1 с меткой cMyc, участком расщепления тромбином и домен huFc. Конструкцию экспрессировали транзитной трансфекцией с использованием клеток НЕК293f, соотношение DNA:PEI 1:1,5 и 1 мг ДНК на л культуры. Колбы инкубировали при 37°C во влажной среде с 8% с CO<sub>2</sub> при встряхивании со скоростью 135 об/мин. Клетки собирали через 3 дня. После центрифугирования клеток белок очищали от супернатанта. Сначала проводили аффинную очистку с использованием среды nProtein A Sepharose® 4 Fast Flow (GE Healthcare, #17-5280-03), а элюат подвергали диализу в 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 10% глицерине, 1 mM ТСЕР, 3

мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0. Во-вторых, образец инкубировали со смолой Thrombin CleanCleave™ (1 мл, Sigma). В-третьих, пул с предыдущей стадии снова связывали со средой nProtein A Sepharose® 4 Fast Flow. Несвязанный материал сохраняли, дополнительно очищали гель-фильтрацией на колонке Superdex® 75 (GE Healthcare), уравновешенной в PBS, 1 мМ ТСЕР, pH буфера 7,2 и концентрировали.

Пример 4: Определение сродства с рекомбинантным  $\epsilon\gamma$  субъединицами В7Н6 и CD3 и межвидовой перекрестной реакционной способности на основе SPR

Для определения сродства В7Н6 человека и цино и В7Н1 человека с белками, связывающими В7Н6/CD3, эксперимент проводили на приборе Biacore™ 8К (GE Healthcare Life Sciences). Вкратце, белок, связывающий В7Н6/CD3, был захвачен с помощью белка А/Г. Подвижный буфер для этого эксперимента и все серийные разведения готовили в HBS-EP+. Сенсорный чип CM5 активировали равной смесью EDC/NHS в обеих проточных кюветах в течение 420 с при скорости потока 10 мкл/мин и иммобилизовали рекомбинантным белком А/Г (50 мкг/мл в 10 мМ NaOAc, pH 4,5) во всех проточных кюветах в течение 420 с при скорости потока 10 мкл/мин, в результате чего на поверхности образуется около 2500 RU белка А/Г.

Сенсорный чип дезактивировали 1М раствором этаноламина-HCl во всех проточных кюветах в течение 420 с при скорости потока 10 мкл/мин.

Приблизительно 700 RU белка, связывающего В7Н6/CD3 было захвачено на проточной кювете 2 поверхности белка А/Г в течение 60 с при скорости потока 10 мкл/мин. Аналиты HuВ7Н6, СуВ7Н6 и HuВ7Н1 вводили через обе проточные ячейки поверх захваченного связывающего белка В7Н6/CD3 в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин с диссоциацией 1200 с. Концентрации HuВ7Н6 и СуВ7Н6 составляли 0 нМ, 6,25 нМ, 12,5 нМ, 25 нМ, 50 нМ и 100 нМ. Концентрации HuВ7Н1 составляли 0 нМ и 1 мкМ. Поверхность регенерировали путем введения 10 мМ глицин-HCl, pH 1,5, в течение 20 с при скорости потока 30 мкл/мин через обе проточные кюветы.

Эталонная проточная кювета 1 (взаимодействие с поверхностью сенсора) и холостой анализ (HBS-EP+ или 0 нМ аналита) вычитали из исходных данных. Используя оценочное программное обеспечение Biacore™ 8К, сенсограммы

были глобально согласованы со связыванием Ленгмюра 1:1, чтобы получить значения константы скорости ассоциации ( $k_a$ ), константы скорости диссоциации ( $k_d$ ) и константы равновесной диссоциации ( $KD$ ).

Для определения аффинности связывающего белка В7Н6/CD3 к CD3E+G-hFc человека и яванского макака эксперимент проводили на приборе Bio-Rad ProteOn™ XPR36. Вкратце, HuCD3E+G-hFc и CyCD3E+G связывали с амином на сенсорном чипе ProteOn™ GLM (Bio-Rad) и белок, связывающий В7Н6/CD3, пропускали через иммобилизованную поверхность. Подвижный буфер для этого эксперимента и все серийные разведения готовили в HBS-EP+. Чип датчика GLM был нормализован в соответствии с рекомендациями Bio-Rad's. Сенсорный чип активировали равной смесью EDC/s-NHS в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин. HuCD3E+G-hFc иммобилизовали в вертикальном направлении в концентрациях 0,4 мкг/мл, 0,2 мкг/мл и 0,1 мкг/мл в 10 мМ ацетата pH 4,5 до L1, L2 и L3, соответственно в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин, что дает приблизительно 100 RU HuCD3E+G-hFc на L1, 40 RU HuCD3E+G-hFc на L2 и 0 RU HuCD3E+G-hFc на L3. CyCD3E+G-hFc иммобилизовали в вертикальном направлении в концентрациях 0,4 мкг/мл, 0,2 мкг/мл и 0,1 мкг/мл в 10 мМ ацетате pH 4,5 до L4, L5 и L6 соответственно в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин, что дает приблизительно 385 RU HuCD3E+G-hFc на L4, 170 RU CyCD3E+G-hFc на L5 и 50 RU CyCD3E+G-hFc на L6. Сенсорный чип дезактивировали 1М раствором этаноламин-HCl в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин. Сенсорный чип регенерировали 18 с 0,85% фосфорной кислотой при скорости потока 100 мкл/мин. 2 раза по горизонтали и 2 раза по вертикали.

Аналит белка, связывающего В7Н6/CD3, вводили горизонтально над иммобилизованной поверхностью в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин с диссоциацией 600 с. Используемые концентрации белка, связывающего В7Н6/CD3, составляли 0 нМ, 1,2 нМ, 3,7 нМ, 11,1 нМ, 33,3 нМ и 100 нМ. Поверхность регенерировали введением 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 с со скоростью потока 100 мкл/мин 2 раза по горизонтали.

Промежутки между пятнами (взаимодействия с поверхностью сенсора) и холостой анализ (HBS-EP+ или 0 нМ аналита) вычитали из необработанных

данных. С помощью программного обеспечения Bio-Rad ProteOn™ Manager, сенсограммы в целом соответствовали связыванию Ленгмюра 1:1, чтобы получить значения константы скорости ассоциации ( $k_a$ ), константы скорости диссоциации ( $k_d$ ) и константы равновесной диссоциации ( $KD$ ).

5           Аффинности, определенные, как описано выше, показаны для типичных белков, связывающих В7Н6/CD3 (белки, связывающие В7Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и  
10           цепь CD3 SEQ ID NO:311 и белки, связывающие В7Н6, содержащие цепь В7Н6 SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315, или SEQ ID NO:316, соответственно) в Таблице 2.

          Таблица 2: Сродство ( $KD$ ) белков, связывающих В7Н6/CD3 с  $\epsilon\gamma$   
15           субъединицами humanВ7Н6, cyноВ7Н6, humanCD3,  $\epsilon\gamma$  субъединицами cyноCD3  $\epsilon$  и humanВ7Н1, как определено анализом SPR. Отсутствие обнаруживаемого связывания обозначается «нс».

В7Н6 связывающая молекула	CD3 связывающая молекула	huВ7-Н6 [нМ]	cyВ7-Н6 [нМ]	cy/hu В7-Н6	huCD3 [нМ]	cyCD3 [нМ]	cy/hu CD3	huВ7-Н1
В7Н6#12	CD3#1	1.1	2.3	2.1	3.6	2.5	0.7	нс при 1 мкМ
В7Н6#13	CD3#1	3.0	4.6	1.5	4.1	2.8	0.7	нс при 1 мкМ
В7Н6#14	CD3#1	0.1	0.6	5.9	4.2	2.7	0.6	нс при 1 мкМ
В7Н6#15	CD3#1	0.8	2.2	2.8	3.8	2.6	0.7	нс при 1 мкМ
В7Н6#16	CD3#1	3.1	7.2	2.3	3.7	2.6	0.7	нс при 1 мкМ
В7Н6#17	CD3#1	8.7	8.4	1.0	13.5	3.7	0.3	нс при 1 мкМ
В7Н6#18	CD3#1	1.4	3.3	2.3	3.9	2.8	0.7	нс при 1 мкМ
В7Н6#19	CD3#1	1.6	5.1	3.1	4.0	2.4	0.6	нс при 1 мкМ
В7Н6#20	CD3#1	1.1	4.9	4.6	4.0	2.6	0.7	нс при 1 мкМ
В7Н6#21	CD3#1	3.3	1.4	0.4	4.4	2.7	0.6	нс при 1 мкМ
В7Н6#22	CD3#1	1.5	1.4	1.0	5.1	2.8	0.5	нс при 1 мкМ
В7Н6#23	CD3#1	1.3	1.2	0.9	5.5	2.7	0.5	нс при 1 мкМ

В7Н6 связывающая молекула	CD3 связывающая молекула	huB7- Н6 [нМ]	cyB7- Н6 [нМ]	cy/hu B7- Н6	huCD3 [нМ]	cyCD3 [нМ]	cy/hu CD3	huB7-Н1  мкМ
В7Н6#24	CD3#1	1.8	3.1	1.7	7.8	3.3	0.4	нс при 1 мкМ
В7Н6#14	CD3#2	1.2	1.0	0.9	16.9	17.7	1.0	нс при 1 мкМ
В7Н6#14	CD3#3	1.1	1.1	0.9	4.8	7.1	1.5	нс при 1 мкМ
В7Н6#14	CD3#4	1.3	1.1	0.8	7.6	8.5	1.1	нс при 1 мкМ
В7Н6#14	CD3#5	0.9	1.0	1.1	4.3	5.2	1.2	нс при 1 мкМ
В7Н6#14	CD3#6	0.4	0.9	2.1	4.1	5.7	1.4	нс при 1 мкМ
В7Н6#23	CD3#2	1.9	2.0	1.1	10.4	10.0	1.0	нс при 1 мкМ
В7Н6#23	CD3#3	2.2	1.9	0.9	13.8	11.9	0.9	нс при 1 мкМ
В7Н6#23	CD3#4	1.7	1.7	1.0	3.8	3.6	0.9	нс при 1 мкМ
В7Н6#23	CD3#5	2.2	1.9	0.9	2.8	3.7	1.3	нс при 1 мкМ
В7Н6#23	CD3#6	1.9	2.0	1.1	3.4	3.9	1.2	нс при 1 мкМ

нс: нет связывания

Пример 5: Получение рекомбинантных клеточных линий CHO-K1, экспрессирующих внеклеточный домен В7Н6 яванского макака на клеточной поверхности

Для получения стабильных клеток CHO-K1, экспрессирующих внеклеточный домен яванского макака В7Н6 (NCBI: XP\_005578557) на клеточной поверхности, соответствующую кодирующую последовательность (aa 25 - 262 XP\_005578557.1) клонировали в pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific). Конструкция содержит N-концевую ведущую последовательность V<sub>k</sub> мышиного IgG, за которой следует метка 6-His-тис и внеклеточный домен В7Н6 яванского макака (aa25-262 NCBI XP\_005578557.1). Для обеспечения локализации внеклеточного домена В7Н6 на клеточной поверхности за конструкцией следовал линкер, а также трансмембранный и внутриклеточный домены ЕрСАМ (UniProt P16422). Для обеспечения локализации внеклеточного домена В7Н6 на клеточной поверхности за конструкцией следовал линкер, а также трансмембранный и внутриклеточный домены тис (AbD Serotec). Используемые

последовательности перечислены в Таблице 3, схематическое изображение конструкций показано на Фигуре 2.

Таблица 3: Аминокислотные последовательности субдоменов В7Н6, экспрессируемых на клетках CHO-K1

Название	Последовательность
Лидер Vк	METDTLLLWVLLLWVPGSTGD (SEQ ID NO:325)
Метка 6-His-мус	HHHHHNEQKLISEEDL (SEQ ID NO:326)
Внеклеточный домен яванского макака В7-Н6 (NCBI XP_005578557.1, aa25-262)	DLKVEMMARGIQATRLNDSVTISCKVIYSQPLNITSMGIT WFRKSLTLDKEVKVFEFFGDHQAFRPGANVSLWRLKS GDASLKLPGVQLEEAGEYRCEVVVTPPKAQQTVQLKVV ASPTSRLFQDQAVVKENEGKYMCESSRFYPKDINITWEK WTQKSPHHVVISENVITGPTIKNMDGTFNITSYLKLNSSQ EDPGTVYRCVIRHESLHTPVSIDFILTAQQSLSEPEKTDIF S (SEQ ID NO:327)
Линкер	SGGGGS (SEQ ID NO:328)
Трансмембранный домен ЕрСАМ человека (Uniprot P16422, aa266-288)	AGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVI (SEQ ID NO:329)
Внутриклеточный домен ЕрСАМ человека (Uniprot P16422, aa289-314)	SRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA (SEQ ID NO:330)

5

Пример 6: Связывание примерных белков, связывающих В7Н6 с рекомбинантными белками внеклеточного домена В7Н6 человека

Для оценки связывания белков, связывающих В7Н6/CD3, с рекомбинантным ВКД В7Н6, меченным Fc-His человека Ala-мутированных В7Н6 внеклеточные белки, как описано в Примере 3, планшеты MediSorp™ (Nunc, 467320) покрывали посредством 2 мкл/мл рекомбинантных белков в течение ночи при 4 °С. На следующий день планшеты блокировали 0,5% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). Затем планшеты промывали раствором OBS, содержащим 0,05% вязкой жидкости TWEEN®20, и связывающие белки В7Н6/CD3 инкубировали в концентрациях от 0,00001 до 10 мкг/мл. После стадии дополнительной промывки связывание белков, связывающих В7Н6/CD3, обнаруживали с помощью конъюгированного с пероксидазой вторичного антитела козы против человеческого IgG F(ab')<sub>2</sub>-специфического вторичного антитела (Jackson Immunoresearch) и визуализировали с помощью раствора субстрата ТМВ (Bender Med Systems). На Фигурах 3А+В и 4А+В показано связывание примерных связывающих белков В7Н6/CD3 (связывающие белки В7Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228,

25

SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311, и связывающие белки В7Н6, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315 или SEQ ID NO:316, соответственно) с рекомбинантным В7Н6 ECD человека (Фигура 3А+В) и белков В7Н6 ECD с мутацией Ala человека (Фигура 4А+В).

Все протестированные примерные белки, связывающие В7Н6/CD3, демонстрируют связывание, сравнимое с рекомбинантным В7Н6 ECD человека (Фигура 3А+В), тогда как только белки, связывающие В7Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311, и белки, связывающие В7Н6, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315, или SEQ ID NO:316, соответственно, демонстрируют сильное связывание с человеческим Fc-His-меченым Ala-мутированным внеклеточным белком В7Н6, в котором сайты связывания NKp30 были заменены на аланины. Белки, связывающие В7Н6/CD3, содержащий цепь В7Н6 или SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:227 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 демонстрируют только слабое связывание при высоких концентрациях или отсутствие связывания с Fc-His-меченым Ala-мутированным внеклеточным белком В7Н6.

#### Пример 7: Связывание с В7Н6-положительными клетками НСТ

Связывание белков, связывающих В7Н6/CD3, с НСТ-15, линией клеток CRC человека (колоректальный рак), тестировали с помощью проточной цитометрии. В предыдущем эксперименте было подтверждено, что клетки НСТ-15 экспрессируют В7-Н6 на уровне РНК, а также на уровне белка примерно с 8000 рецепторов В7-Н6 на клеточной поверхности (данные не показаны). Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2. Клетки НСТ-15

окрашивали увеличивающимися концентрациями двухстадийно очищенных белков, связывающих В7Н6/CD3, в буфере FACS (PBS/0.5%BSA/0,05% азида натрия). Связанные молекулы обнаруживали с помощью PE-конъюгированного вторичного антитела против человека (Sigma-Aldrich, #P8047). На Фигурах 5А+В

5 показано связывание примерных белков, связывающих В7Н6/CD3 (белки, связывающие В7Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID

10 NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 и белки, связывающие В7Н6, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315 или SEQ ID NO:316, соответственно) с клетками

15 НСТ-15 человека.

#### Пример 8: Перекрестная реакционная способность с яванским макаком В7Н6

Связывание белков, связывающих В7Н6/CD3, с рекомбинантными клетками СНО-К1, экспрессирующими В7Н6 яванского макака, тестировали с помощью

20 проточной цитометрии. Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2. Рекомбинантные клеточные линии яванского макака, экспрессирующие В7Н6, получали, как описано в примере 5. Клетки окрашивали увеличивающимися концентрациями двухстадийно очищенных белков, связывающих В7Н6/CD3, в буфере FACS (PBS/0,5%BSA/0,05% азида натрия).

25 Связанные молекулы обнаруживали с помощью PE-конъюгированного вторичного антитела против человека (Sigma-Aldrich, #P8047). На Фигуре 6 показано связывание примерных белков, связывающих В7Н6/CD3 (белки, связывающие В7Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ

30 ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 и белки, связывающие В7Н6, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID

NO:315 или SEQ ID NO:316, соответственно) с рекомбинантными клетками яванского макака, экспрессирующими В7Н6.

Пример 9: Связывание с Т-клетками человека

Связывание белков, связывающих В7Н6/CD3 с очищенными Т-клетками человека тестировали с помощью проточной цитометрии. Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2. Т-клетки выделяли из лейкоцитарных пленок, полученных от Австрийского Красного Креста. Для всех лейкоцитарных пленок было получено информированное согласие в соответствии с Хельсинкской декларацией и с одобрения кантонального этического комитета Австрии.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) готовили с использованием среды с градиентом плотности Ficoll® Paque (GE Healthcare Lifesciences) с последующим центрифугированием. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) были получены из обогащенных препаратов лимфоцитов (лейкоцитарных пленок), побочного продукта банков крови, собирающих кровь для переливания. Поэтому мононуклеарные клетки выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll® (35 мин. без тормоза при 1400 об/мин.) и обширных промывок посредством PBS. Оставшиеся эритроциты удаляли путем инкубации в течение 3 минут в лизирующем буфере АСК (Thermo Fisher Scientific, A1049201), с последующей промывкой в PBS перед суспендированием в среде для анализа, содержащей добавку RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco #61870-010), 5% человеческого АВ сывороточного АВ (Gemini, GemCell кат. № 100-512 LOT#H56500I) + 1% MEM-NEAA (Gibco #11140-035), 10 мМ HEPES (Affymetrix #7365-49-9), 10 мкМ бета-меркаптоэтанол (Gibco #21985-023) и пируват натрия (Gibco #11360-039).

Т-клетки выделяли путем негативной селекции с использованием набора для выделения Т-клеток Pan II (Miltenyi Biotec #130-091-156). Вкратце, клетки ресуспендировали в 40 мкл буфера PBS/0,5% BSA (Gibco ref#041-94553 M)/2 мМ EDTA (Invitrogen ref# 15575-038) на 10 миллионах клеток и инкубировали с 10 мкл коктейля биотин-антитело на 10 миллионах клеток в течение 5 мин. при 4 °С. Затем добавляли 30 мкл буфера и 20 мкл антибиотинового MACS® MicroBeds/10 миллионов клеток и инкубировали в течение 10 минут при 4°С. Затем смесь помещали в предварительно промытую колонку 25LS (Miltenyi

Biotec #130-042-401) в магнитном поле подходящего сепаратора микрошариков MACS® (Miltenyi Biotec). Поток собирали и промывали средой для анализа.

Т-клетки окрашивали увеличивающимися концентрациями двухстадийно очищенных связывающих белков В7Н6/CD3 в буфере FACS (PBS/0,5% BSA/0,05% азида натрия). Связанные молекулы обнаруживали с помощью PE-конъюгированного вторичного антитела против человека (Sigma-Aldrich, #P8047). На Фигуре 7 показано связывание иллюстративных белков, связывающих (белки, связывающие В7Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 и белки, связывающие В7Н6, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315, или SEQ ID NO:316, соответственно) с Т-клетками человека.

#### Пример 10: Селективность связывания

Связывание белков, связывающих В7Н6/CD3 с В7Н6- и CD3-негативными клетками СНО-К1 тестировали с помощью анализа проточной цитометрии. Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2. Клетки СНО-К1 окрашивали увеличивающимися концентрациями двухстадийно очищенных связывающих белков В7Н6/CD3 в буфере FACS (PBS/0,5% BSA/0,05% азида натрия). Связанные молекулы обнаруживали с помощью PE-конъюгированного вторичного антитела против человека (Sigma-Aldrich, #P8047). На Фигуре 8 показано связывание примерных белков, связывающих В7Н6/CD3 (белки, связывающие В7Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 и белки, связывающие В7Н6, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315 или SEQ ID NO:316, соответственно) с клетками СНО-К1.

#### Пример 11: Ингибирование активности В7Н6-зависимых клеток НК

Экспрессированный на клеточной поверхности В7Н6 связывается с НКр30 на клетках НК, что запускает НКр30-опосредованную активацию клеток НК и цитотоксичность НК-клеток и секрецию цитокинов (Brandt et al, J. Exp. Med. 2009;206(7):1495-1503). Для оценки В7Н6-зависимой активации клеток НК 96-луночные планшеты для культивирования клеток с плоским дном покрывали 100 нМ рекомбинантным белком В7Н6 человека (R&D Systems#7144-B7-050) в течение ночи при 4 °С. На следующий день планшеты промывали посредством PBS, затем добавляли увеличивающиеся концентрации связывающих В7Н6/CD3 белков или рекомбинантного белка НКр30 (R&D Systems#1849-NK-025) и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2. После дополнительной стадии промывки 100,000 клеток НК92М1 (АТСС) в 100 мкл среды (MEM альфа, содержащей 12,5% фетальной бычьей сыворотки, 12,5% лошадиной сыворотки, 0,2 мМ D-Myo-Inositol, 0,02 мМ фолиевой кислоты и 0,1 мМ β-меркаптоэтанола) добавляли на лунку и инкубировали в течение 24 часов. На следующий день концентрацию IFNγ определяли количественно с использованием набора V-PLEX Human IFN-γ (Meso Scal Discovery). На Фигурах 9А+В показана способность белков, связывающих В7Н6/CD3 (белки, связывающие В7Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311) ингибировать В7-Н6-зависимую индукцию секреции IFNγ с помощью НК-92М1.

Белки, связывающие В7Н6, которые не связываются или связываются слабо с Ala-мутированными внеклеточными белками В7Н6, в которых участки взаимодействия НКр30 были заменены аланином (белки, связывающие В7-Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:227, и цепь CD3 из SEQ ID NO:311) (как показано на Фигуре 4, Пример 6) ингибируют В7-Н6-зависимую индукцию секреции IFNγ клетками НК-92М1, тогда как связывающий белок, который демонстрирует сильное связывание с Ala-мутированными внеклеточными белками В7Н6, сравнимое с белком дикого типа, (связывающие

В7-Н6/CD3 белки, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311) (как показано на Фигуре 4, Пример 6) не влияют на В7-Н6-зависимую индукцию секреции IFN $\gamma$  клетками NK-92MI.

Пример 12: Эффективность Т-клеточного перенаправленного лизиса клеток НСТ-15 человека

Эффективность нестимулированных Т-клеток в отношении клеток НСТ-15 определяли с использованием высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в качестве показателя лизиса клеток. В этом анализе В7Н6-положительную клеточную линию CRC НСТ-15 совместно культивировали с человеческими Т-клетками в качестве эффекторных клеток и повышающими концентрациями связывающих В7Н6/CD3 белков в течение 72 часов при отношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням 10:1. Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2. Очищенные Т-клетки выделяли, как описано в Примере 9. Затем клетки НСТ-15 и Т-клетки в соотношении 1:10 инкубировали со связывающими В7Н6/CD3 белками в концентрациях от 0,00001 нМ до 10 нМ в течение 72 часов.

Цитотоксическую активность определяли с использованием набора для обнаружения цитотоксичности Kit<sup>PLUS</sup> (Roche) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, этот метод основан на использовании высвобождения ЛДГ из мертвых или поврежденных клеток плазматической мембраны. Супернатант клеточной культуры инкубируют с реакционной смесью из набора в течение 30 минут и измеряют образование формазана в результате активности ЛДГ на спектрофотометре при 500 нм в качестве заменителя лизиса клеток. Процент цитотоксичности по отношению к максимальному контролю лизиса рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Цитотоксичность (относительно контроля)} = \frac{\text{измеренное значение} - \text{исходные данные}}{\text{максимальный лизис} - \text{минимальный лизис}}$$

Исходные данные: Клетки-мишени + Эффекторные клетки

Максимальный лизис: Клетки-мишени + 5% Triton X-100

## Минимальный лизис: Клетки-мишени

Используя программное обеспечение Using GraphPad®Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc), процент цитотоксичности относительно максимального контроля лизиса наносили на график относительно соответствующих концентраций белка, связывающего В7Н6/CD3. Кривые доза-ответ анализировали с помощью четырехпараметрической модели логистического уравнения для оценки сигмоидальной кривой доза-ответ, и рассчитывали значения  $EC_{50}$ .

На Фигурах 10А+В и 11А+В показаны примеры эффективности Т-клеточного перенаправленного лизиса клеток НСТ-15, опосредованного типичными белками, связывающими В7Н6/CD3 (связывающие В7Н6/CD3 белки, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311, и белки, связывающие В7Н6, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315 или SEQ ID NO:316, соответственно).

На Фигурах 10 и 11 показано, что связывающие В7Н6/CD3 белки, которые связываются с рекомбинантными Ala-мутированными внеклеточными белками В7Н6, в которых участки взаимодействия НКр30 были заменены аланином, сравнимы с белком дикого типа и не ингибируют В7-Н6-зависимую секрецию IFN $\gamma$  клетками НК92М1 (белки, связывающие В7Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 и белки, связывающие В7Н6, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315 или SEQ ID NO:316, соответственно) (как показано в Примере 6, 11) демонстрируют более низкие значения  $EC_{50}$  (Таблицы

4А+В), чем белки, связывающие В7Н6/CD3, которые не связываются или связываются лишь слабо с рекомбинантными Ala-мутированными внеклеточными белками В7Н6 и ингибируют В7-Н6-зависимую секрецию клетками IFN $\gamma$  (белки, связывающие В7-Н6/CD3, содержащие SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220 или SEQ ID NO:221 и цепь CD3 из SEQ ID NO:CD3#1) (как показано в Примерах 6, 11). Таким образом, связывающие белки, которые не ингибируют В7Н6-зависимую активацию клеток НК, неожиданно демонстрируют значительно более высокий опосредованный Т-клетками лизис опухолевых клеток по сравнению со связывающими белками, которые ингибируют В7Н6-зависимую активацию клеток НК.

Как показано на фиг. 12 с примерным белком, связывающим В7Н6/CD3, активность требует только низкого отношения эффектора к клетке-мишени.

Таблица 4А: значения EC<sub>50</sub> [нМ] 11 типичных В7Н6/CD3 связывающих белков, как измерено в течение 72 часов анализа токсичности с нестимулированными Т-клетками (от донора #1) в качестве эффекторных клеток и клеток НСТ-15 в качестве клеток-мишеней.

В7Н6/CD3	EC <sub>50</sub> [нМ]
В7Н6#1/CD3#1	0.14
В7Н6#2/CD3#1	0.22
В7Н6#3/CD3#1	0.40
В7Н6#4/CD3#1	0.23
В7Н6#5/CD3#1	0.22
В7Н6#6/CD3#1	0.46
В7Н6#7/CD3#1	0.36
В7Н6#8/CD3#1	0.62
В7Н6#9/CD3#1	0.44
В7Н6#10/CD3#1	0.53
В7Н6#11/CD3#1	0.77

Таблица 4В: значения EC<sub>50</sub> [нМ] 23 типичных белков, связывающих В7Н6/CD3, как измерено за 72 часа анализа на цитотоксичность с нестимулированными Т-клетками (от донора #2) в качестве эффекторных клеток и клеток НСТ-15 в качестве клеток-мишеней.

B7H6 /CD3	EC <sub>50</sub> [нМ]
B7H6#12/CD3#1	0.004
B7H6#13/CD3#1	0.008
B7H6#14/CD3#1	0.003
B7H6#15/CD3#1	0.004
B7H6#16/CD3#1	0.011
B7H6#17/CD3#1	0.014
B7H6#18/CD3#1	0.014
B7H6#19/CD3#1	0.011
B7H6#20/CD3#1	0.010
B7H6#21/CD3#1	0.010
B7H6#22/CD3#1	0.005
B7H6#23/CD3#1	0.005
B7H6#24/CD3#1	0.005
B7H6#14/CD3#2	0.118
B7H6#23/CD3#2	0.215
B7H6#14/CD3#3	0.069
B7H6#23/CD3#3	0.107
B7H6#14/CD3#4	0.292
B7H6#23/CD3#4	0.447
B7H6#14/CD3#5	0.005
B7H6#23/CD3#5	0.003
B7H6#14/CD3#6	0.081
B7H6#23/CD3#6	0.129

Пример 13: Перекрестная реакционная способность и селективность перенаправленного лизиса Т-клеток

Эффективность нестимулированных Т-клеток в отношении клеток НСТ-15 определяли с использованием высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в качестве показателя лизиса клеток, как описано в Примере 12. Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2. Линии рекомбинантных клеток яванского макака, экспрессирующих В7Н6, получали, как описано в Примере 5.

На Фигуре 13 показаны примеры эффективности Т-клеточного перенаправленного лизиса клеток, экспрессирующих В7Н6 яванского макака (Фигура 13А) и В7Н6-негативных родительских клеток CHO-K1 (Фигура 13В), опосредованного примерными связывающими В7Н6/CD3 белками, содержащими цепь В7Н6 SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID

NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 SEQ ID NO:311, и белками, связывающими В7Н6, содержащими цепь В7Н6 SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315, или SEQ ID NO:316, соответственно).

5        Пример 14: Селективность активации Т-клеток

Для определения активации Т-клеток был проведен анализ цитотоксичности с использованием нестимулированных Т-клеток и В7Н6-позитивных клеток НСТ-15 в качестве клеток-мишеней, как описано в Примере 12. Белки, связывающие В7Н6/CD3, были получены, как описано в Примере 2.

10 Для определения активации Т-клеток клетки центрифугировали и окрашивали антителами против CD4 (BD #550630), CD8 (BD #557834) и CD25 (BD#340907) и измеряли с помощью проточной цитометрии. На Фигуре 14 показаны примеры эффективности активации клеток CD4<sup>+</sup> (Фигура 14А) и клеток CD8<sup>+</sup> (Фигура 14В) в присутствии и в отсутствие В7Н6-положительных клеток НСТ-15,

15 опосредованной типичными связывающими В7Н6/CD3 белками, содержащими цепь В7Н6 SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:235 или SEQ ID NO:236 и цепь CD3 SEQ ID NO:311.

Пример 15: Селективность дегрануляции Т-клеток

Для определения дегрануляции Т-клеток посредством внутриклеточной

20 экспрессии перфорина и гранзима В был проведен анализ цитотоксичности с использованием нестимулированных Т-клеток и В7Н6-положительных клеток НСТ-15 в качестве клеток-мишеней, как описано в Примере 12. Белки, связывающие В7Н6/CD3 получали, как описано в Примере 2. Для определения внутриклеточных уровней гранзима В и перфорина клетки центрифугировали и

25 окрашивали антителами против CD4 (BD #550630), CD8 (BD #557834), после чего клетки пермабилизовали с помощью раствора для фиксации/пермеабиллизации (BD #554714) и окрашивали антителами против перфорина (BioLegend #308120) и гранзима В (BD #560221) и измеренный с

30 помощью проточной цитометрии. На Фигуре 15 показаны примеры эффективности повышающей регуляции внутриклеточной экспрессии перфорина в клетках CD4<sup>+</sup> (Фигура 15А) и CD8<sup>+</sup> (Фигура 15В), а на Фигуре 16 показана повышающая регуляция внутриклеточной экспрессии гранзима В в клетках CD4<sup>+</sup> (Фигура 16А) и CD8<sup>+</sup> (Фигура 16В) в присутствии и отсутствии В7Н6-

положительных клеток НСТ-15, опосредованных типичными белками, связывающими В7Н6/CD3, содержащими цепь В7Н6 из SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:235, или SEQ ID NO:236 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311.

5        Пример 16: Индукция пролиферации Т-клеток

Анализ цитотоксичности с использованием нестимулированных Т-клеток и В7Н6-позитивных клеток НСТ-15 в качестве клеток-мишеней проводили, как описано в Примере 12. Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2. Для определения пролиферации Т-клеток РВМС метили посредством 10 5 мкМ Cell Trace<sup>TM</sup> CFSE (Invitrogen, C34554) и Т-клетки окрашивали антителом против CD3 (BioLegend кат. №: 317336). Затем меченые РВМС инкубировали с клетками НСТ-15 в соотношении 10:1 повышающихся концентрациях белка, связывающего В7Н6/CD3 в течение 6 дней. На Фигуре 17 показана дозозависимая индукция пролиферации Т-клеток с помощью белков, связывающих В7Н6, содержащих цепь В7Н6 из SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:235, или SEQ ID NO:236, и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 в присутствии В7Н6-положительных клеток НСТ-15.

15        Пример 17: Селективность секреции IFN $\gamma$

Анализ цитотоксичности с использованием нестимулированных Т-клеток и 20 В7Н6-позитивных клеток НСТ-15 в качестве клеток-мишеней проводили, как описано в Примере 12. Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2. Уровни цитокинов в супернатантах определяли с помощью набора V-Plex Human IFN-gamma (MSD, CAT: K151QOD-4). На Фигуре 18 показана секреция IFN $\gamma$ , индуцированная пятью примерными белками, связывающими 25 В7Н6/CD3, содержащими цепь В7Н6 из SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:235, или SEQ ID NO:236 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311.

Пример 18: ФК у мышей

Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2.

ФК белков, связывающих В7Н6/CD3, оценивали у мышей С57BL/6 после 30 однократного внутривенного введения дозы 1 мг/кг *в.в.* Концентрации белков, связывающих В7Н6/CD3, в сыворотке определяли с использованием анализа захвата В7Н6/обнаружения CD3.

Вкратце, самцы мышей C57BL/6 получали однократно внутривенно (в/в) дозу 1 мг/кг (n = 3 на молекулу). Образцы крови собирали перед введением дозы и через 0,25, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 240 и 336 часов после введения дозы. Уровни лекарственного средства в сыворотке измеряли с помощью анализа связывания лиганда на основе MSD с использованием биотинилированного В7Н6 в качестве реагента для захвата и меченого сульфитом CD3ε в качестве реагента для обнаружения. Фармакокинетические (ФК) параметры рассчитывали по временным профилям концентрации в сыворотке с использованием некомпартментного анализа. Оценивали следующие фармакокинетические параметры: AUC<sub>посл</sub> (площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени от нулевого момента времени до последней поддающейся количественному определению временной точки), AUC<sub>беск</sub> (площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени, экстраполированной до бесконечности), CL (системный клиренс), V<sub>ss</sub> (стационарный объем распределения) и T<sub>1/2</sub> (конечный период полувыведения).

Профили зависимости средней (SD) концентрации в сыворотке от времени для типичного белка, связывающего В7Н6/CD3, обобщены на Фигуре 19. Средние (SD) ФК параметры для этих примерных белков, связывающих ВН6/CD3, приведены в таблице 5.

Таблица 5: Средние (SD) ФК параметры примерного белка, связывающего В7Н6/CD3 у самцов мышей C57BL/6 после однократного внутривенного введения дозы 1 мг/кг

Доза (мг/кг)	C <sub>макс</sub> (нг/мл)	AUC <sub>посл.</sub> (нг·ч/мл)	AUC <sub>беск</sub> * (нг·ч/мл)	CL (мл/д/кг)	V <sub>ss</sub> (мл/кг)	T <sub>1/2</sub> (день)	MRT (день)
1	20500 (458)	1200000 (78100)	1840000 (112000)	13.1 (0.8)	173 (30)	10.2 (2.2)	13.3 (3.0)

\* более 20% экстраполировано AUC

#### Пример 18А: ФК у мышей

ФК белков, связывающих В7Н6/CD3 оценивали, как описано в Примере 18. Средние (SD) профили зависимости концентрации в сыворотке от времени для четырех примерных белков, связывающих В7Н6/CD3, содержащих цепь В7Н6 из SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, или SEQ ID NO:232 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 обобщены на Фигуре 22.

#### Пример 19: Эффективность *in vivo*

Исследования эффективности проводили с использованием мышинной модели с ксенотрансплантатом человека, реконструированной человеческими Т-клетками. В частности, клетки колоректального рака NCI-H716 человека ( $2,5 \times 10^7$ ) вводили подкожно (п/к) в правый дорсальный бок сублетально облученным (2 Гр, день -1) самкам мышей NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Sug</sup>/JicTac (день -16). Параллельно *in vitro* размножали CD3-положительные Т-клетки человека (выделенные из здорового донора крови человека).

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) получали, как описано в Примере 9.

Т-клетки выделяли путем отрицательной селекции с использованием набора для выделения Т-клеток Pan II (Miltenyi Biotec #130-096-535). Вкратце, клетки ресуспендировали в 40 мкл буфера PBS/0,5% BSA (Gibco ref#041-94553 M)/2 mM EDTA (Invitrogen ref# 15575-038) на  $10 \times 10^6$  клеток и инкубировали с 10 мкл коктейля биотин-антитело на  $10 \times 10^6$  клеток в течение 5 мин. при 4 °С.

Затем добавляли 30 мкл буфера и 20 мкл антибиотинных MACS® MicroBeads/ $10 \times 10^6$  клеток и инкубировали в течение 10 мин. при 4 °С. Затем смесь помещали в предварительно промытую колонку 25LS (Miltenyi Biotec #130-042-401) в магнитном поле подходящего сепаратора микрошариков MACS® (Miltenyi Biotec). Поток собирали и промывали средой для анализа.

Затем Т-клетки размножали с использованием набора T Cell Activation/Expansion Kit для человека (Miltenyi Biotec кат. № 130-091-441) в течение 17 дней. Вкратце, антибиотинные частицы MACSiBead™ загружают биотином CD2-, CD3-, CD28 и переносят в очищенные Т-клетки в соотношении 2 клетки на частицу и инкубируют в присутствии 20 единиц рекомбинантного IL-2 (R&D#202-IL-050/CF) при плотности  $0,5 - 10^6$  клеток/мл в течение 14 дней. К клеткам добавляли 20 единиц свежего IL-2 каждые три дня. За три дня до инъекции животным Т-клетки повторно стимулировали антителами против биотина MACSiBead™. Частицы загружали биотином CD2-, CD3-, CD28 Biotin в соотношении 1 шарик на 4 клетки в течение дополнительных трех дней. Наконец, шарики удаляли с помощью сепаратора MACSiMAG™ (Miltenyi Biotec) и Т-клетки промывали в PBS.

В день -2 животных рандомизировали в лечебные группы в зависимости от объема опухоли и внутрибрюшинно (в/б) вводили  $2 \times 10^7$  Т-клеток человека.

Белки, связывающие В7Н6/CD3, получали, как описано в Примере 2. Лечение начинали в день 1, и белок, связывающий В7Н6/CD3 или буфер-носитель (50 mM NaOAc, 100 mM NaCl, pH 5,0) вводили по схеме дозирования q7d внутривенно (в.в.) путем внутривенных болюсных инъекций в латеральную хвостовую вену.

5 Рост опухоли контролировали путем измерений с помощью внешнего штангенциркуля, а объемы опухоли рассчитывали с использованием стандартной формулы полуэллипсоида. Животные, достигшие критериев умерщвления, были подвергнуты эвтаназии в начале исследований по этическим соображениям. Лечение мышей с опухолями белками, связывающими

10 В7Н6/CD3, один раз в неделю в.в. при 0,05 мг/кг вызывало значительную регрессию опухоли (Фигура 20).

#### Пример 19А: Эффективность *in vivo*

Исследования эффективности проводили с использованием мышиной модели с ксенотрансплантатом NCI-H716 человека, реконструированной

15 человеческими CD3<sup>+</sup> Т-клетками, как описано в Примере 19. Лечение мышей с опухолями белками, связывающими В7Н6/CD3, содержащими цепь В7Н6 из SEQ ID NO:228, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO:231 или SEQ ID NO:232, и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 один раз в неделю в.в. при 0,05 мг/кг вызывало значительную регрессию опухоли (Фигура 23).

#### Пример 19В: Эффективность *in vivo*

Исследования эффективности проводили с использованием мышиной модели с ксенотрансплантатом NCI-H716 человека, реконструированной

20 человеческими CD3<sup>+</sup> Т-клетками, как описано в Примере 19. Лечение мышей с опухолями примерным белком, связывающим В7Н6/CD3, вводимым один раз в неделю или в виде однократной дозы в.в. при 0,05 мг/кг вызывало значительную регрессию опухоли (Фигура 24).

#### Пример 20: Процентное содержание мономеров в белках, связывающих В7Н6/CD3

Процентное содержание мономера определяли для белков, связывающих

30 В7Н6/CD3 (белки, связывающие В7Н6/CD3, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID

NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 и белки, связывающие B7H6, содержащие цепь B7H6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315, или SEQ ID NO:316, соответственно) с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (aSEC) (представленной в Таблице 6). aSEC проводили в системе Waters® (Milford, MA, США) Acquity UPLC® с использованием колонки Protein BEH SEC 200Å, 1,7 мкм, 4.6x150 мм (кат. № 186005225). Условия работы были следующими: подвижная фаза: 50 мМ фосфата натрия, 200 мМ аргинина и 0,05% азида натрия; скорость потока: 0,5 мл/мин.; продолжительность: 5 минут; объем загрузки образца: 10 мкг; пиковое обнаружение: A280 нм; автоматизированный метод обработки хроматограмм.

Таблица 6: Процент мономера после первой и второй стадий очистки

B7H6 связывающая молекула	CD3 связывающая молекула	Процент мономера после 1-й стадии	Процент мономера после 2-й стадии
B7H6#1	CD3#1	70.5	98.5
B7H6#2	CD3#1	38.7	95.1
B7H6#3	CD3#1	50.1	96.6
B7H6#4	CD3#1	56.0	99.9
B7H6#5	CD3#1	66.5	99.3
B7H6#6	CD3#1	63.7	99.1
B7H6#7	CD3#1	43.4	97.7
B7H6#8	CD3#1	68.3	96.8
B7H6#9	CD3#1	61.3	95.7
B7H6#10	CD3#1	66.3	97.7
B7H6#11	CD3#1	38.2	95.3
B7H6#12	CD3#1	67.4	99.9
B7H6#13	CD3#1	61.9	99.9
B7H6#14	CD3#1	64.6	99.9
B7H6#15	CD3#1	53.8	99.9
B7H6#16	CD3#1	52.4	99.7
B7H6#17	CD3#1	46.8	99.9
B7H6#18	CD3#1	50.1	99.8
B7H6#19	CD3#1	64.1	99.9
B7H6#20	CD3#1	62.3	99.9
B7H6#21	CD3#1	60.4	99.9
B7H6#22	CD3#1	57.5	99.9
B7H6#23	CD3#1	59.5	99.8

В7Н6 связывающая молекула	CD3 связывающая молекула	Процент мономера после 1-й стадии	Процент мономера после 2-й стадии
В7Н6#24	CD3#1	51.7	99.9
В7Н6#14	CD3#2	71.9	99.9
В7Н6#14	CD3#3	68.2	99.9
В7Н6#14	CD3#4	62.2	99.6
В7Н6#14	CD3#5	76.5	99.9
В7Н6#14	CD3#6	70.5	99.9
В7Н6#23	CD3#2	69.8	99.8
В7Н6#23	CD3#3	67.3	99.6
В7Н6#23	CD3#4	62.2	99.7
В7Н6#23	CD3#5	75	99.9
В7Н6#23	CD3#6	69.6	99.9

### Пример 21: Термоустойчивость

Термоустойчивость определяли с помощью анализа теплового сдвига (TSA) и результатов первых переходов плавления ( $T_m1$ ) белков, связывающих В7Н6/CD3 (белки, связывающие В7Н6, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 и белки, связывающие В7Н6, содержащие цепь В7Н6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315, или SEQ ID NO:316, соответственно) представлены в Таблице 7. Профиль интенсивности флуоресценции в зависимости от температуры был получен с использованием системы ПЦР в реальном времени QuantStudio™ 6 (Applied Biosystems, Waltham, MA) с окрашиванием белкового геля SYPRO® Orange (Invitrogen, Carlsbad, CA) в качестве внешнего флуорофора. Образец разбавляли до 0,4 мг/мл в 10 мМ гистидине, pH 6,0 с 40 мМ хлорида натрия и 0,02% азиды натрия. Кривая плавления была построена с линейным изменением температуры от 25°C до 95°C со скоростью 2°C/мин., при этом данные собирали приблизительно каждые 0,4°C через набор фильтров 'ROX' (Ex: 580 ±10 нм, Em: 623 ±14 нм). Данные анализировали с использованием программного обеспечения Protein Thermal Shift™ версии v1.3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

Таблица 7: Анализ термоустойчивости

В7Н6 связывающая молекула	CD3 связывающая молекула	Tm1 (°C)
В7Н6#12	CD3#1	65.3
В7Н6#13	CD3#1	65.2
В7Н6#14	CD3#1	65.7
В7Н6#15	CD3#1	65.4
В7Н6#16	CD3#1	65.4
В7Н6#17	CD3#1	65.4
В7Н6#18	CD3#1	65.0
В7Н6#19	CD3#1	64.0
В7Н6#20	CD3#1	62.5
В7Н6#21	CD3#1	64.9
В7Н6#22	CD3#1	58.7
В7Н6#23	CD3#1	64.7
В7Н6#24	CD3#1	65.3
В7Н6#14	CD3#2	61.7
В7Н6#14	CD3#3	60.4
В7Н6#14	CD3#4	60.3
В7Н6#14	CD3#5	61.4
В7Н6#14	CD3#6	61.4
В7Н6#23	CD3#2	60.1
В7Н6#23	CD3#3	64.9
В7Н6#23	CD3#4	58.0
В7Н6#23	CD3#5	57.9
В7Н6#23	CD3#6	57.5

Пример 22: Прогнозируемые показатели иммуногенности *in silico* с помощью EpiVax

Иммуногенность последовательностей оценивали *in silico* с помощью математического алгоритма. В частности, EpiMatrix® Treg-скорректированные показатели (EpiVax Inc., Providence RI) в качестве меры показателей иммуногенности определяли для цепей В7Н6 (цепь В7Н6 из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:240) и для цепей CD3 (цепь CD3 SEQ ID NO:311, SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315 или SEQ ID NO:316) и сравнивали с оценками

различных последовательностей Fc. Эти оценки учитывают эпитопы Т-клеток и эпитопы Treg. Чем ниже показатель иммуногенности, тем меньше вероятность того, что последовательность будет иммуногенной. Как правило, отрицательный балл считается низким риском иммуногенности, тогда как очень положительный балл рассматривается как указание на потенциальную иммуногенность. Как показано в таблицах 8 и 9 ниже, примерные белки, связывающие B7H6/CD3, описанные в настоящей заявке, имеют очень низкие показатели иммуногенности, что указывает на низкий риск иммуногенности для этих связывающих белков.

10 Таблица 8: Скорректированные оценки EriVax® белков, связывающих B7H6/CD3

Белок, связывающий B7H6 или CD3	VH	VL	Полная полипептидная цепь (VL-CL-линкер-VH-CH1-шарнир-CH2-CH3)
B7H6#1 цепь B7H6	-9.94	17.52	-29.07
B7H6#2 цепь B7H6	17.12	1.78	-27.07
B7H6#3 цепь B7H6	67.70	32.77	-11.61
B7H6#4 цепь B7H6	-20.24	-6.54	-34.34
B7H6#5 цепь B7H6	-58.29	-29.64	-43.99
B7H6#6 цепь B7H6	4.77	-9.90	-30.99
B7H6#7 цепь B7H6	16.81	-13.51	-28.20
B7H6#8 цепь B7H6	-31.42	35.40	-29.91
B7H6#9 цепь B7H6	-4.61	-4.44	-31.45
B7H6#10 цепь B7H6	10.78	3.40	-26.72
B7H6#11 цепь B7H6	4.49	47.21	-22.15
B7H6#12 цепь B7H6	-24.63	-48.50	-39.76
B7H6#13 цепь B7H6	-19.87	-48.50	-39.00
B7H6#14 цепь B7H6	-23.93	-48.50	-39.65
B7H6#15 цепь B7H6	-19.71	-48.50	-38.98
B7H6#16 цепь B7H6	-17.72	-48.50	-38.66
B7H6#17 цепь B7H6	-19.71	-48.50	-38.98
B7H6#18 цепь B7H6	-19.71	-50.41	-39.25
B7H6#19 цепь B7H6	-22.64	-48.50	-39.44
B7H6#20 цепь B7H6	-24.63	-50.41	-40.03
B7H6#21 цепь B7H6	-21.94	-48.50	-39.33
B7H6#22 цепь B7H6	-23.93	-50.41	-39.92
B7H6#23 цепь B7H6	-21.94	-50.41	-39.61
B7H6#24 цепь B7H6	-19.71	-50.41	-39.25
CD3#1 цепь CD3	-9.68	-50.52	-35.25
CD3#2 цепь CD3	-40.29	-8.95	-33.62
CD3#3 цепь CD3	-41.48	-4.54	-33.15
CD3#4 цепь CD3	-39.06	-4.54	-32.77
CD3#5 цепь CD3	-55.51	-14.24	-36.83
CD3#6 цепь CD3	-41.48	-14.24	-34.60

Таблица 9: Скорректированные оценки EriVax доменов Fc

Белковая цепь Fc	Скорректированная оценка EpiVax
Fc-IgG1-WT	-25.64
Fc-IgG1-LALA	-29.83
Fc-IgG1-LALA-KNOB	-31.76
Fc-IgG1-LALA-HOLE	-18.01

### Пример 23: Неспецифическое связывание с поверхностями

Специфичность белков, связывающих В7Н6/CD3, в соответствии с изобретением далее тестировали в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием высокозаряженных белков. Анализ неспецифического связывания был разработан с использованием биосенсорной технологии для определения того, имеют ли связывающие белки значительное связывание с неродственными заряженными белками. В этом анализе белки, связывающие В7Н6/CD3, пропускали над двумя поверхностями SPR, одна из которых была покрыта отрицательно заряженным белком (ингибитор трипсина), а другая была покрыта положительно заряженным белком (лизозим). Когда белок демонстрирует значительное неспецифическое связывание с этими поверхностями, вполне вероятно, что причиной связывания является наличие положительно или отрицательно заряженных участков на поверхности кандидата. Неспецифическое связывание белков может привести к плохой фармакокинетике (ФК) и биораспределению, а также может иметь последующие последствия для технологичности.

Эксперимент проводили на системе Biacore® T200 SPR (GE Healthcare Life Sciences). Эксперименты по разбавлению, подготовке поверхности и связыванию проводили при 25 °С в буфере 1X HBS-EP, приготовленном из 10X HBS-EP. Скорость потока как для протокола иммобилизации, так и для эксперимента по связыванию составляла 5 мкл/мин.

Чтобы подготовить поверхность для эксперимента по неспецифическому связыванию, лизоцим белка куриного яйца и ингибитор трипсина из соевых бобов глицин макс вручную соединяли с сенсорным чипом Biacore® серии S CM5 (GE Healthcare sciences) с поверхностной плотностью 3000-5000 RU с использованием набора аминного соединения в соответствии с инструкциями производителя.

Образцы готовили в концентрации 1 мкМ в буфере 1X HBS-EP. Образцы вводили на активированные поверхности с 10-минутной ассоциацией и 15-минутной диссоциацией. Данные были собраны с использованием программного обеспечения Biacore® T200 Control версии 2.0.1 и проанализированы с использованием программного обеспечения Biacore® T200 Evaluation версии 3.0 (GE Healthcare Life Sciences).

В Таблице 10 показано отсутствие связывания или очень низкое связывание с двумя высокозаряженными белками, ингибитором трипсина и лизоцимом, примерных белков, связывающих B7H6/CD3 (белки, связывающие B7H6, содержащие цепь B7H6 из SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:240 и цепь CD3 из SEQ ID NO:311 и белки, связывающие B7H6, содержащие цепь B7H6 из SEQ ID NO:230 или SEQ ID NO:239 и цепь CD3 из SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315 или SEQ ID NO:316, соответственно).

Таблица 10: Низкие числа RU указывают на отсутствие значительного связывания с неродственными заряженными белками

В7Н6 связывающая молекула	CD3 связывающая молекула	Неспецифическое связывание (RU), лизоцим (положительный)	Неспецифическое связывание (RU), ингибитор Тгуп (отрицательный)
В7Н6#12	CD3#1	9.2	35.4
В7Н6#13	CD3#1	7.2	30.6
В7Н6#14	CD3#1	8.1	32.7
В7Н6#15	CD3#1	7.2	32.8
В7Н6#16	CD3#1	8.2	42.6
В7Н6#17	CD3#1	15.3	88.4
В7Н6#18	CD3#1	6.6	32.8
В7Н6#19	CD3#1	8.2	40.3
В7Н6#20	CD3#1	9.8	48.4
В7Н6#21	CD3#1	8.1	42
В7Н6#22	CD3#1	7.8	39.5
В7Н6#23	CD3#1	8.1	45.7
В7Н6#24	CD3#1	7.9	43.5
В7Н6#14	CD3#2	11.2	12.2
В7Н6#14	CD3#3	12.4	26.4
В7Н6#14	CD3#4	8.8	22.6
В7Н6#14	CD3#5	16.2	109.6
В7Н6#14	CD3#6	15.7	34
В7Н6#23	CD3#2	37.8	47.8
В7Н6#23	CD3#3	18.9	38.7
В7Н6#23	CD3#4	6.8	20.7
В7Н6#23	CD3#5	15	114.7
В7Н6#23	CD3#6	57.2	96.5

Пример 24: Инфильтрация Т-клеток в опухолевой ткани

5 ксенотрансплантата SHP77 с примерным белком, связывающим В7Н6/CD3

Оставшиеся опухолевые ткани мышей в исследовании, описанном в Примере 19, готовили, фиксировали в формалине и заливали в парафин. Затем готовили срезы ткани и окрашивали для экспрессии CD3 на Т-клетках (анти-CD3 (2GV6), Ventana Medical Systems). Инфильтрация Т-клеток в опухолевой ткани ксенотрансплантата NCI-H716 с примерным белком, связывающим В7Н6/CD3, показана на Фигуре 21. Оценку в Таблице 11 использовали для количественного определения экспрессии CD3 в опухолевых тканях ксенотрансплантата.

10

Таблица 11: Подсчет количества инфильтрирующих CD3-положительных Т-клеток

Оценка	Описание
0	< 5 CD3-положительные Т-клетки на HPF (поле зрения при большом увеличении)
1	5-99 CD3-положительные Т-клетки на HPF (поле зрения при большом увеличении)
2	100-200 CD3-положительные Т-клетки на HPF (поле зрения при большом увеличении)
3	> 300 CD3-положительные Т-клетки на HPF (поле зрения при большом увеличении)

Пример 25: Фармацевтический состав для в/в введения

5 Любой из вышеперечисленных связывающих белков/молекул в соответствии с изобретением может быть выбран для изготовления фармацевтического состава для в/в введения. Пример подходящего фармацевтического состава для антитела в соответствии с изобретением выглядит следующим образом.

10 Флакон на 10 мл содержит 10 мг/мл молекулы/белка, связывающих В7Н6/CD3 в соответствии с изобретением в буфере, содержащем гистидин, трегалозу, полисорбат 20 и воду для инъекций.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий первую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с В7Н6 и вторую антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3, где указанная первая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с В7Н6, выбрана из группы, которая включает в себя i) - xxiv):

i) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3);

ii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3);

iii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3);

iv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID NO:24 (CDR3);

v) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID NO:30 (CDR3);

vi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1),  
5 SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID NO:36 (CDR3);

vii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) и SEQ ID NO:39 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:40 (CDR1),  
10 SEQ ID NO:41 (CDR2) и SEQ ID NO:42 (CDR3);

viii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) и SEQ ID NO:45 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:46 (CDR1),  
15 SEQ ID NO:47 (CDR2) и SEQ ID NO:48 (CDR3);

ix) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:49 (CDR1), SEQ ID NO:50 (CDR2) и SEQ ID NO:51 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:52 (CDR1),  
20 SEQ ID NO:53 (CDR2) и SEQ ID NO:54 (CDR3);

x) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:58 (CDR1),  
25 SEQ ID NO:59 (CDR2) и SEQ ID NO:60 (CDR3);

xi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1),  
30 SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3);

xii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и CDR тяжелой цепи,

включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3);

xiii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:73 (CDR1), SEQ ID NO:74 (CDR2) и SEQ ID NO:75 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:76 (CDR1), SEQ ID NO:77 (CDR2) и SEQ ID NO:78 (CDR3);

xiv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3);

xv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3);

xvi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID NO:93 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3);

xvii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:97 (CDR1), SEQ ID NO:98(CDR2) и SEQ ID NO:99 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:100 (CDR1), SEQ ID NO:101 (CDR2) и SEQ ID NO:102 (CDR3);

xviii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:103 (CDR1), SEQ ID NO:104 (CDR2) и SEQ ID NO:105 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:106 (CDR1), SEQ ID NO:107 (CDR2) и SEQ ID NO:108 (CDR3);

xix) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:109 (CDR1), SEQ ID NO:110 (CDR2) и SEQ ID NO:111 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:112 (CDR1), SEQ ID NO:113 (CDR2) и SEQ ID NO:114 (CDR3);

xx) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:115 (CDR1), SEQ ID NO:116 (CDR2) и SEQ ID NO:117 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:118 (CDR1), SEQ ID NO:119 (CDR2) и SEQ ID NO:120 (CDR3);

xxi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:121 (CDR1), SEQ ID NO:122 (CDR2) и SEQ ID NO:123 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:124 (CDR1), SEQ ID NO:125 (CDR2) и SEQ ID NO:126 (CDR3);

xxii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:127 (CDR1), SEQ ID NO:128 (CDR2) и SEQ ID NO:129 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:130 (CDR1), SEQ ID NO:131 (CDR2) и SEQ ID NO:132 (CDR3);

xxiii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3); и

xxiv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3).

2. Белок по п. 1, где указанная первая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с В7Н6, выбрана из группы, которая включает в себя i) - xxiv):

5 i) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:146;

ii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:147 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:148;

10 iii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:149 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:150;

iv) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:151 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:152;

15 v) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:153 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:154;

vi) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:155 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:156;

vii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:157 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:158;

25 viii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:159 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:160;

ix) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:161 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:162;

30 x) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:163 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:164;



xxii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:187 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:188;

xxiii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:189 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:190; и

xxiv) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:191 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:192.

10

3. Белок по п. 1 или 2, где указанная вторая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с CD3 выбрана из группы, которая включает в себя i)-vi):

i) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3);

ii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:263 (CDR1), SEQ ID NO:264 (CDR2) и SEQ ID NO:265 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:266 (CDR1), SEQ ID NO:267 (CDR2) и SEQ ID NO:268 (CDR3);

iii) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:269 (CDR1), SEQ ID NO:270 (CDR2) и SEQ ID NO:271 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:272 (CDR1), SEQ ID NO:273 (CDR2) и SEQ ID NO:274 (CDR3);

iv) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:275 (CDR1), SEQ ID NO:276 (CDR2) и SEQ ID NO:277 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:278 (CDR1), SEQ ID NO:279 (CDR2) и SEQ ID NO:280 (CDR3);

30

v) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:281 (CDR1), SEQ ID NO:282 (CDR2) и SEQ ID NO:283 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:284 (CDR1), SEQ ID NO:285 (CDR2) и SEQ ID NO:286 (CDR3); и

vi) антигенсвязывающая единица, содержащая CDR легкой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:287 (CDR1), SEQ ID NO:288 (CDR2) и SEQ ID NO:289 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:290 (CDR1), SEQ ID NO:291 (CDR2) и SEQ ID NO:292 (CDR3).

4. Белок по любому из пп. 1 - 3, где указанная вторая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с CD3 выбрана из группы, которая включает в себя i) - vi):

i) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294;

ii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:295 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:296;

iii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:297 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:298;

iv) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:299 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:300;

v) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:301 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:302; и

vi) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:303 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:304.

5. Белок по любому из пп. 1 - 4, где

i) указанная первая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с В7Н6, содержит от своего N-конца к С-концу первый вариабельный домен легкой цепи, первый константный домен легкой цепи, первый пептидный линкер, первый вариабельный домен тяжелой цепи и первый константный домен тяжелой цепи CH1; и

ii) указанная вторая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с CD3 содержит от своего N-конца к С-концу второй вариабельный домен легкой цепи, второй константный домен легкой цепи, второй пептидный линкер, второй вариабельный домен тяжелой цепи и второй константный домен тяжелой цепи CH1.

6. Белок по п. 5, где

i) указанная первая антигенсвязывающая единица содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3), а указанная вторая антигенсвязывающая единица содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3); или

ii) указанная первая антигенсвязывающая единица содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3), а указанная вторая антигенсвязывающая единица содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3); или

iii) указанная первая антигенсвязывающая единица содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3), а указанная вторая антигенсвязывающая единица содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3); или

iv) указанная первая антигенсвязывающая единица содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID NO:93 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3), а указанная вторая антигенсвязывающая единица содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3).

7. Белок по п. 5 или 6, где

i) указанная первая антигенсвязывающая единица содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:167 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:168, а указанная вторая антигенсвязывающая единица содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294; или

ii) указанная первая антигенсвязывающая единица содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:171 и переменный домен тяжелой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:172, а указанная вторая антигенсвязывающая единица содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294; или

iii) указанная первая антигенсвязывающая единица содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:173 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:174, а указанная вторая антигенсвязывающая единица содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294; или

iv) указанная первая антигенсвязывающая единица содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:175 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:176, а указанная вторая антигенсвязывающая единица содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294.

8. Белок по одному из пп. 5 - 7, где указанный первый и/или второй пептидный линкер содержит 26 - 42 аминокислот, предпочтительно одну из 30 - 40 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, или от 36 до 39 аминокислот, более предпочтительно 38 аминокислот.

9. Белок по одному из пп. 5 - 8, где указанный первый линкер и/или второй линкер представляет собой линкер Gly-Ser, предпочтительно содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:250, более предпочтительно указанные первый и второй пептидные линкеры содержат одинаковую последовательность (например, SEQ ID NO:250).

10. Белок по одному из пп. 5 - 9, где первый константный домен легкой цепи и второй константный домен легкой цепи содержат каппа- или лямбда-домен человека.

5 11. Белок по одному из пп. 5 - 10, где указанная первая антигенсвязывающая единица, специфичная для В7Н6 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196 SEQ ID NO:197  
10 SEQ ID NO:198 SEQ ID NO:199 SEQ ID NO:200 SEQ ID NO:201 SEQ ID NO:202 SEQ ID NO:203 SEQ ID NO:204 SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215, и SEQ ID NO:216, а  
указанная вторая антигенсвязывающая единица, специфичная для CD3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ  
15 ID NO:305, SEQ ID NO:306, SEQ ID NO:307, SEQ ID NO:308, SEQ ID NO:309, и SEQ ID NO:310.

12. Белок по п. 11, в котором

(i) указанная первая антигенсвязывающая единица, специфичная для  
20 В7Н6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204, а указанная вторая антигенсвязывающая единица, специфичная для CD3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305; или

(ii) указанная первая антигенсвязывающая единица, специфичная для  
25 В7Н6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, а указанная вторая антигенсвязывающая единица, специфичная для CD3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO.305;

(iii) указанная первая антигенсвязывающая единица, специфичная для  
30 В7Н6, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 207, а указанная вторая антигенсвязывающая единица, специфичная для CD3, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO.305; или

(iv) указанная первая антигенсвязывающая единица, специфичная для В7Н6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208, а

указанная вторая антигенсвязывающая единица, специфичная для CD3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO.305.

13. Белок по одному из пп. 5 - 12, дополнительно содержащий первый и второй домен Fc, указанный первый домен Fc ковалентно связан с указанной первой антигенсвязывающей единицей, предпочтительно с С-концом указанной первой антигенсвязывающей единицы, а указанный второй домен Fc ковалентно связан с указанной второй антигенсвязывающей единицей, предпочтительно с С-концом указанной второй антигенсвязывающей единицы.

14. Белок по п. 13, в котором

i) указанный первый домен Fc содержит тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], а указанный второй домен Fc содержит треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

ii) указанный первый домен Fc содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], а указанный второй домен Fc содержит серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V], или

iii) указанный второй домен Fc содержит тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], а указанный первый домен Fc содержит треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

iv) указанный второй домен Fc содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], а указанный первый домен Fc содержит серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V],

где предпочтительно указанный первый или указанный второй домен Fc дополнительно содержит аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F].

15. Белок по п. 13 или 14, где указанный первый и/или указанный второй домен Fc содержит аланин в положении 234[L234A] и в положении 235 [L235A], предпочтительно указанный первый домен Fc содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:242, а указанный второй домен Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:243.

16. Белок по одному из пп. 5 - 15, содержащий первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с B7H6, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO; 224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239 и SEQ ID NO:240 и вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:311, SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315, и SEQ ID NO:316.

17. Белок по п. 16, в котором

(i) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с B7H6, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228, а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3, содержит аминокислотную последовательность SEQ, ID NO:311; или

(ii) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с B7H6, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 230, а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3, содержит аминокислотную последовательность SEQ, ID NO:311, или

(iii) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с B7H6, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 231, а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3, содержит аминокислотную последовательность SEQ, ID NO:311; или

(iv) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с B7H6, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232, а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3, содержит аминокислотную последовательность SEQ, ID NO:311.

18. Белок по одному из пп. 16 - 17, где указанная первая и указанная вторая полипептидная цепь связаны дисульфидными связями, образуя биспецифический, двухвалентный и гетеродимерный белок.

5

19. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая первую антигенсвязывающую единицу и/или вторую антигенсвязывающую единицу белка по любому из пп. 1 - 12, необязательно дополнительно кодирующая первый и/или второй домен Fc.

10

20. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая первую и/или вторую полипептидную цепь по п. 16 или 17.

15

21. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 19 или 20.

22. Клетка-хозяин, трансфицированная вектором экспрессии по п. 21.

20

23. Способ изготовления белка по одному из пп. 1 - 18, включающий в себя

i) культивирование клетки-хозяина по п. 22 в условиях, позволяющих экспрессию белка по одному из пп. 1 - 18; и,

ii) восстановление белка; и необязательно

25

iii) дальнейшая очистка и/или модификация, и/или введение в состав белка.

30

24. Белок, содержащий первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6 (цепь В7Н6) и вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3 (цепь CD3), где указанная первая полипептидная цепь содержит первую легкую цепь, первый линкер и первую тяжелую цепь, а указанная вторая полипептидная цепь содержит вторую легкую цепь, второй линкер и вторую тяжелую цепь, где предпочтительно С-конец

указанной первой легкой цепи ковалентно связан с N-концом указанной первой тяжелой цепи через указанный первый пептидный линкер, и при этом С-конец указанной второй легкой цепи ковалентно связан с N-концом указанной второй тяжелой цепи через указанный второй пептидный линкер.

5

25. Белок по п. 20, в котором указанная первая и указанная вторая полипептидные цепи связаны дисульфидными связями с образованием биспецифического, двухвалентного и гетеродимерного белка.

10 26. Белок по п. 24, в котором указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с В7Н6, содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащие последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из i) - xxiv):

i) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3);

ii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3);

iii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3);

iv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID NO:24 (CDR3);

v) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID NO:30 (CDR3);

vi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID NO:36 (CDR3);

vii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) и SEQ ID NO:39 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:40 (CDR1), SEQ ID NO:41 (CDR2) и SEQ ID NO:42 (CDR3);

viii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) и SEQ ID NO:45 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:46 (CDR1), SEQ ID NO:47 (CDR2) и SEQ ID NO:48 (CDR3);

ix) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:49 (CDR1), SEQ ID NO:50 (CDR2) и SEQ ID NO:51 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:52 (CDR1), SEQ ID NO:53 (CDR2) и SEQ ID NO:54 (CDR3);

x) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) и SEQ ID NO:60 (CDR3);

xi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные

последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3);

xii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3);

xiii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:73 (CDR1), SEQ ID NO:74 (CDR2) и SEQ ID NO:75 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:76 (CDR1), SEQ ID NO:77 (CDR2) и SEQ ID NO:78 (CDR3);

xiv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3);

xv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3);

xvi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID NO:93 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3);

xvii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:97 (CDR1), SEQ ID NO:98 (CDR2) и SEQ ID NO:99 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:100 (CDR1), SEQ ID NO:101 (CDR2) и SEQ ID NO:102 (CDR3);

xviii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:103 (CDR1), SEQ ID NO:104 (CDR2) и SEQ ID NO:105 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:106 (CDR1), SEQ ID NO:107 (CDR2) и SEQ ID NO:108 (CDR3);

xix) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:109 (CDR1), SEQ ID NO:110 (CDR2) и SEQ ID NO:111 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:112 (CDR1), SEQ ID NO:113 (CDR2) и SEQ ID NO:114 (CDR3);

xx) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:115 (CDR1), SEQ ID NO:116 (CDR2) и SEQ ID NO:117 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:118 (CDR1), SEQ ID NO:119 (CDR2) и SEQ ID NO:120 (CDR3);

xxi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:121 (CDR1), SEQ ID NO:122 (CDR2) и SEQ ID NO:123 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:124 (CDR1), SEQ ID NO:125 (CDR2) и SEQ ID NO:126 (CDR3);

xxii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:127 (CDR1), SEQ ID NO:128 (CDR2) и SEQ ID NO:129 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:130 (CDR1), SEQ ID NO:131 (CDR2) и SEQ ID NO:132 (CDR3);

xxiii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3); и

xxiv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные

последовательности SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3).

27. Белок по п. 24 или 26, в котором указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3, содержит переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, содержащие последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из i) - vi):

i) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3);

ii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:263 (CDR1), SEQ ID NO:264 (CDR2) и SEQ ID NO:265 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:266 (CDR1), SEQ ID NO:267 (CDR2) и SEQ ID NO:268 (CDR3);

iii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:269 (CDR1), SEQ ID NO:270 (CDR2) и SEQ ID NO:271 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:272 (CDR1), SEQ ID NO:273 (CDR2) и SEQ ID NO:274 (CDR3);

iv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:275 (CDR1), SEQ ID NO:276 (CDR2) и SEQ ID NO:277 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:278 (CDR1), SEQ ID NO:279 (CDR2) и SEQ ID NO:280 (CDR3);

v) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:281 (CDR1), SEQ ID NO:282 (CDR2) и SEQ ID NO:283 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:284 (CDR1), SEQ ID NO:285 (CDR2) и SEQ ID NO:286 (CDR3); и

vi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:287 (CDR1), SEQ ID NO:288 (CDR2) и SEQ ID NO:289 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:290 (CDR1), SEQ ID NO:291 (CDR2) и SEQ ID NO:292 (CDR3).

28. Белок по одному из пп. 24 - 27, в котором

i) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с легкой цепью В7Н6, содержит CDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3); и указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3, содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3); или

ii) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с легкой цепью В7Н6, содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3), а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3 содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3); или

iii) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с легкой цепью В7Н6 содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя

аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3), а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3 содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3); или

iv) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с легкой цепью B7H6, содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID NO:93 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3), а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3 содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:257 (CDR1), SEQ ID NO:258 (CDR2) и SEQ ID NO:259 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:260 (CDR1), SEQ ID NO:261 (CDR2) и SEQ ID NO:262 (CDR3).

29. Белок по одному из пп. 24 - 27, где указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с B7H6, содержит переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из i) - xxiv):

i) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:146;

ii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:147 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:148;

iii) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:149 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:150;



xv) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:173 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:174;

xvi) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:175 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:176;

xvii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:177 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:178;

xviii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:180;

xix) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182;

xx) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:183 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:184;

xxi) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:185 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:186;

xxii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:187 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:188;

xxiii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:189 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:190; и

xxiv) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:191 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:192.

30. Белок по одному из пп. 24 - 29, в котором указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3, содержит

вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из i)-vi):

- i) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294;
- ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:295 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:296;
- iii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:297 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:298;
- iv) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:299 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:300;
- v) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:301 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:302; и
- vi) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:303 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:304.

31. Белок по одному из пп. 24 - 30, в котором

- i) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с В7Н6 содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:167 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:168, а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3 содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294 ; или
- ii) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с В7Н6 содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:171 и вариабельный домен

тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:172, а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294; или

iii) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с B7H6 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:173 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:174, а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294; или

iv) указанная первая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с B7H6 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:175 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:176, а указанная вторая полипептидная цепь, специфически связывающаяся с CD3 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:293 и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:294;

32. Белок по одному из пп. 24 - 31, в котором указанный первый и/или второй пептидный линкер содержит 26 - 42 аминокислоты, предпочтительно одну из 30 - 40 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, или от 36 до 39 аминокислот, более предпочтительно 38 аминокислот.

33. Белок по п. 32, где указанный первый линкер и/или второй линкер представляет собой линкер Gly-Ser, предпочтительно содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:250, более предпочтительно указанные первый и второй пептидные линкеры содержат одинаковую последовательность (например, SEQ ID NO:250).

34. Белок по одному из пп. 24 - 33, где указанная первая легкая цепь и указанная вторая легкая цепь независимо содержат каппа- или лямбда-домен каппа- или лямбда-домен человека.

5 35. Белок по одному из пп. 24 - 34, где указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, связывающийся с B7H6, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196 SEQ ID NO:197 SEQ ID NO:198 SEQ ID NO:199 SEQ ID NO:200 SEQ ID NO:201 SEQ ID NO:202 SEQ ID NO:203 SEQ ID NO:204 SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, 10 SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215, и SEQ ID NO:216, а указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, связывающийся с CD3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:305, SEQ ID NO:306, SEQ ID NO:307, SEQ ID NO:308, SEQ ID NO:309, и 15 SEQ ID NO: 310.

36. Белок по п. 35, в котором

i) указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, 20 связывающийся с B7H6, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:204, а указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, связывающийся с CD3 содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305; или

ii) указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, 25 связывающийся с B7H6, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:206, а указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, связывающийся с CD3 содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305; или

iii) указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, 30 связывающийся с B7H6, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:207, а указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, связывающийся с CD3 содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305; или

iv) указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, связывающийся с В7Н6, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:208, а указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, связывающийся с CD3 содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305.

37. Белок по одному из пп. 24 - 36, в котором

i) указанная первая тяжелая цепь содержит тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], а указанная вторая тяжелая цепь содержит треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

ii) указанная первая тяжелая цепь содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], а указанная вторая тяжелая цепь содержит серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V], или

iii) указанная вторая тяжелая цепь содержит тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], а указанная первая тяжелая цепь содержит треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

iv) указанная вторая тяжелая цепь содержит триптофан (W) в положении 366 [T366W], а указанная первая тяжелая цепь содержит серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V],

где предпочтительно указанная первая или указанная вторая тяжелая цепь дополнительно содержит аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F].

38. Белок по одному из пп. 24 - 37, где указанная первая и/или указанная вторая тяжелая цепь содержит аланин в положении 234[L234A] и в положении 235 [L235A] предпочтительно указанная первая тяжелая цепь содержит домен Fc с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:242, а указанная вторая тяжелая цепь содержит домен Fc с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:243.

39. Белок по одному из пп. 24 - 38, содержащий первую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с В7Н6, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, и SEQ ID NO:240 и вторую полипептидную цепь, специфически связывающуюся с CD3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:311, SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313, SEQ ID NO:314, SEQ ID NO:315, и SEQ ID NO:316.

40. Белок по п. 38, в котором
- i) указанная первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228, а указанная вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311; или
  - ii) указанная первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:230, а указанная вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311; или
  - iii) указанная первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:231, а указанная вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311; или
  - iv) указанная первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:232, а указанная вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311.

41. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая первую и/или вторую полипептидную цепь по любому из пп. 24 - 40.

42. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 41.

43. Клетка-хозяин, трансфицированная вектором экспрессии по п. 42.

44. Белок по одному из пп. 1 - 18 или 24 - 40 для применения в медицине.

5

45. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по одному из пп. 1 - 18 или 24 - 40 и фармацевтически приемлемый носитель.

46. Способ лечения рака, включающий в себя введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества белка по одному из пп. 1 - 18 или 24 - 40.

10

47. Применение белка по одному из пп. 1 - 18 или 24 - 40 для приготовления фармацевтической композиции для лечения рака.

15

48. Белок по одному из пп. 1 - 18 или 24 - 40 для применения в способе лечения рака.

49. Способ по п. 46, применение по п. 47 или белок для применения по п. 48, при этом рак представляет собой опухоль, экспрессирующую V7H6, где предпочтительно рак представляет собой (метастатический) колоректальный рак ((м)КРК), немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) или плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ).

20

50. Способ по п. 46 или 49, применение по п. 47 или 49 или белок для применения по п. 48 или 49, где указанный белок применяют в комбинации с цитотоксическим или цитостатическим химиотерапевтическим средством, терапевтически активным соединением, которое ингибирует ангиогенез, ингибитор пути сигнальной трансдукции (например, ингибитор EGFR), иммуномодулятор, ингибитор иммунных контрольных точек, ингибитор митотических контрольных точек или средство гормональной терапии.

25

30

51. Способ, применение или белок для применения по п. 50, где указанный белок используют в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунного ответа, предпочтительно с антителом против PD-1 или антителом против PD-L1.

5

52. Способ, применение или белок для применения по п. 51, где антитело против PD-1 выбрано из группы, которая включает в себя PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5.

10 53. Молекула антитела против B7H6, содержащая:

i) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3); или

15

ii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3); или

20

iii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3); или

25

iv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID NO:24 (CDR3); или

30

v) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные

последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID NO:30 (CDR3); или

vi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID NO:36 (CDR3); или

vii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) и SEQ ID NO:39 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:40 (CDR1), SEQ ID NO:41 (CDR2) и SEQ ID NO:42 (CDR3); или

viii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) и SEQ ID NO:45 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:46 (CDR1), SEQ ID NO:47 (CDR2) и SEQ ID NO:48 (CDR3); или

ix) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:49 (CDR1), SEQ ID NO:50 (CDR2) и SEQ ID NO:51 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:52 (CDR1), SEQ ID NO:53 (CDR2) и SEQ ID NO:54 (CDR3); или

x) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) и SEQ ID NO:60 (CDR3); или

xi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3); или

xii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) и SEQ ID NO:69 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:70 (CDR1), SEQ ID NO:71 (CDR2) и SEQ ID NO:72 (CDR3); или

xiii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:73 (CDR1), SEQ ID NO:74 (CDR2) и SEQ ID NO:75 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:76 (CDR1), SEQ ID NO:77 (CDR2) и SEQ ID NO:78 (CDR3); или

xiv) содержащим CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:79 (CDR1), SEQ ID NO:80 (CDR2) и SEQ ID NO:81 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:82 (CDR1), SEQ ID NO:83 (CDR2) и SEQ ID NO:84 (CDR3); или

xv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85 (CDR1), SEQ ID NO:86 (CDR2) и SEQ ID NO:87 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:88 (CDR1), SEQ ID NO:89 (CDR2) и SEQ ID NO:90 (CDR3); или

xvi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:91 (CDR1), SEQ ID NO:92 (CDR2) и SEQ ID NO:93 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:94 (CDR1), SEQ ID NO:95 (CDR2) и SEQ ID NO:96 (CDR3); или

xvii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:97 (CDR1), SEQ ID NO:98 (CDR2) и SEQ ID NO:99 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:100 (CDR1), SEQ ID NO:101 (CDR2) и SEQ ID NO:102 (CDR3); или

xviii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:103 (CDR1), SEQ ID NO:104 (CDR2) и SEQ ID NO:105 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные

последовательности SEQ ID NO:106 (CDR1), SEQ ID NO:107 (CDR2) и SEQ ID NO:108 (CDR3); или

5           xix) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:109 (CDR1), SEQ ID NO:110 (CDR2) и SEQ ID NO:111 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:112 (CDR1), SEQ ID NO:113 (CDR2) и SEQ ID NO:114 (CDR3); или

10           xx) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:115 (CDR1), SEQ ID NO:116 (CDR2) и SEQ ID NO:117 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:118 (CDR1), SEQ ID NO:119 (CDR2) и SEQ ID NO:120 (CDR3); или

15           xxi) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:121 (CDR1), SEQ ID NO:122 (CDR2) и SEQ ID NO:123 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:124 (CDR1), SEQ ID NO:125 (CDR2) и SEQ ID NO:126 (CDR3); или

20           xxii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:127 (CDR1), SEQ ID NO:128 (CDR2) и SEQ ID NO:129 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:130 (CDR1), SEQ ID NO:131 (CDR2) и SEQ ID NO:132 (CDR3); или

25           xxiii) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3); или

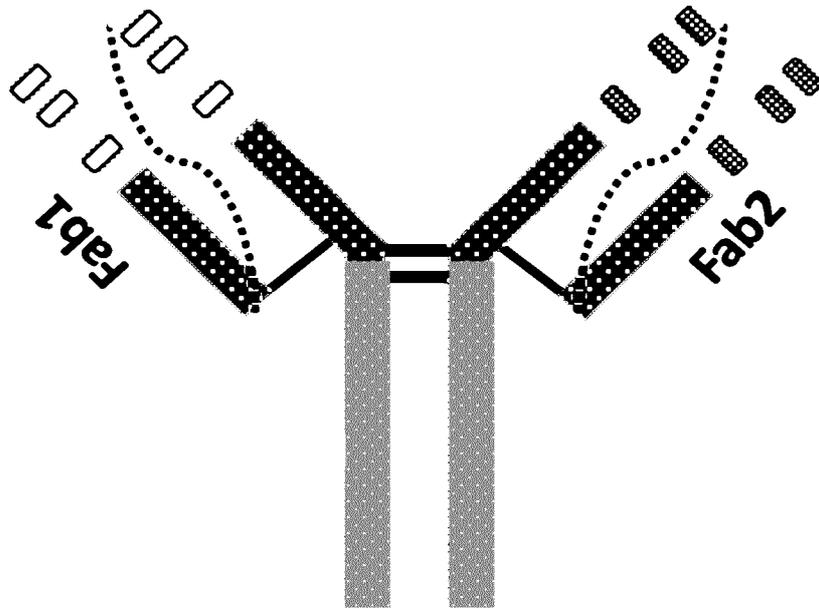
30           xxiv) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3) и CDR тяжелой цепи, включающие в себя аминокислотные последовательности SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3).

01/24

Фиг. 1

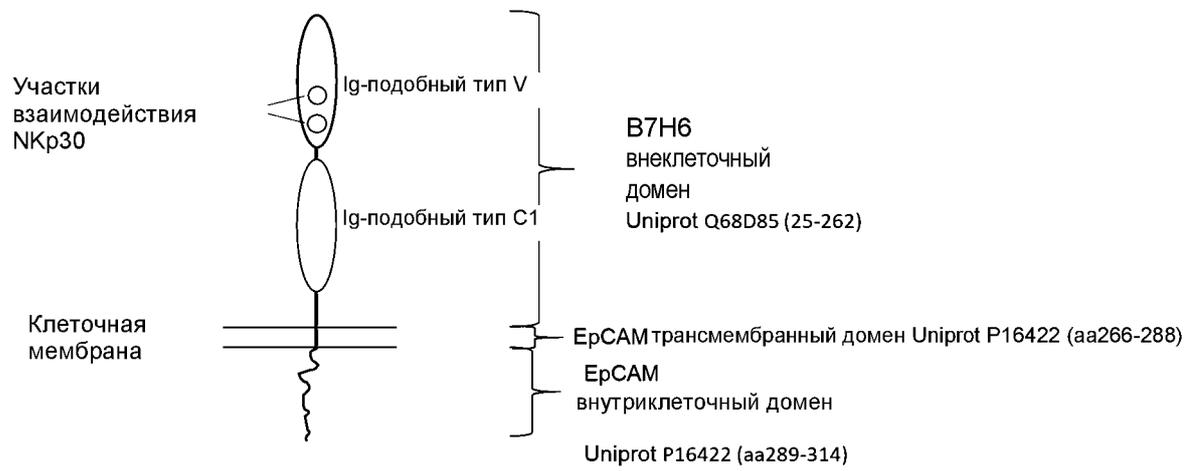
против В7Н6

против CD3



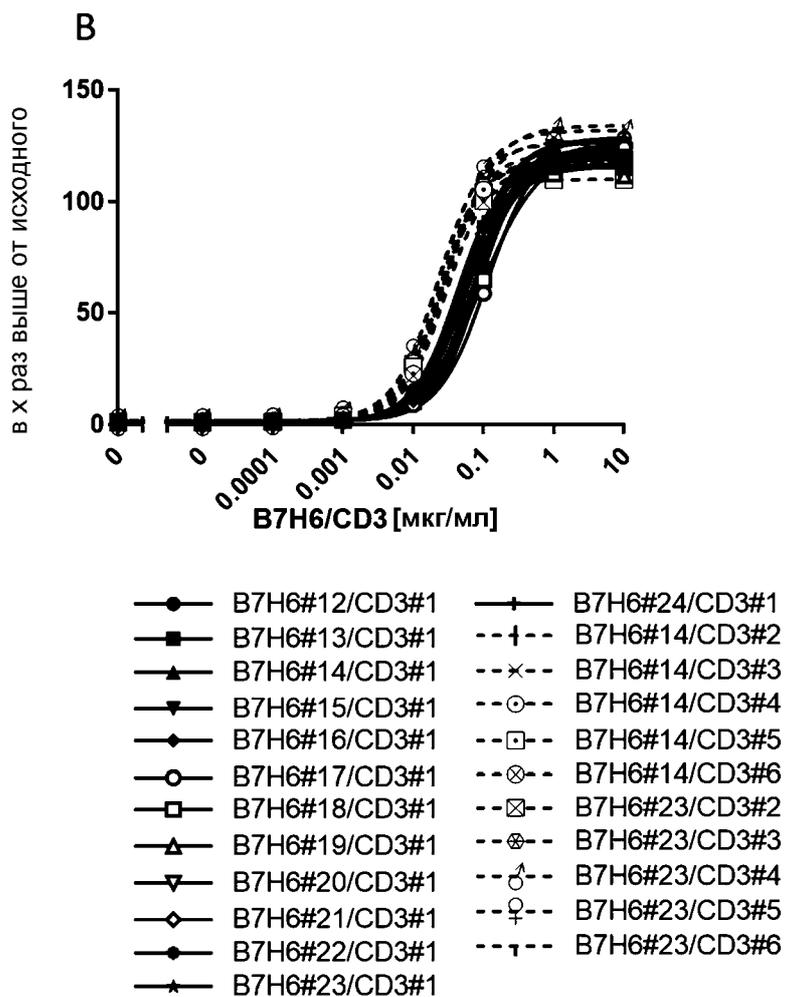
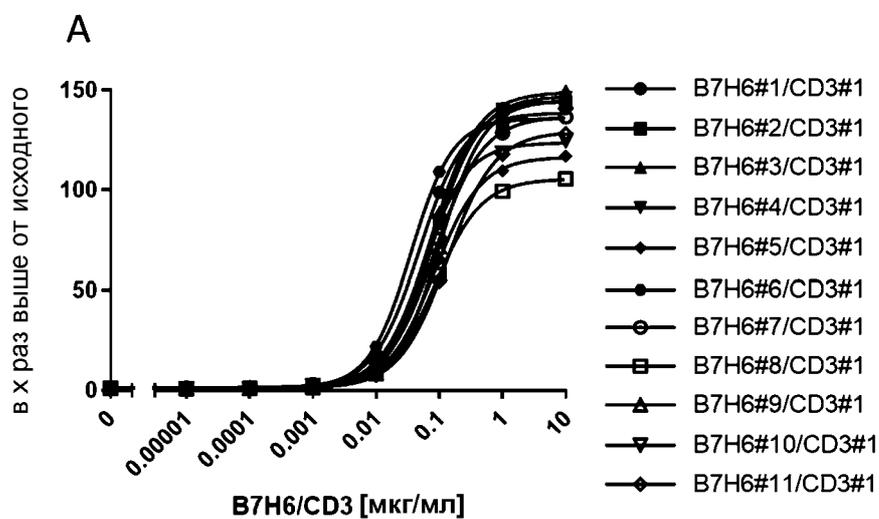
02/24

Фиг. 2



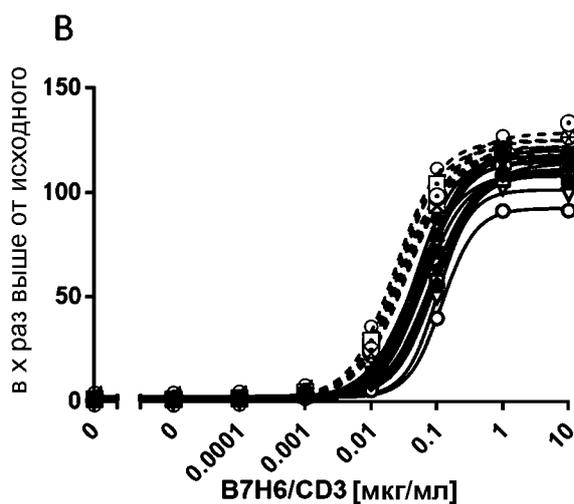
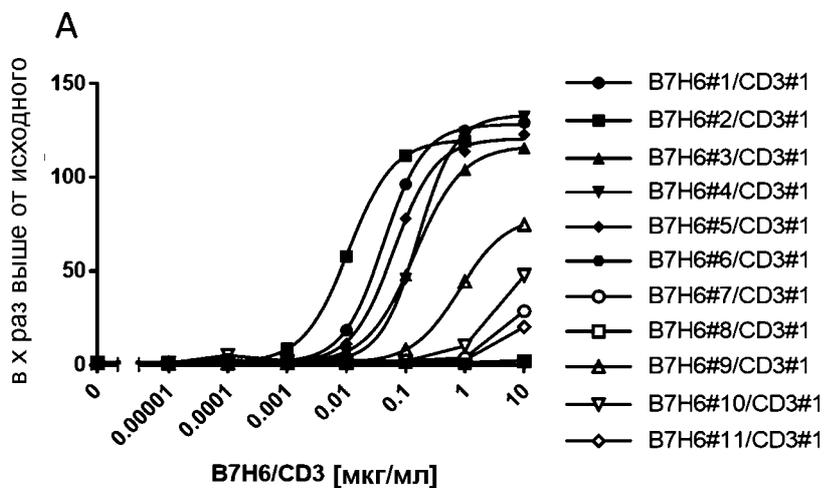
03/24

Фиг. 3



04/24

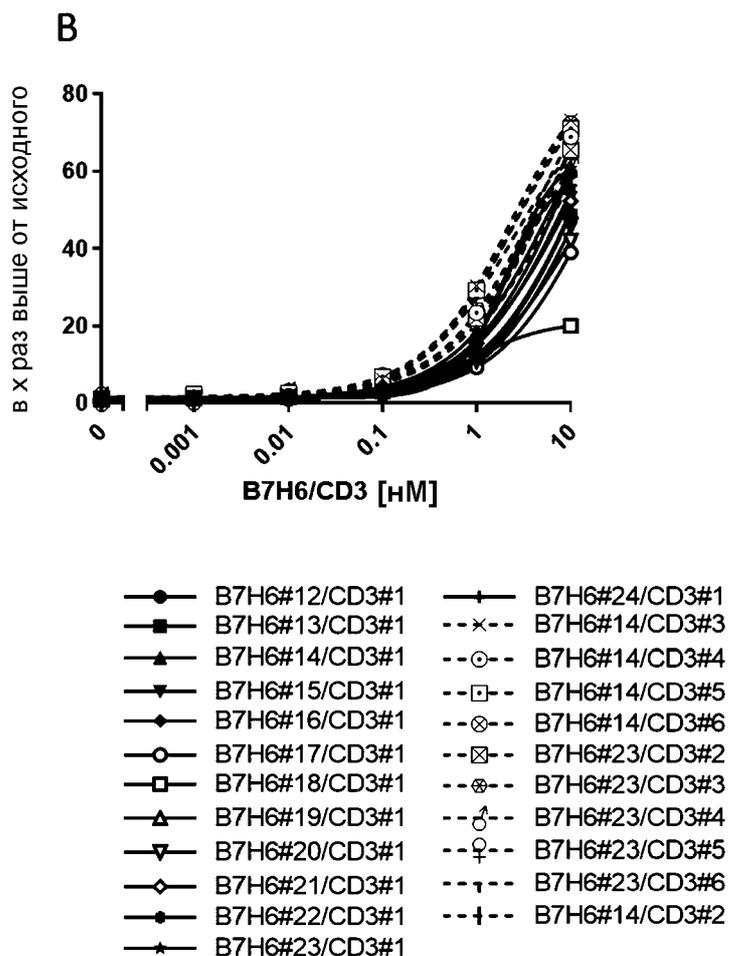
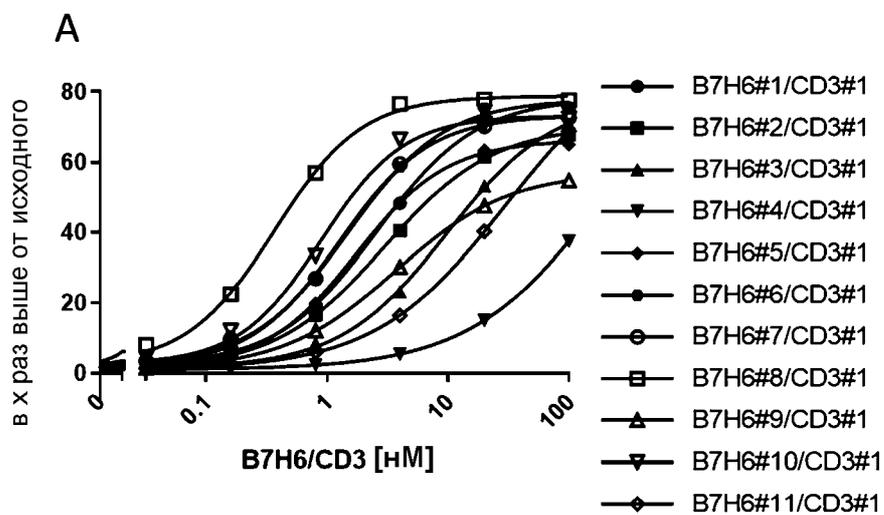
Фиг. 4



- B7H6#12/CD3#1
- B7H6#13/CD3#1
- ▲ B7H6#14/CD3#1
- ▼ B7H6#15/CD3#1
- ◆ B7H6#16/CD3#1
- B7H6#17/CD3#1
- B7H6#18/CD3#1
- ▲ B7H6#19/CD3#1
- ▼ B7H6#20/CD3#1
- ◇ B7H6#21/CD3#1
- B7H6#22/CD3#1
- ★ B7H6#23/CD3#1
- +— B7H6#24/CD3#1
- x-- B7H6#14/CD3#3
- B7H6#14/CD3#4
- B7H6#14/CD3#5
- ⊗-- B7H6#14/CD3#6
- ⊠-- B7H6#23/CD3#2
- ⊗-- B7H6#23/CD3#3
- ♂-- B7H6#23/CD3#4
- ♀-- B7H6#23/CD3#5
- τ-- B7H6#23/CD3#6
- +-- B7H6#14/CD3#2

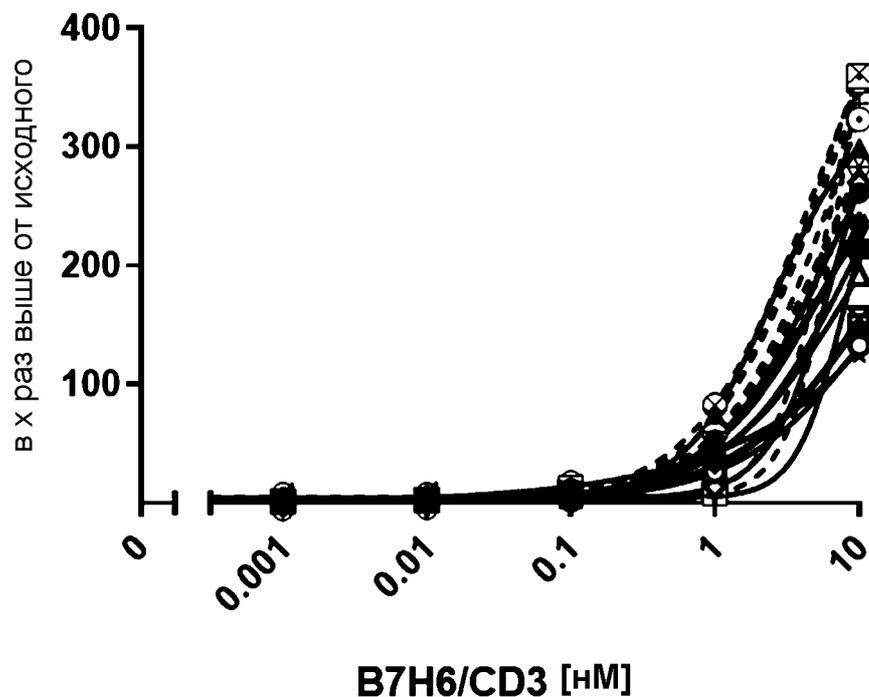
05/24

Фиг. 5



06/24

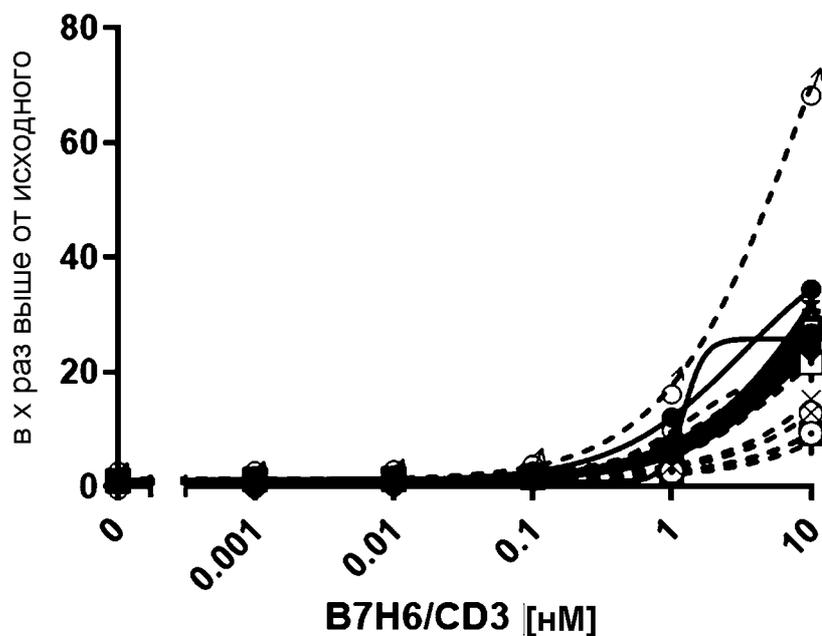
Фиг. 6



- |     |               |       |               |
|-----|---------------|-------|---------------|
| —●— | B7H6#12/CD3#1 | —+—   | B7H6#24/CD3#1 |
| —■— | B7H6#13/CD3#1 | --×-- | B7H6#14/CD3#3 |
| —▲— | B7H6#14/CD3#1 | --○-- | B7H6#14/CD3#4 |
| —▼— | B7H6#15/CD3#1 | --□-- | B7H6#14/CD3#5 |
| —◆— | B7H6#16/CD3#1 | --⊗-- | B7H6#14/CD3#6 |
| —○— | B7H6#17/CD3#1 | --⊠-- | B7H6#23/CD3#2 |
| —□— | B7H6#18/CD3#1 | --⊕-- | B7H6#23/CD3#3 |
| —△— | B7H6#19/CD3#1 | --♂-- | B7H6#23/CD3#4 |
| —▽— | B7H6#20/CD3#1 | --♀-- | B7H6#23/CD3#5 |
| —◇— | B7H6#21/CD3#1 | --┐-- | B7H6#23/CD3#6 |
| —●— | B7H6#22/CD3#1 | --†-- | B7H6#14/CD3#2 |
| —★— | B7H6#23/CD3#1 |       |               |

07/24

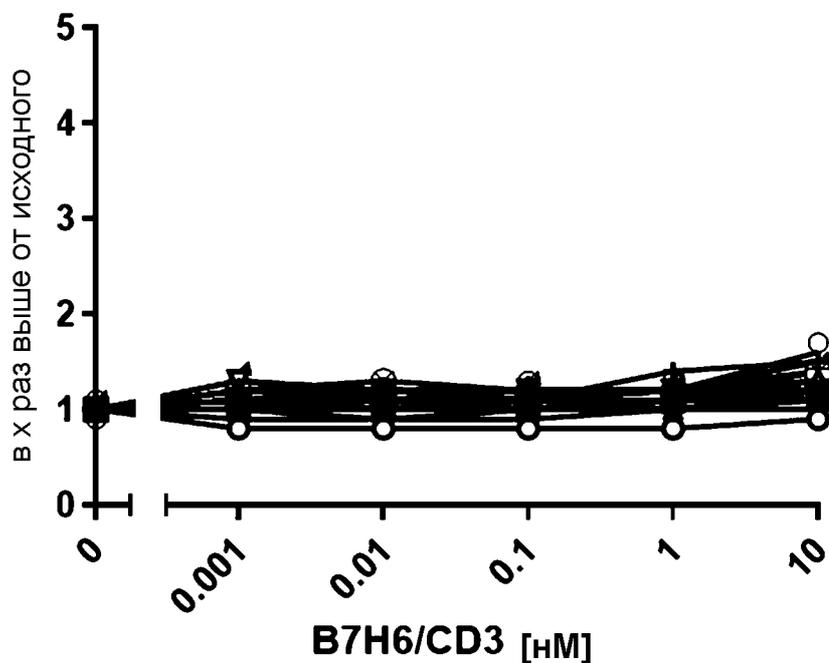
Фиг. 7



- |     |               |       |               |
|-----|---------------|-------|---------------|
| —●— | B7H6#12/CD3#1 | —+—   | B7H6#24/CD3#1 |
| —■— | B7H6#13/CD3#1 | --×-- | B7H6#14/CD3#3 |
| —▲— | B7H6#14/CD3#1 | --○-- | B7H6#14/CD3#4 |
| —▼— | B7H6#15/CD3#1 | --□-- | B7H6#14/CD3#5 |
| —◆— | B7H6#16/CD3#1 | --⊗-- | B7H6#14/CD3#6 |
| —○— | B7H6#17/CD3#1 | --⊠-- | B7H6#23/CD3#2 |
| —□— | B7H6#18/CD3#1 | --⊞-- | B7H6#23/CD3#3 |
| —△— | B7H6#19/CD3#1 | --♂-- | B7H6#23/CD3#4 |
| —▽— | B7H6#20/CD3#1 | --♀-- | B7H6#23/CD3#5 |
| —◇— | B7H6#21/CD3#1 | --┌-- | B7H6#23/CD3#6 |
| —●— | B7H6#22/CD3#1 | --└-- | B7H6#14/CD3#2 |
| —★— | B7H6#23/CD3#1 |       |               |

08/24

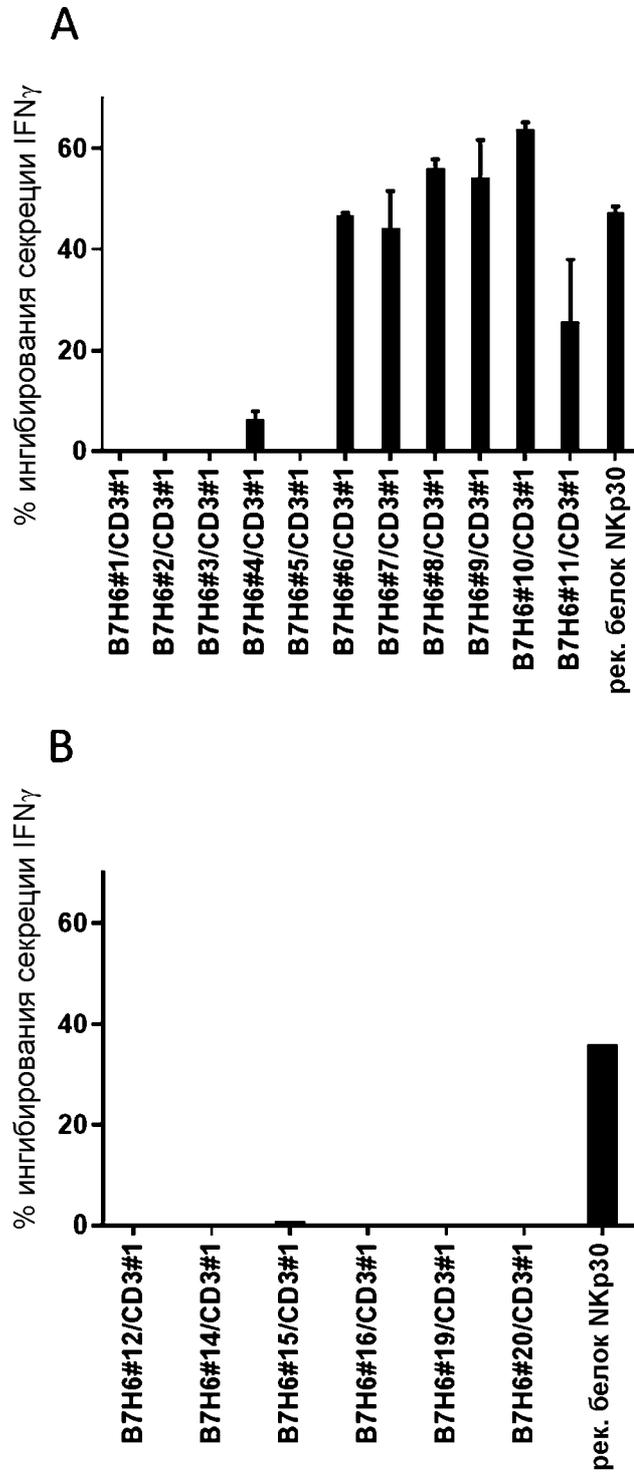
Фиг. 8



- |     |               |     |               |
|-----|---------------|-----|---------------|
| —●— | B7H6#12/CD3#1 | —+— | B7H6#24/CD3#1 |
| —■— | B7H6#13/CD3#1 | —×— | B7H6#14/CD3#3 |
| —▲— | B7H6#14/CD3#1 | —○— | B7H6#14/CD3#4 |
| —▼— | B7H6#15/CD3#1 | —□— | B7H6#14/CD3#5 |
| —◆— | B7H6#16/CD3#1 | —⊗— | B7H6#14/CD3#6 |
| —○— | B7H6#17/CD3#1 | —⊠— | B7H6#23/CD3#2 |
| —□— | B7H6#18/CD3#1 | —⊗— | B7H6#23/CD3#3 |
| —△— | B7H6#19/CD3#1 | —♂— | B7H6#23/CD3#4 |
| —▽— | B7H6#20/CD3#1 | —♀— | B7H6#23/CD3#5 |
| —◇— | B7H6#21/CD3#1 | —┬— | B7H6#23/CD3#6 |
| —●— | B7H6#22/CD3#1 | —┴— | B7H6#14/CD3#2 |
| —★— | B7H6#23/CD3#1 |     |               |

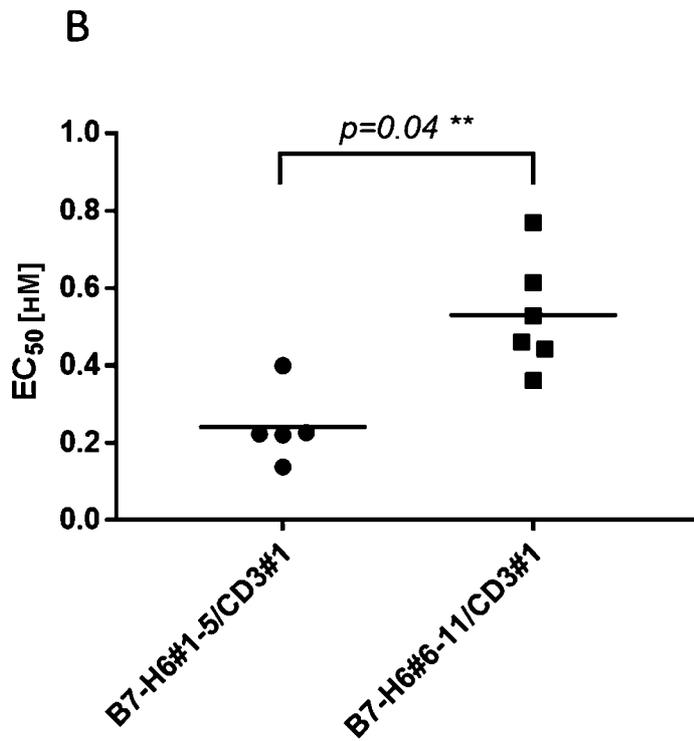
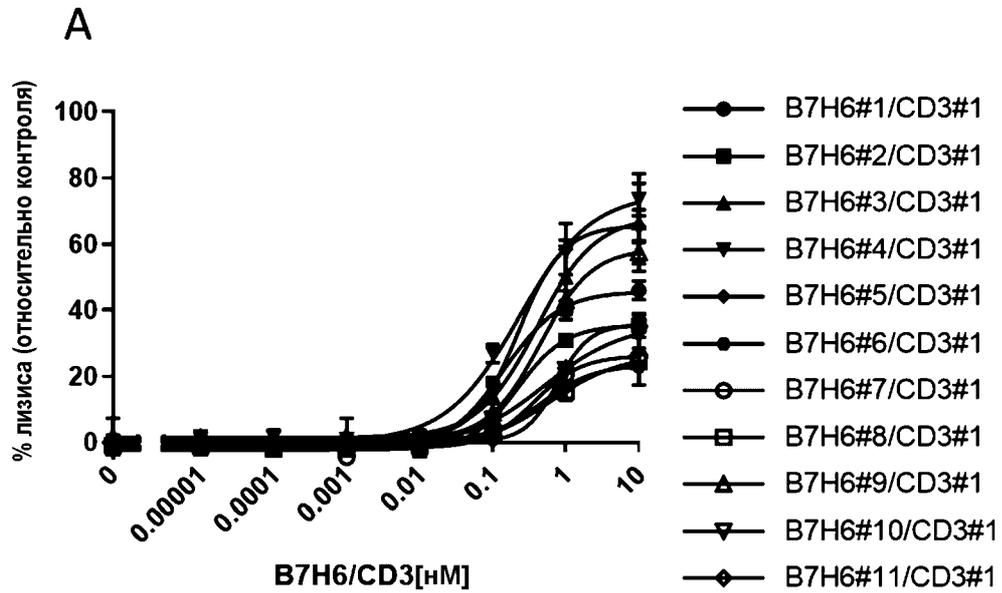
09/24

Фиг. 9



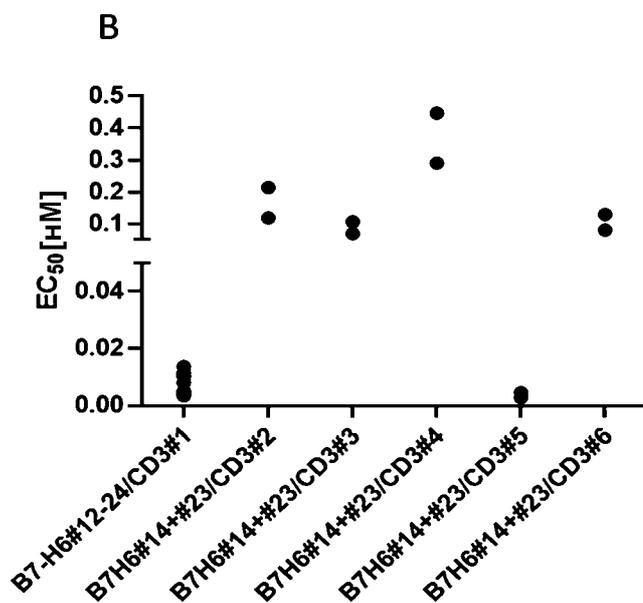
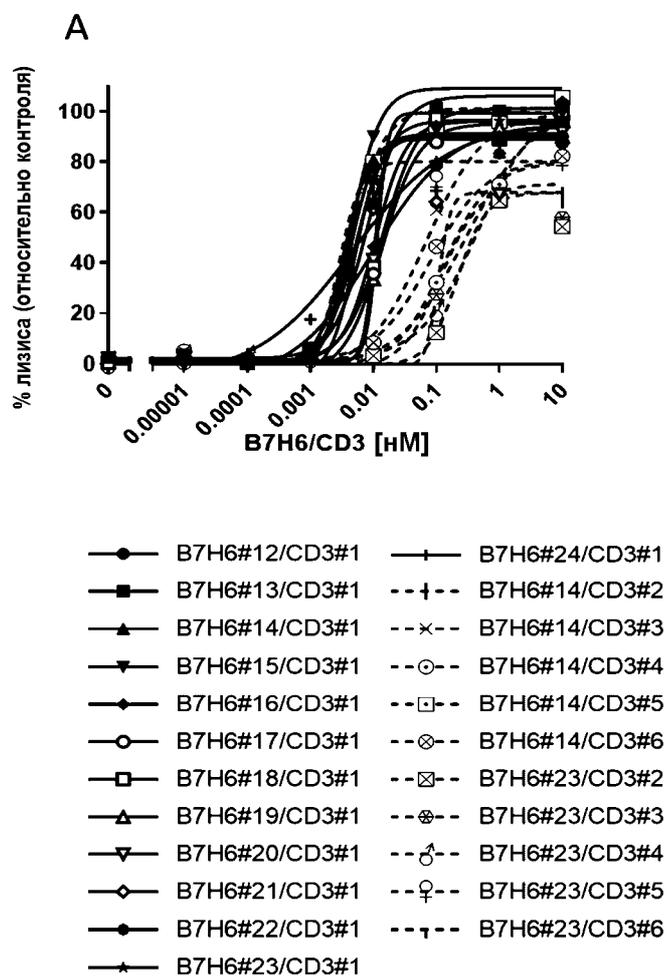
10/24

Фиг. 10



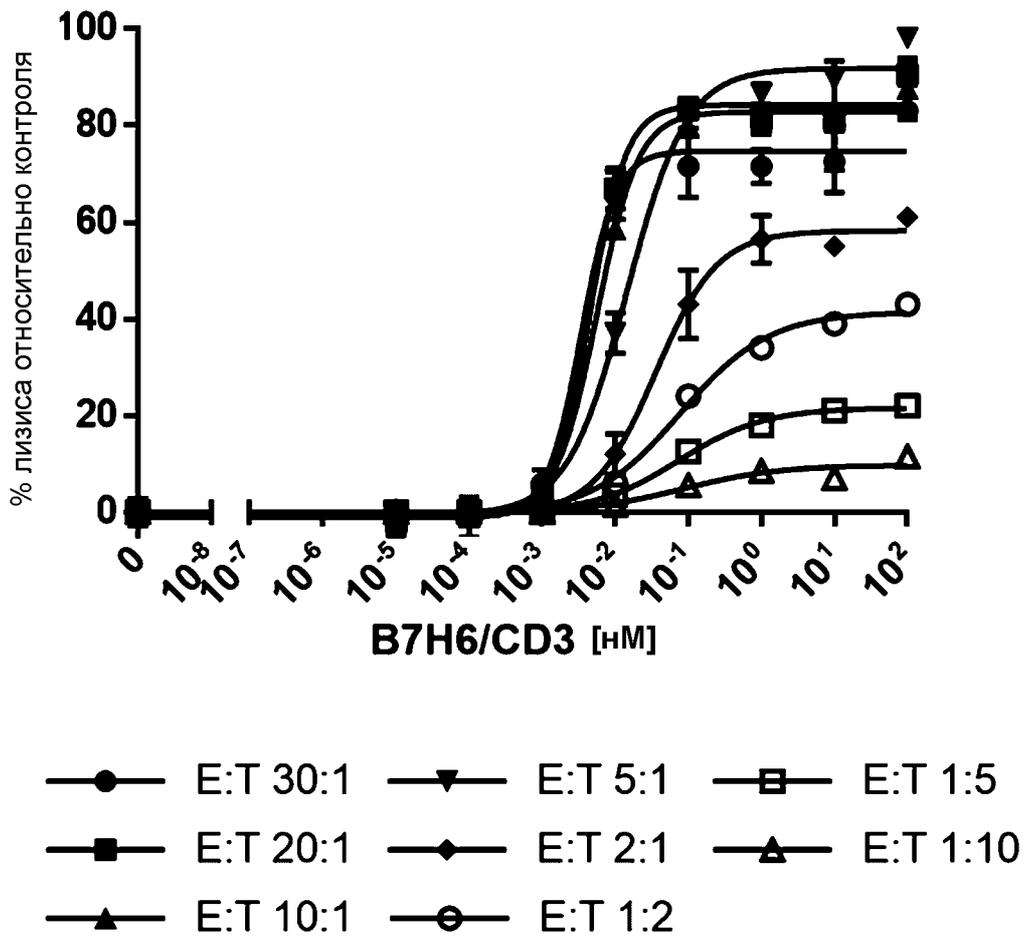
11/24

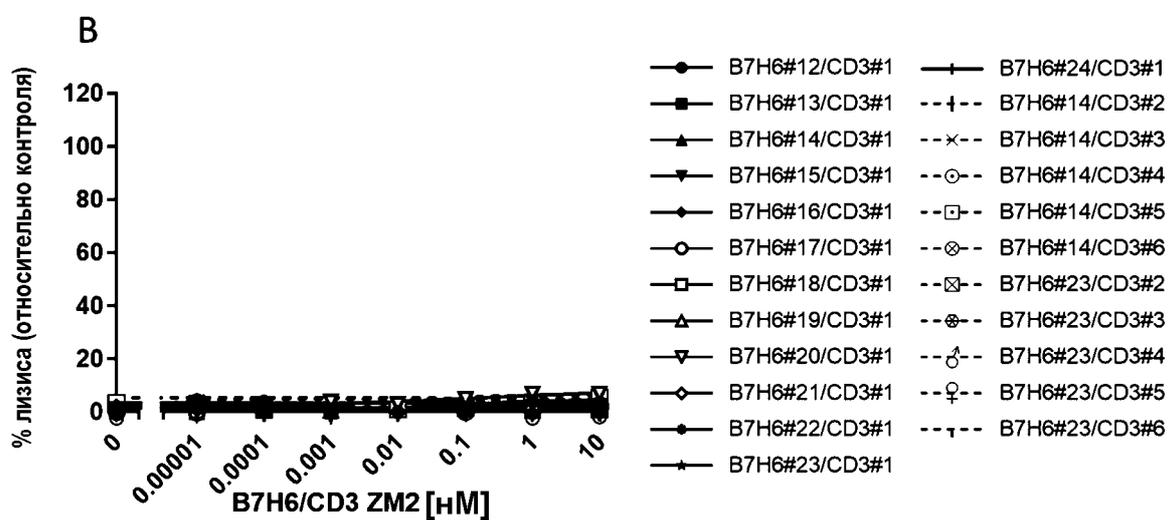
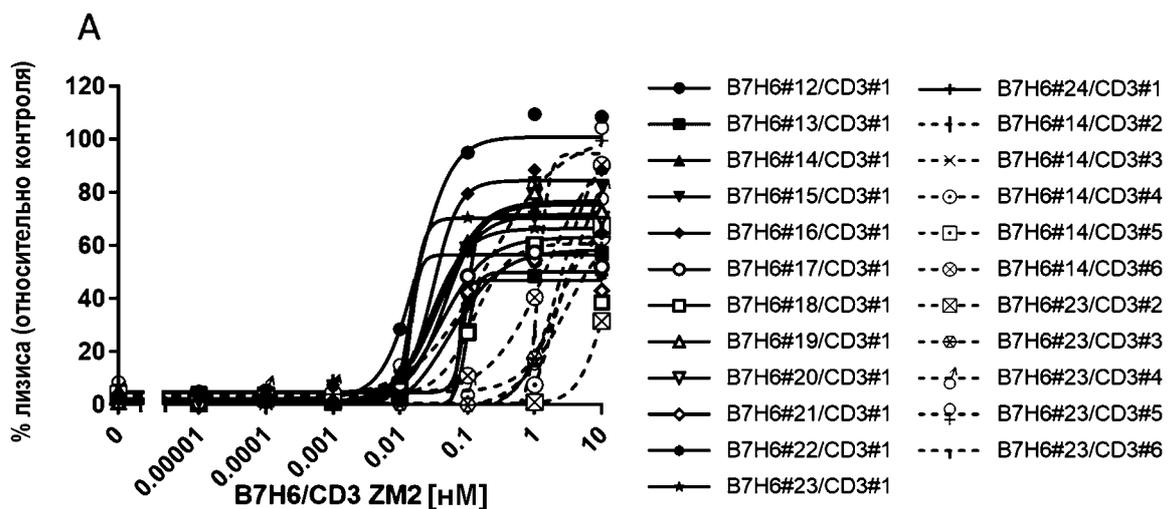
Фиг. 11



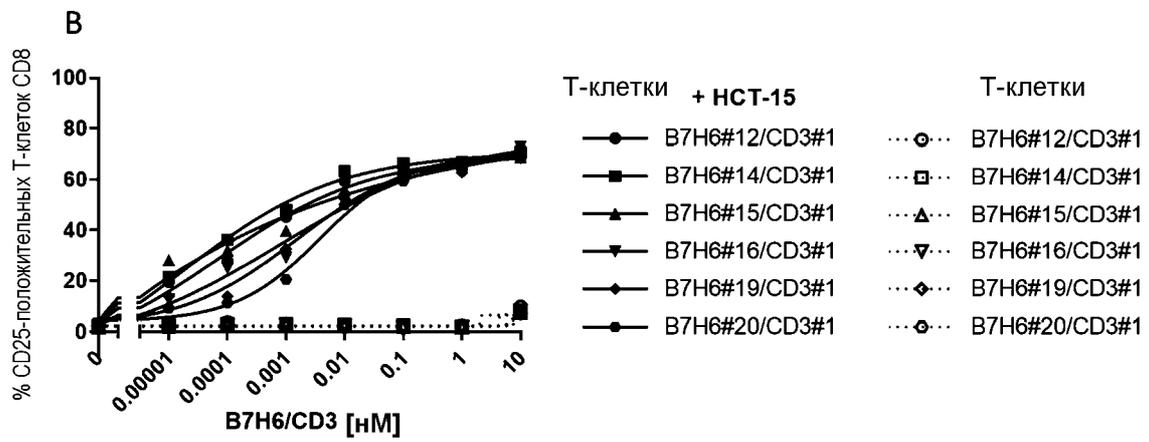
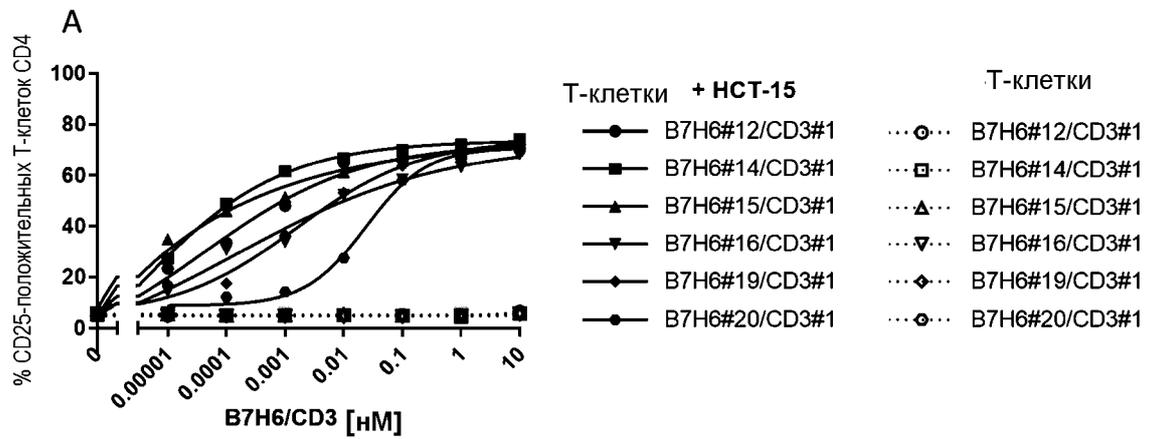
12/24

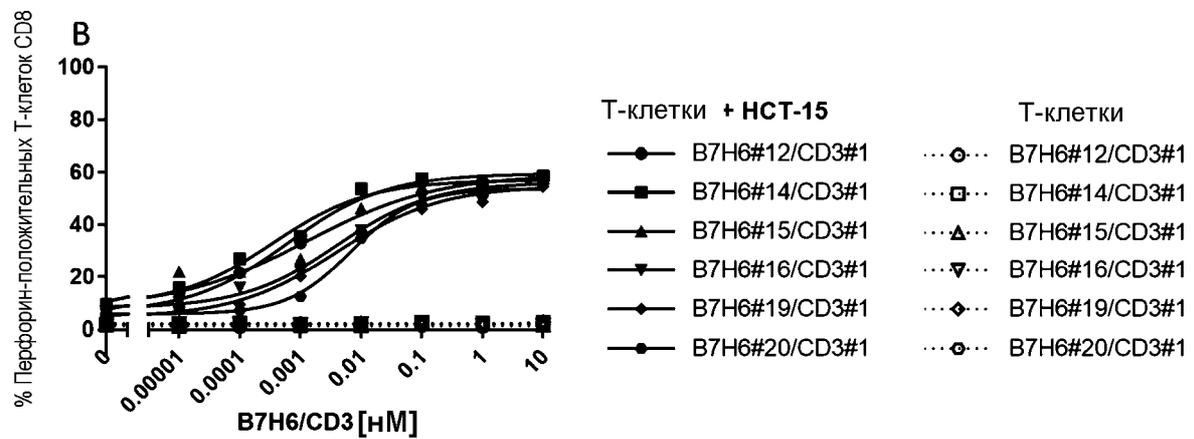
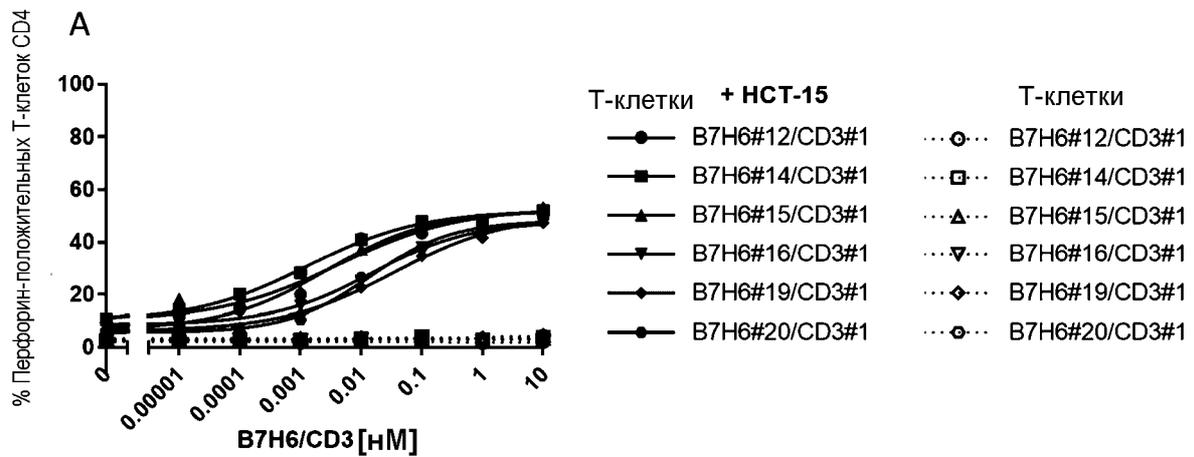
Фиг. 12

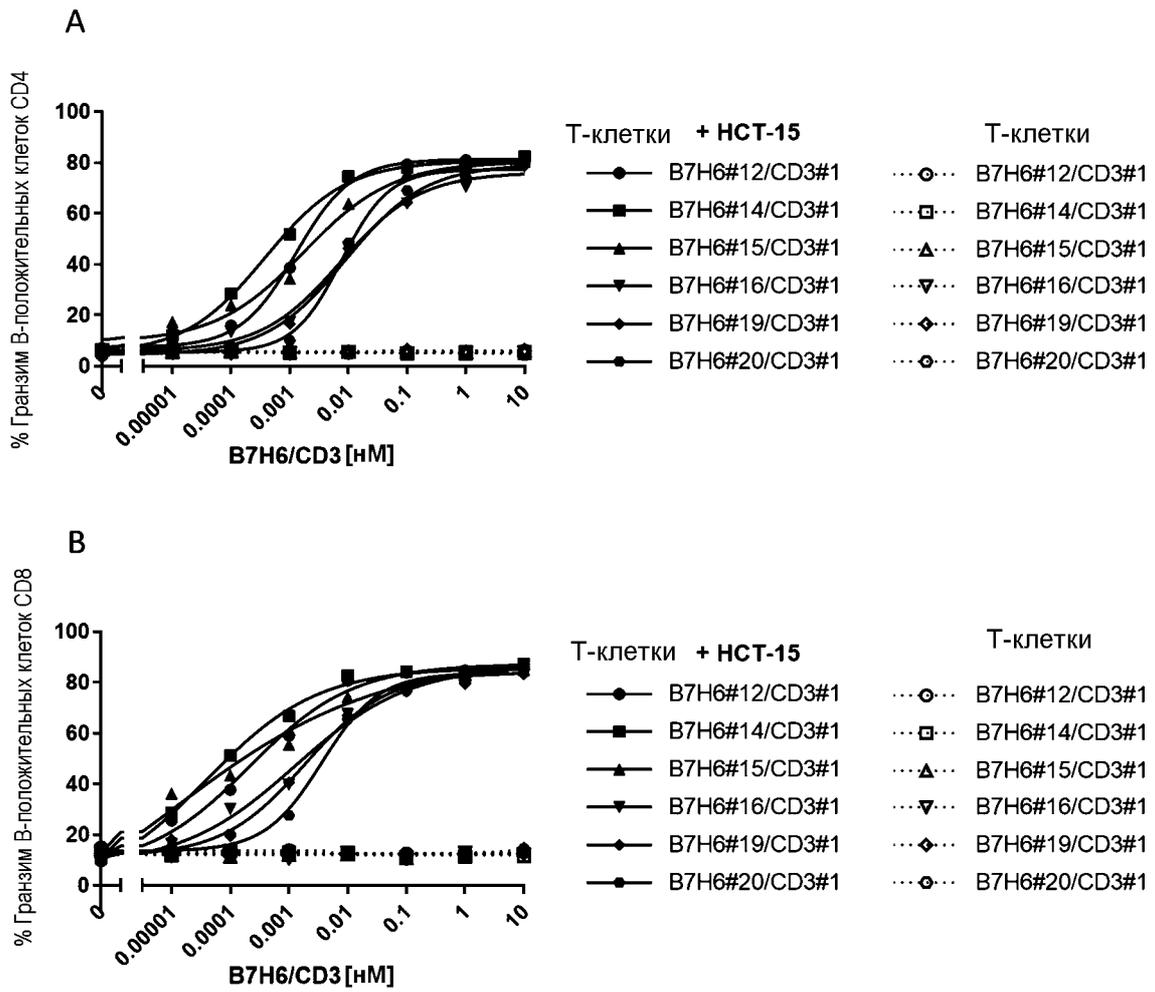


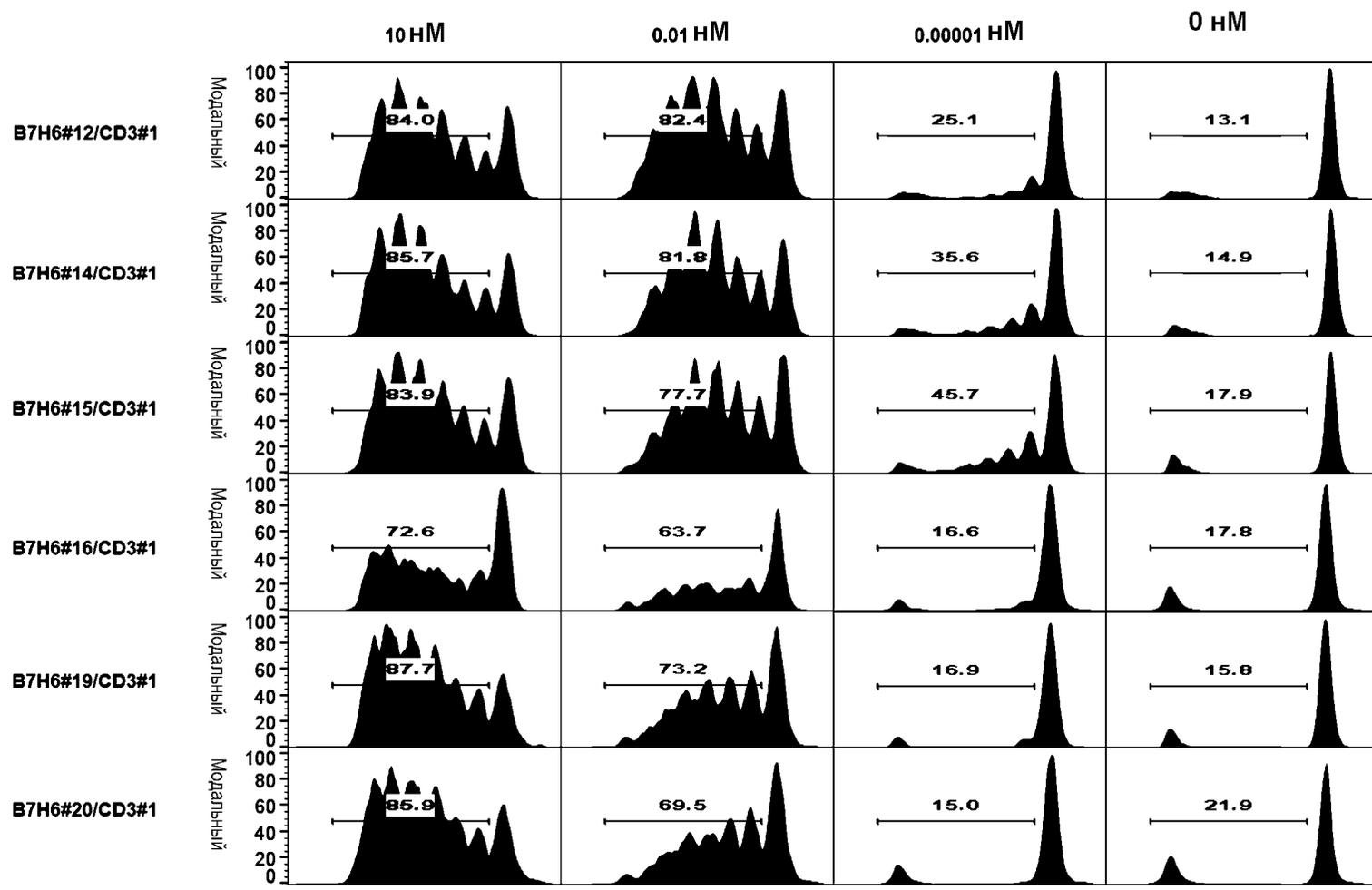


Фиг. 14

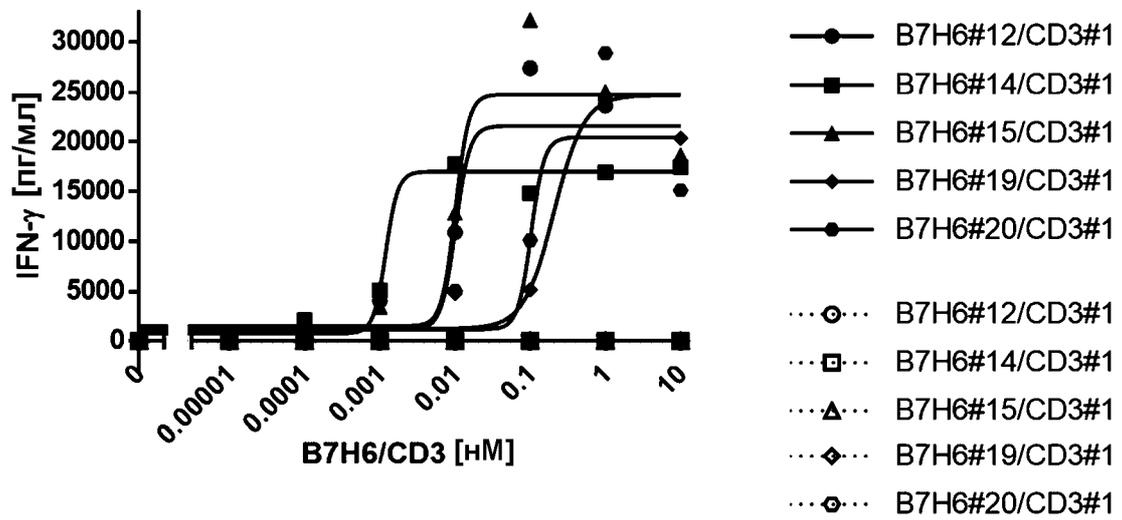






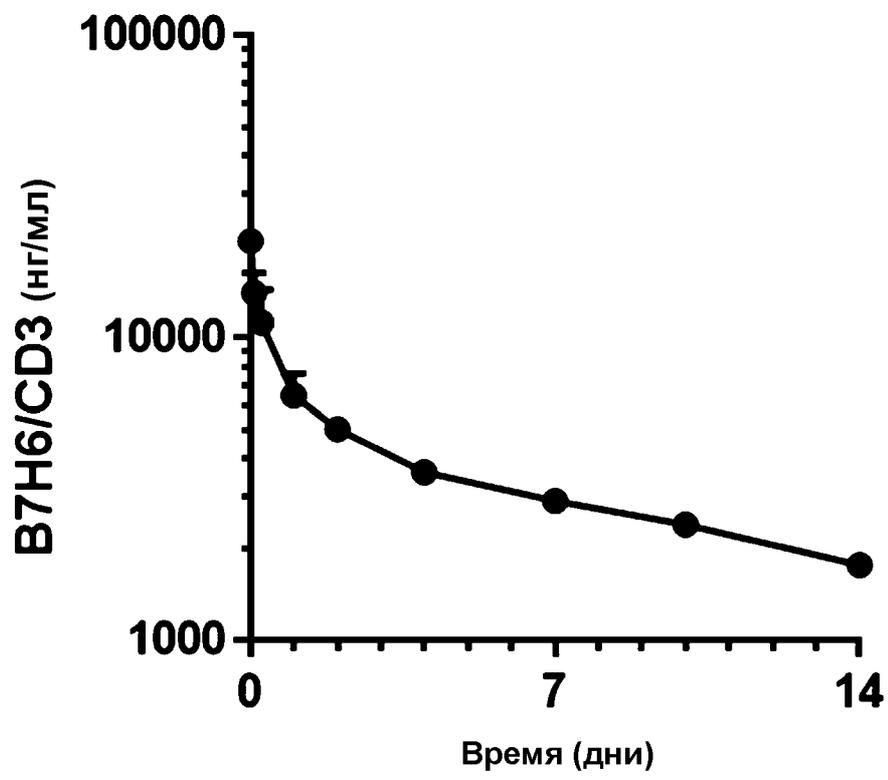


Фиг. 17



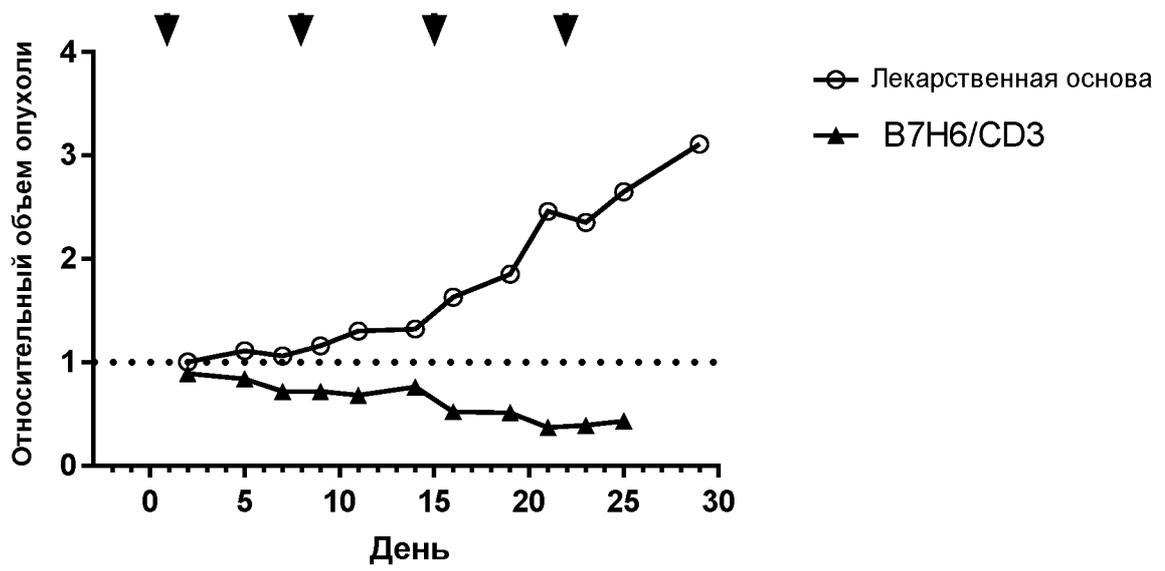
19/24

Фиг. 19

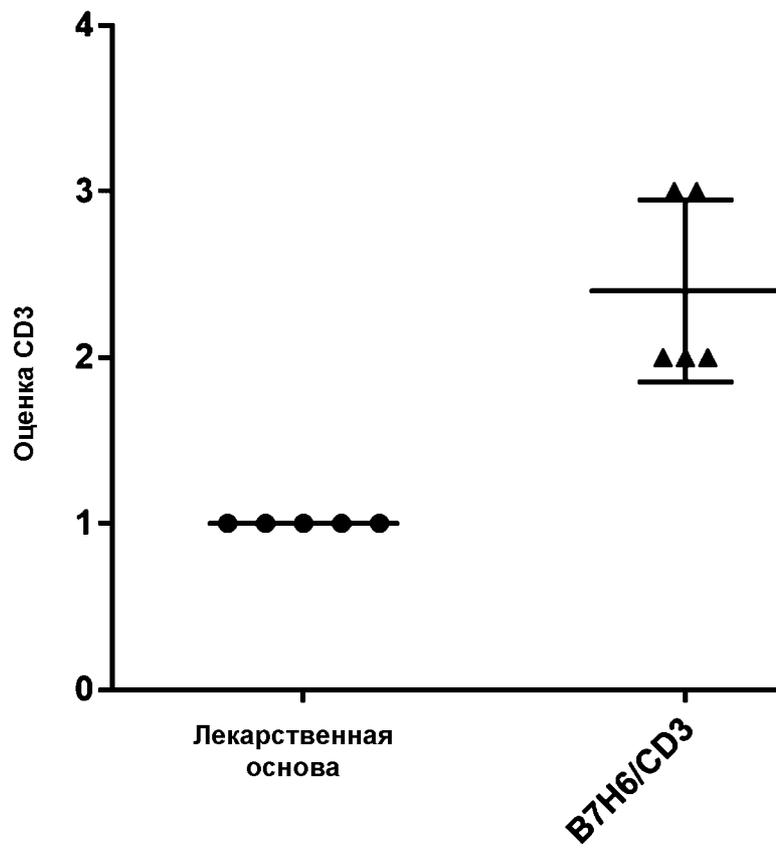


20/24

Фиг. 20

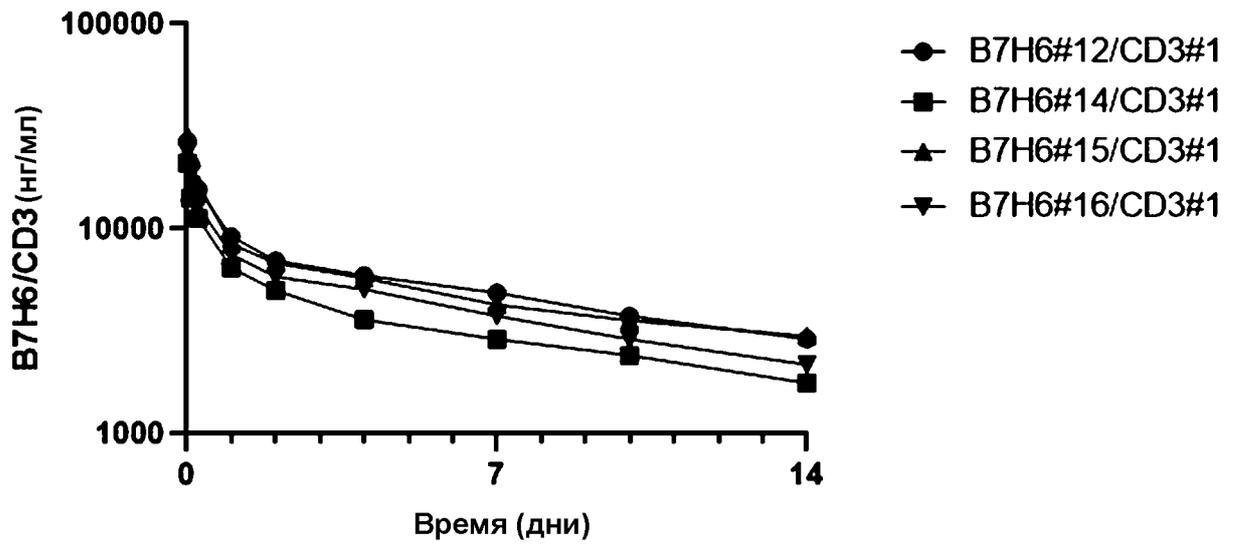


Фиг. 21

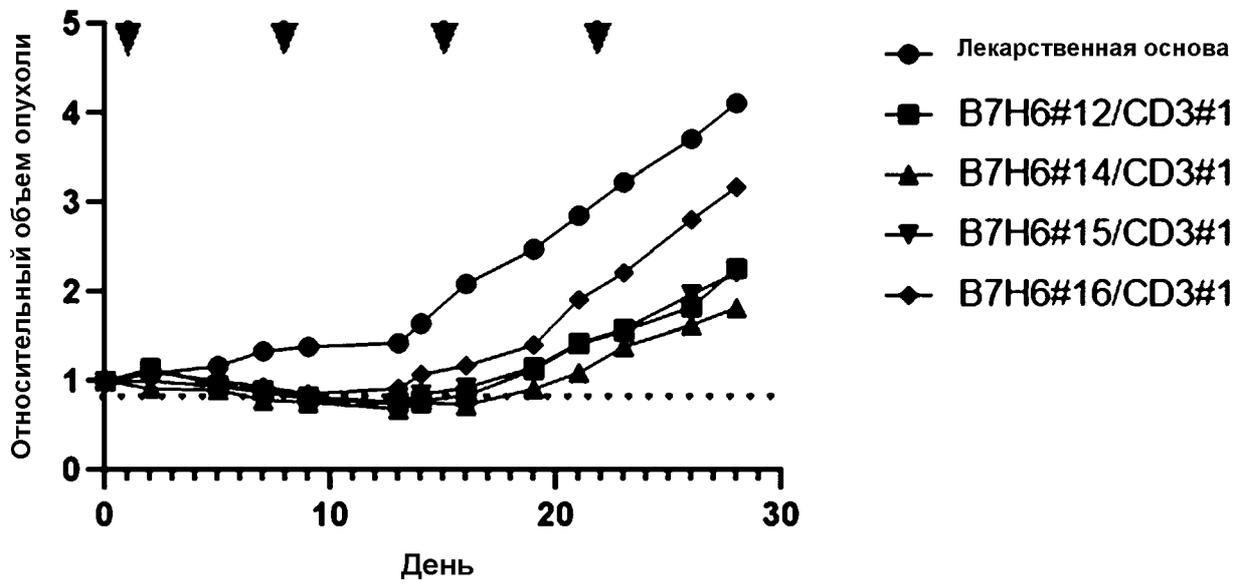


22/24

Фиг. 22



23/24  
Фиг. 23



Фиг. 24

