(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291148 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.08

(22) Дата подачи заявки
2020.10.14

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ NKG2D, CD16 И FLT3

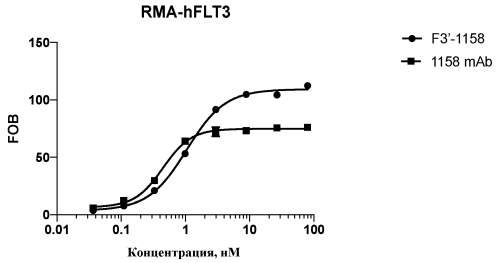
(31) **62/915,123**
(32) **2019.10.15**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/055497**
(87) **WO 2021/076564 2021.04.22**

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

(72) Изобретатель:
Баруах Хеманта, Чанг Грегори П., Ченг Энн Ф., Гринберг Ася, Джуо Зонг Шон, Маккуэйд Томас Дж., Фаллон Дэниэл, Хейни Уильям, О'Нил Стивен, Вей Ронни (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М., Гизатуллина Е.М., Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) Описаны мультиспецифические связывающие белки, которые связывают рецептор NKG2D, CD16 и FLT3, а также фармацевтические композиции и терапевтические способы, применимые для лечения аутоиммунных заболеваний или рака.



202291148 A1

202291148 A1

БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ NKG2D, CD16 И FLT3

В этой заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/915123, поданной 15 октября 2019 года, полное раскрытие которой включено в настоящий документ путем ссылки.

Список последовательностей

Данная заявка включает в полном объеме в качестве ссылочного материала в машиночитаемой форме (CRF) список последовательностей в текстовом формате ASCII. Текстовый файл списка последовательностей под названием «14247-474-888_SEQ_LISTING» создан 5 октября 2020 года и имеет размер 317572 байта.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с NKG2D, CD16 и FLT3.

Предпосылки создания изобретения

Рак продолжает оставаться серьезной проблемой для здоровья, несмотря на существенные усилия по исследованию и научные достижения, описанные в литературе, для лечения этого заболевания. Рак крови и костного мозга являются часто диагностируемыми типами рака, включая множественную миелому, лейкоз и лимфому. Существующие варианты лечения этих типов рака не эффективны для всех пациентов и/или могут иметь существенные побочные эффекты. Другие типы рака также остаются сложными для лечения с использованием существующих терапевтических возможностей.

Иммунотерапия рака желательна, поскольку она является высокоспецифической и может способствовать разрушению раковых клеток с помощью собственной иммунной системы пациента. Белки слияния, такие как привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы, представляют собой описанные в литературе средства иммунотерапии рака, которые связываются с опухолевыми клетками и Т-клетками, содействуя разрушению опухолевых клеток. В литературе описаны антитела, которые связываются с некоторыми опухолеассоциированными антигенами и с некоторыми иммунными клетками. *См., например*, WO 2016/134371 и WO 2015/095412.

Естественные клетки-киллеры (NK) являются компонентом врожденной иммунной системы и составляют приблизительно 15% циркулирующих лимфоцитов.

NK-клетки инфильтрируют практически все ткани и изначально характеризовались своей способностью эффективно убивать опухолевые клетки без необходимости предварительной сенсибилизации. Активированные NK-клетки убивают клетки-мишени способами, сходными с цитотоксическими Т-клетками – *т.е.* с помощью цитолитических гранул, которые содержат перфорин и гранзимы, а также с помощью путей рецепторов смерти. Активированные NK-клетки также секретируют воспалительные цитокины, такие как IFN-γ и хемокины, которые способствуют рекрутированию других лейкоцитов в ткань-мишень.

NK-клетки реагируют на сигналы посредством множества активирующих и ингибирующих рецепторов на своей поверхности. Например, когда NK-клетки сталкиваются со здоровыми собственными клетками, их активность подавляется за счет активации иммуноглобулиноподобных рецепторов клеток-киллеров (KIR). В качестве альтернативы, когда NK-клетки сталкиваются с чужеродными или раковыми клетками, они активируются через свои активирующие рецепторы (*например*, NKG2D, NCR, DNAM1). NK-клетки также активируются константной областью некоторых иммуноглобулинов через рецепторы CD16 на своей поверхности. Общая чувствительность NK-клеток к активации зависит от суммы стимулирующих и ингибирующих сигналов. NKG2D представляет собой трансмембранный белок типа II, который экспрессируется практически всеми естественными клетками-киллерами, где NKG2D служит в качестве активирующего рецептора. NKG2D также обнаруживается на Т-клетках, где он действует в качестве костимулирующего рецептора. Способность модулировать функцию NK-клеток посредством NKG2D является полезной в различных терапевтических контекстах, включая злокачественные новообразования.

Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3), также называемая FLK2, STK1 или CD135, представляет собой рецепторную тирозинкиназу класса III. FLT3 представляет собой трансмембранный белок, включающий множественные иммуноглобулиноподобные домены во внеклеточной области. FLT3 может быть активирован путем связывания FLT3LG, что индуцирует гомодимеризацию и аутофосфорилирование FLT3. Активированный FLT3 впоследствии фосфорилирует и активирует множественные цитоплазматические эффекторные молекулы, такие как Akt, Erk и mTOR, тем самым способствуя клеточной пролиферации и снижая апоптоз. Мутации, которые приводят к конститутивной активации FLT3, наблюдались при остром миелоидном лейкозе и остром лимфобластном лейкозе.

Краткое описание изобретения

Изобретение обеспечивает мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах, и опухолеассоциированным антигеном FLT3. Такие белки могут задействовать более одного типа NK-активирующих рецепторов и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-клетки у людей. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-клетки у людей и у других видов, таких как грызуны и яванские макаки. Также, обеспечены составы, содержащие любой из описанных в настоящем документе белков; клетки, содержащие одну или несколько нуклеиновых кислот, экспрессирующих белки, и способы усиления гибели опухолевых клеток с использованием белков.

Соответственно, один аспект изобретения относится к белку, содержащему:

(a) первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16,

при этом второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область 1 (CDR1), определяющую комплементарность область 2 (CDR2) и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 55, соответственно; и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно;

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 59, 63 и 54, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 86, 66 и 67, соответственно;

(iii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 88 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 91, 92 и 93, соответственно;

(iv) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 97, 99 и 100, соответственно;

и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 101, 102 и 103, соответственно;

(v) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92 и 93, соответственно;

(vi) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 109, 110 и 111, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114, соответственно;

(vii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 117, 118 и 119, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 120, 121 и 122 соответственно;

(viii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92 и 93, соответственно;

(ix) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 33 и 127, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 128, 129 и 130, соответственно; или

(x) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 132, 133 и 134, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 46, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 55, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который

связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 50, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:37, и VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:38. В некоторых вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления VH и VL содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 10; 13 и 10; 17 и 10; 9 и 22; 9 и 26; 9 и 30; 9 и 34; 37 и 38; 41 и 42; 45 и 42; или 49 и 42, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде вариабельного одноцепочечного фрагмента (scFv), где scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 31, 32, 35, 36, 39, 40, 43, 44, 47, 48, 51 и 52.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 59, 63 и 54, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 86, 66 и 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 78, 63, 79, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 80, 66, 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 63, 64, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66, 67, соответственно. В

некоторых вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:76, и VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:77. В некоторых вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84. В некоторых вариантах осуществления VH и VL содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68 и 69; 72 и 73; или 76 и 77, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 70, 71, 74, 75, 81 и 82.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 88 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 91, 92 и 93, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 97, 99 и 100, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 101, 102 и 103, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92 и 93, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 109, 110 и 111, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 117, 118 и 119,

соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 120, 121 и 122, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92 и 93, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 33 и 127, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 128, 129 и 130, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 132, 133 и 134, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 46, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт связывает FLT3 человека с константой диссоциации (K_D), меньшей или равной 20 нМ, при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт связывает FLT3 человека с K_D, меньшей или равной 10 нМ, при измерении с помощью SPR. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт связывает FLT3 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт не конкурирует с FLT3L за связывание FLT3.

В некоторых вариантах осуществления белок содержит Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой Fab-фрагмент, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, представляет собой Fab-фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления белок дополнительно содержит дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, а второй и дополнительные антигенсвязывающие сайты, которые связывают FLT3, каждый, представляют собой Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, а второй и дополнительные антигенсвязывающие сайты, которые связывают FLT3, каждый, представляют собой scFv.

В некоторых вариантах осуществления scFv, который связывает FLT3, и/или scFv, который связывает NKG2D, содержат вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления scFv связан с константным доменом антитела или его частью, достаточной для связывания CD16, посредством шарнира, содержащего Ala-Ser или Gly-Ser. В некоторых вариантах осуществления шарнир дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи scFv образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи scFv. В некоторых вариантах осуществления дисульфидный мостик образован между C44 вариабельного домена тяжелой цепи и C100 вариабельного домена легкой цепи, пронумерованными в соответствии с нумерацией по Кэбату. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи scFv связан с вариабельным доменом легкой цепи scFv посредством гибкого линкера. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит $(G4S)_4$. В некоторых вариантах осуществления в scFv вариабельный домен тяжелой цепи расположен на C-конце вариабельного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления в scFv вариабельный домен тяжелой цепи расположен на N-конце вариабельного домена легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления Fab не расположен между антигенсвязывающим сайтом и Fc или его частью.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 270 или 271, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит:

(i) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 255 или 256, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно; или

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 243 или 244, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления VH первого антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:254, и VL первого антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления VH первого антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:254, и VL первого антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:239.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела представляет собой Fc-домен антитела IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела или его часть содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:136.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна полипептидная цепь Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций относительно SEQ ID NO:136 в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EC. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна полипептидная цепь Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций относительно SEQ ID NO:136, выбранных из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K,

F405A, F405T, Y407A, Y409F, K409F, K409F, K409F, K409F, K409F, K409F, K409, K409, K409, K409, K409, K409 и K439E, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EC. В некоторых вариантах осуществления одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций относительно SEQ ID NO:136 в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций относительно SEQ ID NO:136 в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, S364, T366, L368. , K370, N390, K392, T394, D399, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EC. В некоторых вариантах осуществления одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены K360E и K409W относительно SEQ ID NO:136; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены Q347R, D399V и F405T относительно SEQ ID NO:136, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EC. В некоторых вариантах осуществления одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену Y349C относительно SEQ ID NO:136; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену S354C относительно SEQ ID NO:136, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EC.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую описанный в настоящем документе белок и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает клетку, содержащую одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих раскрытый в настоящем документе белок.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ усиления гибели опухолевых клеток, при этом способ включает подвергание опухолевых клеток и естественных клеток-киллеров воздействию эффективного количества белка или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем документе.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака, при этом способ включает введение эффективного количества белка или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем документе, нуждающемуся в этом пациенту.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), острого лимфобластного лейкоза (ALL), миелодисплазии, острого Т-лимфобластного лейкоза и острого промиелоцитарного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления рак экспрессирует FLT3.

Различные аспекты и варианты осуществления изобретения более подробно описаны ниже.

Краткое описание чертежей

На **ФИГ. 1** представлено гетеродимерное мультиспецифическое антитело, *например*, триспецифический связывающий белок (TriNKET). Каждое плечо может представлять либо NKG2D-связывающий домен, либо связывающий домен, соответствующий FLT3. В некоторых вариантах осуществления NKG2D-связывающий домен и FLT3-связывающие домены могут иметь общую легкую цепь.

На **ФИГ. 2A-2E** показано пять иллюстративных форматов мультиспецифического связывающего белка, *например*, триспецифического связывающего белка (TriNKET). Как показано на **ФИГ. 2A**, либо NKG2D-связывающий домен, либо FLT3-связывающий домен могут иметь формат scFv (левое плечо). Антитело, которое содержит scFv, нацеленный на NKG2D, Fab-фрагмент, нацеленный на FLT3, и константную область гетеродимеризованного антитела, называется в настоящем документе F3-TriNKET. Антитело, которое содержит scFv, нацеленный на FLT3, Fab-фрагмент, нацеленный на NKG2D, и константную область/домен гетеродимеризованного антитела, которое связывает CD16, называется в настоящем документе F3'-TriNKET (**ФИГ. 2E**). Как показано на **ФИГ. 2B**, как NKG2D-связывающий домен, так и FLT3-связывающий домен могут иметь формат scFv. На **ФИГ. 2C-2D** показано антитело с тремя антигенсвязывающими сайтами, включая два антигенсвязывающих сайта, которые связывают FLT3, и NKG2D-связывающий сайт, слитый с константной областью гетеродимеризованного антитела. Эти форматы антител называются в настоящем документе F4-TriNKET. На **ФИГ. 2C** показано, что два FLT3-связывающих сайта находятся в формате Fab-фрагмента, а NKG2D-связывающий сайт находится в формате scFv. На **ФИГ. 2D** показано, что FLT3-связывающие сайты находятся в формате scFv, и NKG2D-связывающий сайт находится в формате scFv. На **ФИГ. 2E** показано триспецифическое антитело (TriNKET), которое

содержит scFv, нацеленный на опухоль, Fab-фрагмент, нацеленный на NKG2D, и константную область/домен гетеродимеризованного антитела («CD-домен»), который связывает CD16. Формат антитела называется в настоящем документе как F3'-TriNKET. В некоторых иллюстративных мультиспецифических связывающих белках мутации гетеродимеризации в константной области антитела включают K360E и K409W на одном константном домене; и Q347R, D399V и F405T на противоположном константном домене (показан в виде треугольной формы «ключа и замка» в доменах CD). Жирная полоса между вариабельными доменами тяжелой и легкой цепей Fab-фрагментов представляет дисульфидную связь.

На ФИГ. 3 представлен TriNKET в форме Triomab, которое представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, сохраняющее IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух половинных антител, каждое из которых имеет одну легкую и одну тяжелую цепь, которые происходят от двух родительских антител. Форма Triomab может представлять собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 1/2 крысиного антитела и 1/2 мышиного антитела.

На **ФИГ. 4** показан TriNKET в форме общей легкой цепи KiH, которая включает технологию «выступы-в-полости» (KIH). KiH представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. TriNKET в формате KiH может представлять собой гетеродимерную конструкцию с 2 Fab-фрагментами, связывающимися с мишенью 1 и мишенью 2, содержащими две разные тяжелые цепи и общую легкую цепь, которая спаривается с обеими тяжелыми цепями.

На **ФИГ. 5** показан TriNKET в форме иммуноглобулина с двойным вариабельным доменом (DVD-Ig™), который объединяет мишень-связывающие домены двух моноклональных антител через гибкие встречающиеся в природе линкеры, и дает четырехвалентную IgG-подобную молекулу. DVD-Ig™ представляет собой гомодимерную конструкцию, в которой вариабельный домен, нацеленный на антиген 2, слит с N-концом вариабельного домена Fab-фрагмента, нацеленного на антиген 1. Форма DVD-Ig™ содержит нормальный Fc.

На **ФИГ. 6** показан TriNKET в форме интерфейса ортогонального Fab-фрагмента (Ortho-Fab), который представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 2 Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитыми с Fc. Спаривание легкая цепь (LC)-тяжелая цепь (HC) обеспечивается ортогональным интерфейсом. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

На **ФИГ. 7** представлен TriNKET в формате Ig 2-в-1.

На **ФИГ. 8** представлен TriNKET в форме ES, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два разных Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитыми с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается электростатическими управляющими мутациями в Fc.

На **ФИГ. 9** представлен TriNKET в форме обмена Fab-фрагментами: антитела, которые обмениваются Fab-фрагментами путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (половинной молекулы) на пару тяжелой-легкой цепей из другой молекулы, что приводит к получению биспецифических антител. Форма обмена Fab-фрагментами (cFae) представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации.

На **ФИГ. 10** представлен TriNKET в форме SEED body, который представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации.

На **ФИГ. 11** представлен TriNKET в форме LuZ-Y, в которой используется лейциновая молния для индукции гетеродимеризации двух разных HC. Форма LuZ-Y представляет собой гетеродимер, содержащий два разных scFab, связывающихся с мишенью 1 и 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается за счет мотивов лейциновой молнии, слитых с C-концом Fc.

На **ФИГ. 12** представляет TriNKET в форме Cov-X-Body.

На **ФИГ. 13A-13B** представлен TriNKET в формах κλ-Body, который представляют собой гетеродимерные конструкции с двумя разными Fab-фрагментами, слитыми с Fc, стабилизированными мутациями гетеродимеризации: один Fab-фрагмент, нацеленный на антиген 1, содержит каппа-LC, а второй Fab-фрагмент, нацеленный на антиген 2, содержит лямбда LC. На ФИГ. 13A в качестве примера показана одна из форм κλ-Body; На ФИГ. 13B в качестве примера показана другая форма κλ-Body.

На **ФИГ. 14** представлена гетеродимерная конструкция Oasc-Fab, которая включает Fab-фрагмент, связывающийся с мишенью 1, и scFab, связывающийся с мишенью 2, оба из которых слиты с Fc-доменом. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc-домене.

На **ФИГ. 15** представлено DuetMab, представляющее собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два разных Fab-фрагмента, связывающихся с антигенами 1

и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. Fab-фрагменты 1 и 2 содержат дифференциальные мостики S-S, которые обеспечивают правильное спаривание легкой цепи и тяжелой цепи.

На **ФИГ. 16** представлено CrossmAb, представляющее собой гетеродимерную конструкцию с двумя разными Fab-фрагментами, связывающимися с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированным мутациями гетеродимеризации. Домены CL и CH1, а также домены VH и VL переключаются, *например*, CH1 сливается в линию с VL, а CL сливается в линию с VH.

На **ФИГ. 17** представлен Fit-Ig, представляющий собой гомодимерную конструкцию, в которой Fab-фрагмент, связывающийся с антигеном 2, слит с N-концом HC Fab-фрагмента, который связывается с антигеном 1. Конструкция содержит Fc дикого типа.

На **ФИГ. 18** представлен набор сенсограмм, показывающих SPR-профили антител, собранных из супернатантов мышиных гибридом, связывающихся с hFLT3.

На **ФИГ. 19** представлен набор сенсограмм, показывающих профили SPR антител, собранных из субклонов mAb мыши, связывающихся с hFLT3.

На **ФИГ. 20** представлена гистограмма, показывающая снижение способности антител-кандидатов связывать FLT3-экспрессирующие раковые клетки EOL-1 за счет насыщающих концентраций растворимого FLT3-лиганда.

На **ФИГ. 21A-21C** представлены линейные графики, показывающие связывание TriNKET F3'-1158, нацеленного на FLT3, и его исходного моноклонального антитела с FLT3-экспрессирующими клеточными линиями RMA-hFLT3 (**ФИГ. 21A**), RMA-cFLT3 (**ФИГ. 21B**) и REH (**ФИГ. 21C**).

На **ФИГ. 22A-22B** представлены линейные графики, показывающие связывание TriNKET F3'-1158, нацеленного на FLT3, и его исходного моноклонального антитела с клетками MOLM-13, которые экспрессировали FLT3 с мутацией T227M (**ФИГ. 22A**), и клетками MV4-11, которые экспрессировали FLT2 с мутацией ITD.

На **ФИГ. 23A-23B** представлены линейные графики, показывающие интернализацию TriNKET F3'-1158, нацеленного на FLT3, и его исходного моноклонального антитела в FLT3-экспрессирующие клеточные линии REH (**ФИГ. 23A**) и EOL-1 (**ФИГ. 23B**).

На **ФИГ. 24A-24D** представлены гистограммы, показывающие опосредованный NK-клетками лизис FLT3-экспрессирующих линий раковых клеток EOL-1 (**ФИГ. 24A**),

REH (**ФИГ. 24B**), RS4-11 (**ФИГ. 24C**) и MV4-11 (**ФИГ. 24D**) в присутствии TriNKET F3'-1158 и его исходного моноклонального антитела.

На **ФИГ. 25** представлен линейный график, отражающий опосредованный NK-клетками лизис FLT3-экспрессирующей линии раковых клеток REH в присутствии TriNKET F3'-1158, его NKG2D-мертвого варианта («F3'-1158 мертвый-2D»), его Fc-молчащего варианта («F3'-1158si») или его исходного моноклонального антитела 1158 mAb.

На **ФИГ. 26** представлен линейный график, показывающий опосредованный CD8 Т-клетками лизис FLT3-экспрессирующей клеточной линии RS4-11 острого лимфобластного лейкоза в присутствии TriNKET F3'-1158 и его исходного моноклонального антитела.

На **ФИГ. 27** представлен набор гистограмм, показывающих связывание TriNKET F3'-1158 и его исходного моноклонального антитела с клетками крови.

На **ФИГ. 28A-28B** представлены гистограммы, показывающие фосфорилирование FLT3 с помощью TriNKET F3'-1158 и исходного моноклонального антитела в отсутствие (**ФИГ. 28A**) или в присутствии (**ФИГ. 28B**) FLT3-лиганда. Образец FLT3-лиганда на ФИГ. 7A служит в качестве положительного контроля.

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, которые связывают рецептор NKG2D и рецептор CD16 на естественных клетках-киллерах, и опухолеассоциированный антиген FLT3. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки дополнительно включают дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3. Изобретение также обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие такие мультиспецифические связывающие белки, и терапевтические способы, в которых используются такие мультиспецифические белки и фармацевтические композиции, для таких целей, как лечение аутоиммунных заболеваний и рака. Различные аспекты изобретения изложены ниже в разделах; однако аспекты изобретения, описанные в одном конкретном разделе, не должны ограничиваться каким-либо конкретным разделом.

Далее представлены определения ряда терминов и выражений для облегчения понимания настоящего изобретения.

Используемые в настоящем документе термины «a» и «an» означают «один или несколько» и включают множественное число, если только контекст не является неподходящим.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающий сайт» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. В антителах человека антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых вариабельных («V») областей тяжелой («H») и легкой («L») цепей. Три сильно расходящихся участка в пределах V-областей тяжелой и легкой цепей называются «гипервариабельными областями», которые расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как «каркасные области» или «FR». Таким образом, термин «FR» относится к аминокислотным последовательностям, которые естественным образом обнаруживаются между гипервариабельными областями иммуноглобулинов и рядом с ними. В молекуле человеческого антитела три гипервариабельных участка легкой цепи и три гипервариабельных участка тяжелой цепи расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве, образуя антигенсвязывающую поверхность. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связанного антигена, а три гипервариабельных участка каждой из тяжелой и легкой цепей называются «определяющими комплементарность областями» или «CDR». У некоторых животных, таких как верблюды и хрящевые рыбы, антигенсвязывающий сайт образован одной цепью антитела, обеспечивающей «однодоменное антитело». Антигенсвязывающие сайты могут существовать в интактном антителе, в антигенсвязывающем фрагменте антитела, которое сохраняет антигенсвязывающую поверхность, или в рекомбинантном полипептиде, таком как scFv, с использованием пептидного линкера для соединения вариабельного домена тяжелой цепи с вариабельным доменом легкой цепи в одном полипептиде.

Термин «опухолеассоциированный антиген», используемый в настоящем документе, означает любой антиген, включая, но без ограничения, белок, гликопротеин, ганглиозид, углевод, липид, который ассоциирован с раком. Такой антиген может экспрессироваться на злокачественных клетках или в микроокружении опухоли, например, на опухолеассоциированных кровеносных сосудах, внеклеточном матриксе, мезенхимальной строме или иммунных инфильтратах.

Используемые в настоящем документе термины «субъект» и «пациент» относятся к организму, подлежащему лечению с помощью способов и композиций, описанных в настоящем документе. Такие организмы предпочтительно включают, но без ограничения, млекопитающих (*например*, мышей, обезьян, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, собак, кошек и т.п.) и более предпочтительно включают людей.

Используемый в настоящем документе термин «эффективное количество» относится к количеству соединения (*например*, соединения по настоящему изобретению), достаточному для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество можно вводить за один или несколько приемов, применений или доз, и не предполагается его ограничение конкретным составом или путем введения. Используемый в настоящем документе термин «лечение» включает любой эффект, *например*, ослабление, уменьшение, модулирование, улучшение или устранение, который приводит к улучшению состояния, заболевания, нарушения и т.п., или к облегчению их симптомов.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтическая композиция» относится к комбинации активного агента с носителем, инертным или активным, что делает композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, таких как забуференный фосфатом физиологический раствор, вода, эмульсии (*например*, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло), и различные типы смачивающих агентов. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов *см., например*, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к любой фармацевтически приемлемой соли (*например*, кислоте или основанию) соединения по настоящему изобретению, которая при введении субъекту способна давать соединение по настоящему изобретению, или его активный метаболит или остаток. Как известно специалистам в данной области, «соли» соединений по настоящему изобретению могут быть получены из неорганических или органических кислот и оснований. Примеры кислот включают, но без ограничения, хлористоводородную, бромистоводородную, серную, азотную, хлорную, фумаровую, малеиновую, фосфорную, гликолевую, молочную, салициловую, янтарную, толуол-п-сульфоновую, винную, уксусную, лимонную, метансульфоновую, этансульфоновую, муравьиную, бензойную, малоновую, нафталин-2-сульфоновую, бензолсульфоновую кислоту и т.п. Другие кислоты, такие как щавелевая, хотя сами по себе не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть использованы для получения солей,

полезных в качестве промежуточных соединений при получении соединений по изобретению и их фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей.

Примеры оснований включают, но без ограничения, гидроксиды щелочных металлов (например, натрия), гидроксиды щелочноземельных металлов (например, магния), аммиак и соединения формулы NW_4^+, где W представляет собой C_{1-4} алкил, и т.п.

Примеры солей включают, но без ограничения: ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, флукогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, пальмоат, пектинат, персульфат, фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозила, ундеканоат и т.п. Другие примеры солей включают анионы соединений по настоящему изобретению, соединенные с подходящим катионом, таким как Na^+, NH_4^+ и NW_4^+ (где W представляет собой C_{1-4} алкильную группу) и т.п.

Для терапевтического применения соли соединений по настоящему изобретению считаются фармацевтически приемлемыми. Однако соли кислот и оснований, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут найти применение, например, при получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения.

Используемый в настоящем документе термин «FLT3» (также известный как FLK2, STK1 или CD135) относится к белку в базе данных Uniprot под номером доступа P36888 и родственным изоформам.

Используемый в настоящем документе термин «FLT3L» (также известный как FLT3-лиганд) относится к белку в базе данных Uniprot под номером доступа P49771 и родственным изоформам.

На протяжении всего описания, где композиции описываются как имеющие, включающие или содержащие определенные компоненты, или где процессы и способы описываются как имеющие, включающие или содержащие определенные стадии, предполагается, что, кроме того, существуют композиции по настоящему изобретению, которые в основном состоят или состоят из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы в соответствии с настоящим изобретением, которые в основном состоят или состоят из указанных стадий обработки.

Как правило, композиции, в которых указано процентное содержание, даны по массе, если не указано иное. Кроме того, если переменная не сопровождается определением, то превалирует предыдущее определение переменной.

I. БЕЛКИ

Изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах, а также с опухолеассоциированным антигеном FLT3. Мультиспецифические связывающие белки применимы в фармацевтических композициях и терапевтических способах, описанных в настоящем документе. Связывание мультиспецифических связывающих белков с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественной клетке-киллере усиливает активность естественной клетки-киллера в отношении разрушения опухолевых клеток, экспрессирующих FLT3. Связывание мультиспецифических связывающих белков с FLT3-экспрессирующими опухолевыми клетками приводит эти клетки в непосредственную близость с естественной клеткой-киллером, что облегчает прямое и косвенное разрушение опухолевых клеток естественной клеткой-киллером. Мультиспецифические связывающие белки, которые связывают NKG2D, CD16 и другую мишень, раскрыты в международных публикациях заявок №№ WO2018148445 и WO2019157366, которые не включены в настоящий документ путем ссылки. Дополнительное описание некоторых иллюстративных мультиспецифических связывающих белков представлено ниже.

Первый компонент мультиспецифического связывающего белка представляет собой антигенсвязывающий сайт, который связывается с клетками, экспрессирующими рецептор NKG2D, которые могут включать, но без ограничения, NK-клетки, γδ-Т-клетки и $CD8^+$ αβ-Т-клетки. При связывании NKG2D мультиспецифические связывающие белки могут блокировать природные лиганды, такие как ULBP6 и MICA, от связывания с NKG2D и активации NK-клеток.

Второй компонент мультиспецифических связывающих белков представляет собой антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3. FLT3-экспрессирующие клетки могут быть обнаружены, например, при остром миелоидном лейкозе (AML) и остром лимфобластном лейкозе (ALL). FLT3-экспрессирующие клетки могут быть обнаружены в ассоциации с другими типами рака и опухолей, например, гематологическими злокачественными новообразованиями, лейкозом, острым миелоидным лейкозом (AML), острым лимфобластным лейкозом (ALL),

миелодисплазией, острым Т-лимфобластным лейкозом и острым промиелоцитарным лейкозом.

Третьим компонентом мультиспецифических связывающих белков является Fc-домен антитела или его часть, или антигенсвязывающий сайт, который связывается с клетками, экспрессирующими CD16, Fc-рецептор на поверхности лейкоцитов, включая естественные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки.

Дополнительный антигенсвязывающий сайт мультиспецифических связывающих белков может связывать FLT3. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, а второй и дополнительные антигенсвязывающие сайты связывают FLT3, каждый из которых представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, а второй и дополнительные антигенсвязывающие сайты связывают FLT3, каждый из которых представляет собой scFv.

Каждый из антигенсвязывающих сайтов может включать вариабельный домен тяжелой цепи антитела и вариабельный домен легкой цепи антитела (*например*, расположенные в антителе или слитые вместе с scFv), или один или несколько антигенсвязывающих сайтов могут представлять собой однодоменное антитело, такое как антитело V_HH, такое как верблюжье антитело, или антитело V_{NAR}, подобное обнаруженным у хрящевых рыб.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт включает вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности вариабельного домена легкой цепи, присутствующего в первом антигенсвязывающем сайте.

Мультиспецифические связывающие белки, описанные в настоящем документе, могут иметь различные форматы. Например, один формат представляет собой гетеродимерное мультиспецифическое антитело, включающее первую тяжелую цепь иммуноглобулина, первую легкую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и вторую легкую цепь иммуноглобулина (ФИГ. 1). Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), первый вариабельный домен тяжелой цепи и необязательно первый домен тяжелой цепи CH1. Первая легкая цепь иммуноглобулина включает первый вариабельный домен легкой цепи и необязательно первый константный домен легкой цепи. Первая легкая цепь

иммуноглобулина вместе с первой тяжелой цепью иммуноглобулина образует антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина содержит второй Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), второй вариабельный домен тяжелой цепи и необязательно второй домен тяжелой цепи CH1. Вторая легкая цепь иммуноглобулина включает второй вариабельный домен легкой цепи и необязательно второй константный домен легкой цепи. Вторая легкая цепь иммуноглобулина вместе со второй тяжелой цепью иммуноглобулина образует антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе способны связываться с CD16 (ФИГ. 1). В некоторых вариантах осуществления первая легкая цепь иммуноглобулина идентична второй легкой цепи иммуноглобулина.

Другой типичный формат включает гетеродимерное мультиспецифическое антитело, включающее первую тяжелую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина (ФИГ. 2A). Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), слитый посредством либо линкера, либо шарнира антитела с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), состоящим из вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, которые соединяются и связывают NKG2D или связывают FLT3. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина включает второй Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), второй вариабельный домен тяжелой цепи и домен тяжелой цепи CH1. Легкая цепь иммуноглобулина включает вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина соединяется с легкой цепью иммуноглобулина и связывается с NKG2D или связывается с FLT3. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе способны связываться с CD16 (ФИГ. 2A).

Другой типичный формат включает гетеродимерное мультиспецифическое антитело, включающее первую тяжелую цепь иммуноглобулина и вторую тяжелую цепь иммуноглобулина (ФИГ. 2B). Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), слитый посредством либо линкера, либо шарнира антитела с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), состоящим из вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, которые соединяются и связывают NKG2D или связывают FLT3. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина включает второй Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), слитый посредством либо линкера, либо шарнира антитела с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), состоящим из вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена

легкой цепи, которые соединяются и связывают NKG2D или связывают FLT3. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе способны связываться с CD16 (ФИГ. 2B).

В некоторых вариантах осуществления одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), описанный выше, связан с константным доменом антитела посредством шарнирной последовательности. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser или Gly-Ser. В некоторых вариантах реализации шарнир, соединяющий scFv, который связывает NKG2D, и константный домен тяжелой цепи антитела, содержит аминокислоты Ala-Ser. В некоторых вариантах реализации шарнир, соединяющий scFv, который связывает FLT3, и константный домен тяжелой цепи антитела, содержит аминокислоты Gly-Ser. В некоторых других вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser и Thr-Lys-Gly. Шарнирная последовательность может обеспечить гибкость связывания с антигеном-мишенью и баланс между гибкостью и оптимальной геометрией.

В некоторых вариантах осуществления одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), описанный выше, включает вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи для повышения стабильности scFv. Например, дисульфидный мостик может быть образован между остатком C44 вариабельного домена тяжелой цепи и остатком C100 вариабельного домена легкой цепи, при этом аминокислотные положения пронумерованы по Kabat. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи связан с вариабельным доменом легкой цепи посредством гибкого линкера. Можно использовать любой подходящий линкер, например, линкер $(G_4S)_4$. В некоторых вариантах осуществления scFv вариабельный домен тяжелой цепи расположен на N-конце вариабельного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления scFv вариабельный домен тяжелой цепи расположен на C-конце вариабельного домена легкой цепи.

Мультиспецифические связывающие белки, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать один или несколько дополнительных антигенсвязывающих сайтов. Дополнительный антигенсвязывающий сайт(ы) может быть слит с N-концом домена CH2 константной области или с C-концом домена CH3 константной области, необязательно через линкерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий сайт(ы) принимает форму одноцепочечной вариабельной области (scFv), которая

необязательно стабилизирована дисульфидом, что приводит к образованию четырехвалентного или трехвалентного мультиспецифического связывающего белка. Например, мультиспецифический связывающий белок включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3 и константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. Любой из этих антигенсвязывающих сайтов может принимать форму Fab-фрагмента или scFv, такого как scFv, описанный выше.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий сайт связывает эпитоп FLT3, отличный от второго сайта связывания антигена. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий сайт связывает тот же самый эпитоп, что и второй антигенсвязывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий сайт содержит те же последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, что и второй антигенсвязывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий сайт содержит те же последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и легкой цепи, что и второй антигенсвязывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий сайт имеет ту же аминокислотную последовательность(и), что и второй антигенсвязывающий сайт. Иллюстративные форматы показаны на ФИГ. 2C и 2D. Соответственно, мультиспецифические связывающие белки могут обеспечивать двухвалентное связывание FLT3. Двухвалентное связывание FLT3 мультиспецифическими белками может стабилизировать FLT3 на поверхности опухолевых клеток и усиливать цитотоксичность NK-клеток по отношению к опухолевым клеткам. Двухвалентное связывание FLT3 мультиспецифическими белками может обеспечить более сильное связывание мультиспецифических белков с опухолевыми клетками, тем самым способствуя более сильному цитотоксическому ответу NK-клеток на опухолевые клетки, особенно на опухолевые клетки, экспрессирующие низкий уровень FLT3.

Мультиспецифические связывающие белки могут принимать дополнительные форматы. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме Triomab, который представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, сохраняющее IgG-подобную форму. Эта химера состоит из

двух половинных антител, каждое из которых имеет одну легкую и одну тяжелую цепь, которые происходят от двух родительских антител.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представляет собой KiHform, который включает технологию «выступы-в-полости» (KiH). KiH включает конструирование доменов C_H3 для создания либо «выступа», либо «полости» в каждой тяжелой цепи, чтобы способствовать гетеродимеризации. Идея технологии Fc «выступы-в-полости (KiH)» заключалась во введении «выступа» в один домен CH3 (CH3A) путем замены небольшого остатка на большой (*например*, $T366W_{CH3A}$ в нумерации EC). Для размещения «выступа» на другом домене CH3 (CH3B) была создана дополнительная поверхность «впадины» путем замены ближайших соседних остатков к выступу меньшими (*например*, $T366S/L368A/Y407V_{CH3B}$). Мутация «полости» была оптимизирована с помощью структурированного скрининга библиотеки фагов (Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library, *J. Mol. Biol.* (1997) 270(1):26–35). Рентгеновские кристаллические структуры вариантов Fc KiH (Elliott JM, Ultsch M, Lee J, Tong R, Takeda K, Spiess C, *et al.*, Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction. *J. Mol. Biol.* (2014) 426(9):1947–57; Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs. *Mol. Immunol.* (2014) 58(1):132–8) продемонстрировали, что гетеродимеризации термодинамически благоприятствуют гидрофобные взаимодействия, обусловленные стерической комплементарностью на поверхности раздела между доменами CH3, в то время как поверхности раздела выступ-выступ и полость-полость не способствуют гомодимеризации из-за стерических затруднений и нарушения благоприятных взаимодействий, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме иммуноглобулина с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig™), который объединяет домены связывания мишени двух моноклональных антител посредством гибких встречающихся в природе линкеров и дает четырехвалентную IgG. -подобную молекулу.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме интерфейса Orthogonal Fab (Ortho-Fab). В подходе орто-Fab IgG (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, *et al.*, Generation of

bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. *Nat. Biotechnol.* (2014) 32(2):191–8), региональный дизайн на основе структуры вводит комплементарные мутации на границе раздела LC и HC_{VH-CH1} только в одном Fab-фрагменте без внесения каких-либо изменений в другой Fab-фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в формате 2-в-1 Ig. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме ES, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два разных Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитыми с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается электростатическими управляющими мутациями в Fc.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме κλ-Body, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию с двумя разными Fab-фрагментами, слитыми с Fc, стабилизированными мутациями гетеродимеризации: Fab-фрагмент 1, нацеленный на антиген 1, содержит каппа-LC, в то время как второй Fab-фрагмент, нацеленный на антиген 2, содержит лямбда-LC. На ФИГ. 13A представлена в качестве примера одна из форм κλ-Body; ФИГ. 13B является иллюстрацией другой κλ-Body.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме обмена Fab-фрагментами (антитела, которые обменивают Fab-фрагменты путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (половинной молекулы) на пару тяжелая-легкая цепь из другой молекулы, что приводит к получению биспецифических антител).

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме SEED Body. Платформа модифицированного домена с обменом цепями (SEED) была разработана для создания асимметричных и биспецифических антителоподобных молекул, что расширяет возможности терапевтического применения природных антител. Эта платформа белковой инженерии основана на обмене структурно родственными последовательностями иммуноглобулина в консервативных доменах CH3. Дизайн SEED позволяет эффективно генерировать гетеродимеры AG/GA, препятствуя при этом гомодимеризации доменов AG и GA SEED CH3. (Muda M. *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* (2011, 24(5):447-54)).

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме LuZ-Y, в которой используется лейциновая молния для индукции гетеродимеризации двух разных HC. (Wranik, BJ. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2012), 287:43331-9).

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме Cov-X-Body. В биспецифических CovX-тельцах два разных пептида соединяются вместе с помощью разветвленного азетидинонового линкера и сливаются с каркасным антителом в мягких условиях сайт-специфическим образом. В то время как фармакофоры отвечают за функциональную активность, каркас антитела обеспечивает длительный период полувыведения и Ig-подобное распределение. Фармакофоры могут быть химически оптимизированы или заменены другими фармакофорами для получения оптимизированных или уникальных биспецифических антител. (Doppalapudi VR *et al.*, *PNAS* (2010), 107(52);22611-22616).

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в гетеродимерной форме Oasc-Fab, которая включает связывание фрагмента Fab с мишенью 1, и связывание scFab с мишенью 2, слитой с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме DuetMab, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два разных Fab-фрагмента, связывающихся с антигенами 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. Fab-фрагменты 1 и 2 содержат дифференциальные мостики S-S, которые обеспечивают правильное спаривание LC и HC.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме CrossmAb, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию с двумя разными Fab-фрагментами, связывающимися с мишенями 1 и 2, слитыми с Fc, стабилизированным путем гетеродимеризации. Домены CL и CH1 и домены VH и VL переключаются, *например*, CH1 слит внутри рамки с VL, в то время как CL слит внутри рамки с VH.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме Fit-Ig, которая представляет собой гомодимерную конструкцию, в которой Fab-фрагмент, связывающийся с антигеном 2, слит с N-концом HC Fab-фрагмента, который связывается с антигеном 1. Конструкция содержит Fc дикого типа.

Отдельные компоненты мультиспецифических связывающих белков более подробно описаны ниже.

NKG2D-связывающий сайт

При связывании с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах, и опухолеассоциированным антигеном на раковых клетках мультиспецифические связывающие белки могут взаимодействовать с более чем одним типом NK-активирующего рецептора и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-клетки у человека. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-клетки у человека и у других видов, таких как грызуны и яванские макаки.

В таблице 1 перечислены пептидные последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи находятся в формате Fab. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи слиты друг с другом с образованием scFv.

Сайты связывания NKG2D, перечисленные в таблице 1, могут различаться по своей аффинности связывания с NKG2D, тем не менее, все они активируют NK-клетки человека.

Если не указано иное, последовательности CDR, представленные в таблице 1, определены по Kabat.

Таблица 1		
Клоны	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:139)

	(SEQ ID NO:138) CDR1 (SEQ ID NO:140) – GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO:141) – EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:142) – ARARGPWSFDP	
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:143)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:144)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:145)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYHSFYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:146)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:147)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQSNSYYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:148)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTV	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYPTFGGGTKVEIK

	SS (SEQ ID NO:149)	(SEQ ID NO:150)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWGFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:151)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:152)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:153)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYGSFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:154)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:155)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:156)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:157)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:158)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSG

	VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:159)	SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:160)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:162)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:163)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:164)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:165)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:166)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYQSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:167)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:168)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYSSFSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:169)
ADI-	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT

29421	VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:170)	CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYESYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:171)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:172)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYDSFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:173)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:174)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYQSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:175)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:176)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:177)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYELYSYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:179)

	(SEQ ID NO:178)	
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:180)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDTFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:181)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDSSIRHAYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:182) CDR1 (SEQ ID NO:184) – GTFSSYAIS (не по Кэбату) или SYAIS (SEQ ID NO:185) CDR2 (SEQ ID NO:186) – GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:189) – ARGDSSIRHAYYYYGMDV (не по Кэбату) или GDSSIRHAYYYYGMDV (SEQ ID NO:190)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:183) CDR1 (SEQ ID NO:187) – KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:188) – WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:191) – QQYYSTPIT
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGSDRFHPYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:192) CDR1 (SEQ ID NO:193) –	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFDTWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:161) CDR1 (SEQ ID NO:198) – RASQSVSRYLA

	GSISSSSYYWG (не по Кэбату) или SSSYYWG (SEQ ID NO:194) CDR2 (SEQ ID NO:195) – SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:196) – ARGSDRFHPYFDY (не по Кэбату) или GSDRFHPYFDY (SEQ ID NO:197)	CDR2 (SEQ ID NO:199) – DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:200) – QQFDTWPPT
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:201)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCEQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:202)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGRKASGSFYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:203) CDR1 (SEQ ID NO:184) – GTFSSYAIS CDR2 (SEQ ID NO:205) – GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:206) – ARRGRKASGSFYYYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:204) CDR1 (SEQ ID NO:207) – ESSQSLLNSGNQKNYLT CDR2 (SEQ ID NO:188) – WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:208) – QNDYSYPYT
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGAPNYGDTTHDYYY	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDDWPFTFGGGTKVEI

	MDVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:209) CDR1 (SEQ ID NO:211) – YTFTSYYMH (не по Кэбату) или SYYMH (SEQ ID NO:212) CDR2 (SEQ ID NO:213) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:214) – ARGAPNYGDTTHDYYYMDV (не по Кэбату) или GAPNYGDTTHDYYYMDV (SEQ ID NO:215)	K (SEQ ID NO:210) CDR1 (SEQ ID NO:216) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:217) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:218) - QQYDDWPFT
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDTGEYYDTDDHGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:219) CDR1 (SEQ ID NO:221) - YTFTGYYMH (не по Кэбату) или GYYMH (SEQ ID NO:222) CDR2 (SEQ ID NO:223) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:224) – ARDTGEYYDTDDHGMDV (не по Кэбату) или DTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO:225)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDDYWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:220) CDR1 (SEQ ID NO:226) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:217) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:227) - QQDDYWPPT
ADI-27744 (A44)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY

	YYCAKDGGYYDSGAGDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:228) CDR1 (SEQ ID NO:230) – FTFSSYAMS (не по Кэбату) или SYAMS (SEQ ID NO:231) CDR2 (SEQ ID NO:232) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:233) - AKDGGYYDSGAGDY (не по Кэбату) или DGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO:234)	YCQQGVSYPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:229) CDR1 (SEQ ID NO:235) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:236) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:237) - QQGVSYPRT
ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAPMGAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:238) CDR1 (SEQ ID NO:240) - FTFSSYSMN (не по Кэбату) или SYSMN (SEQ ID NO:241) CDR2 (SEQ ID NO:242) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:243) – ARGAPMGAAAGWFDP (не по Кэбату) или GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:244)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:239) CDR1 (SEQ ID NO:276) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:236) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:245) - QQGVSFPRT
	scFv (VL-VH) с Q44C в VH и G100C в VL, линкер подчеркнут: DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSF PRTFG*C*GTKVEIK<u>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGK*C*LEWVSSISSSSSYIY	

	YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGA AAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:246)	
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYYMHWVRQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREGAGFAYGMDYYY MDVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:247) CDR1 (SEQ ID NO:211) – YTFTSYYMH (не по Кэбату) или SYYMH (SEQ ID NO:212) CDR2 (SEQ ID NO:249) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:250) – AREGAGFAYGMDYYYMDV (не по Кэбату) или EGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:251)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQSDNWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:248) CDR1 (SEQ ID NO:252) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:199) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:253) - QQSDNWPFT
A49MI	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAP**I**GAAAGWFDPWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:254) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:240) (не по Кэбату) или SYSMN (SEQ ID NO:241) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:242) CDR3: (не по Кэбату) ARGAP**I**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:255) или GAP**I**GAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:239) CDR1 (SEQ ID NO:276) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:236) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:245) - QQGVSFPRT

	(SEQ ID NO:256)	
A49MQ	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAP**Q**GAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:257) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:240) (не по Кэбату) или SYSMN (SEQ ID NO:241) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:242) CDR3 (не по Кэбату) (SEQ ID NO:258) - ARGAP**Q**GAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:259) - GAP**Q**GAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:239) CDR1 (SEQ ID NO:276) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:236) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:245) - QQGVSFPRT
A49ML	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAP**L**GAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:260) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:240) (не по Кэбату) или SYSMN (SEQ ID NO:241) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:242) CDR3 (не по Кэбату) (SEQ ID NO:261) - ARGAP**L**GAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:262) - GAP**L**GAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:239) CDR1 (SEQ ID NO:276) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:236) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:245) - QQGVSFPRT

A49MF	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAP**F**GAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:263) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:240) (не по Кэбату) или SYSMN (SEQ ID NO:241) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:242) CDR3 (не по Кэбату) (SEQ ID NO:264) - ARGAP**F**GAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:265) - GAP**F**GAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:239) CDR1 (SEQ ID NO:276) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:236) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:245) - QQGVSFPRT
A49MV	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAP**V**GAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:266) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:240) (не по Кэбату) или SYSMN (SEQ ID NO:241) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:242) CDR3 (не по Кэбату) (SEQ ID NO:267) - ARGAP**V**GAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:268) - GAP**V**GAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:239) CDR1 (SEQ ID NO:276) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:236) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:245) - QQGVSFPRT
A49-	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT

consensus	ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAP**X**GAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F (SEQ ID NO:269) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:240) (не по Кэбату) или SYSMN (SEQ ID NO:241) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:242) CDR3 (не по Кэбату) (SEQ ID NO:270) - ARGAP**X**GAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:271) – GAP**X**GAAAGWFDP, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F	CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:239) CDR1 (SEQ ID NO:276) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:236) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:245) - QQGVSFPRT
NKG2D binder in US 9,273,136	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKDRGLGDGTYFDYWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:272)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCS GSSSNIGNNAVNWYQQLPGK APKLLIYYDDLLPSGVSDRFSG SKSGTSAFLAISGLQSEDEADY YCAAWDDSLNGPVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO:273)
NKG2D binder in US 7,879,985	QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTV SDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWI GHISYSGSANYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ANWDDAFNIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:274)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLS CRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPWTFGQGTKVEI K (SEQ ID NO:275)

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D (*например*, человеческий NKG2D), содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH), который содержит аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную VH антитела, раскрытого в таблице 1, и вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную VH того же антитела, раскрытого в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, определенные по номенклатуре Кэбата (см. Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Чотиа (см, например, Chothia C & Lesk A M, (1987), J Mol Biol 196: 901-917), МакКалума (см. MacCallum R M et al., (1996) J Mol Biol 262: 732-745), или любым другим известным в данной области способом определения CDR последовательностей VH и VL антитела, раскрытым в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, раскрытого в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:138, таким образом, что имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 90% , по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:138, и/или содержит аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:140), CDR2 (SEQ ID NO:141) и CDR3 (SEQ ID NO:142) в SEQ ID NO :138. Вариабельный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:138, может быть связан с различными вариабельными доменами легкой цепи с образованием сайта связывания NKG2D. Например, первый антигенсвязывающий сайт, который содержит вариабельный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO:138, может дополнительно включать вариабельный домен легкой цепи, выбранный из любой из последовательностей, относящихся к SEQ ID NO:139, 144, 146, 148, 150, 154,

156, 158, 160, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179 и 181. Например, первый антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи с аминокислотными последовательностями, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичны SEQ ID NO: 138, и вариабельный домен легкой цепи с аминокислотными последовательностями, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100 %) идентичными любой из последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 139, 144, 146, 148, 150, 154, 156, 158, 160, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179 и 181.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:182, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:183. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 184 или 185, 186 и 189 или 190, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 187, 188 и 191, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 184 или 185, 186 и 189 или 190, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 187, 188 и 191, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:192, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:161. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 193 или 194, 195 и 196 или 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 198, 199 и 200, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 193 или 194, 195 и 196 или 197, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 198, 199 и 200, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 201, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:202.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по

меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:203, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:204. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 184, 205 и 206, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 207, 188 и 208, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 184, 205 и 206, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 207, 188 и 208, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:209, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:210. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 211 или 212, 213 и 214 или 215, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 216, 217 и 218, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 211 или 212, 213 и 214 или 215, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 216, 217 и 218, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:219, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 221 или 222, 223 и 224 или 225, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 226, 217 и 227, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 221 или 222, 223 и 224 или 225, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 226, 217 и 227, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:247, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:248. В некоторых

вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 211 или 212, 249 и 250 или 251, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 252, 199 и 253, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 211 или 212, 249 и 250 или 251, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 252, 199 и 253, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:228, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:229. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 230 или 231, 232 и 233 или 234, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 235, 236 и 237, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 230 или 231, 232 и 233 или 234, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 235, 236 и 237, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на

98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:238, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 243 или 244, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 243 или 244, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:254, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 255 или 256, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 255 или 256,

соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 257, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 258 или 259, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 258 или 259, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:260, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 261 или 262, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 261 или 262, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 263, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 264 или 265, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 264 или 265, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 266, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 267 или 268, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 267 или 268, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 269, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 270 или 271, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 270 или 271, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 272, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:273.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 274, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:275.

Мультиспецифические связывающие белки могут связываться с NKG2D-экспрессирующими клетками, которые включают, но без ограничения, NK-клетки, γδ-Т-клетки и $CD8^+$ αβ-Т-клетки. При связывании NKG2D мультиспецифические связывающие белки могут блокировать природные лиганды, такие как ULBP6 и MICA, от связывания с NKG2D и активации NK-клеток.

Мультиспецифические связывающие белки связываются с клетками, экспрессирующими CD16, Fc-рецептором на поверхности лейкоцитов, включая естественные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки. Белок по настоящему изобретению связывается с NKG2D с аффинностью K_D от 2 нМ до 120 нМ, *например*, от 2 нМ до 110 нМ, от 2 нМ до 100 нМ, от 2 нМ до 90 нМ, от 2 нМ до 80 нМ, от 2 нМ до 70 нМ, 2 нМ до 60 нМ, 2 нМ до 50 нМ, 2 нМ до 40 нМ, 2 нМ до 30 нМ, 2 нМ до 20 нМ, 2 нМ до 10 нМ,

примерно 15 нМ, примерно 14 нМ, примерно 13 нМ, примерно 12 нМ, примерно 11 нМ, примерно 10 нМ, примерно 9 нМ, примерно 8 нМ, примерно 7 нМ, примерно 6 нМ, примерно 5 нМ, примерно 4,5 нМ, примерно 4 нМ, примерно 3,5 нМ, примерно 3 нМ, примерно 2,5 нМ, примерно 2 нМ, примерно 1,5 нМ, примерно 1 нМ, от примерно 0,5 нМ до примерно 1 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 2 нМ, от примерно 2 нМ до 3 нМ, от примерно 3 нМ до 4 нМ, от примерно 4 нМ до примерно 5 нМ, от примерно 5 нМ до примерно 6 нМ, от примерно 6 нМ до примерно 7 нМ, от примерно 7 нМ до примерно 8 нМ, от примерно 8 нМ до примерно 9 нМ, от примерно 9 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 2 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 3 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 4 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 5 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 6 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 7 нМ до примерно 10 нМ, или от примерно 8 нМ до примерно 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления NKG2D-связывающие сайты связываются с NKG2D с K_D от 10 до 62 нМ.

FLT3-связывающий сайт

FLT3-связывающий сайт мультиспецифического связывающего белка, раскрытого в настоящем документе, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи. В таблице 2 перечислены некоторые типичные последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с FLT3. Последовательности CDR идентифицированы по нумерации Чотиа.

Таблица 2: Последовательности иллюстративных антигенсвязывающих сайтов, которые связывают FLT3

Клон	**VH**	**VL**
12H10.G7	EVQLQESGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTRYVMHWVKQRPGQGLEWIGFINPYNDDTKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTLTVSS [SEQ ID NO:1] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRSDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEEPWTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:2] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID

Клон	VH	VL
	NO:5]	NO:8]
Гуманизиро-ванный 12H10.G7 GB87/GB95 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:9] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID NO:5]	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:10] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB87/GB95	GB87 (VH-VL): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:3] GB95 (VL-VH): DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:12]	
Гуманизиро-ванное 12H10.G7 GB88/GB96 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:13] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4]	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:10] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID

Клон	**VH**	**VL**
	CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID NO:5]	NO:8]
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB88/GB96	GB88 (VH-VL): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCL EWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQ PPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQ NNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:15] GB96 (VL-VH): DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQN NEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYN DDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQ LGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:16]	
Гуманизиро-ванное 12H10.G7 GB89/GB97 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTRYVMHWVRQAP GQRLEWMGFINPYNDDTKYNE KFKGRVTIT<u>S</u>DTSASTAYMELS SLRSEDTAVYYCARWRQLGSL DSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:17] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID NO:5]	DIVMTQSP<u>A</u>SLAVSLGERATINCR ASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS<u>R</u> TDFTLTISSLQAED<u>A</u>A<u>T</u>YYCQQNN EEPWTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:10] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB89/GB97	GB89 (VH-VL): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCL EWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQ PPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQ NNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:19]	

Клон	**VH**	**VL**
	GB97 (VL-VH): DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQN NEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYN DDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQ LGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:20]	
Гуманизиро-ванное 12H10.G7 GB90/GB98 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTRYVMHWVRQAP GQRLEWMGFINPYNDDTKYNE KFKGRVTITSDTSASTAYMELS SLRSEDTAVYHCARWRQLGSL DSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:9] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID NO:5]	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSR TDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNN EEPWTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:22] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB90/GB98	GB90 (VH-VL): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCL EWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQ PPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQ NNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:23] GB98 (VL-VH): DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQN NEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYN DDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQ LGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:24]	
Гуманизро-ванное 12H10.G7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTRYVMHWVRQAP GQRLEWMGFINPYNDDTKYNE	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCR ASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS

Клон	**VH**	**VL**
GB91/GB99 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты)	KFKGRVTITSDTSASTAYMELS SLRSEDTAVYHCARWRQLGSL DSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:9] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID NO:5]	GTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQN NEEPWTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:26] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB91/GB99	GB91 (VH-VL): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCL EWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQ PPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQ NNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:27] GB99 (VL-VH): DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQN NEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYN DDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQ LGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:28]	
Гуманизиров анное 12H10.G7 GB92/GB100 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTRYVMHWVRQAP GQRLEWMGFINPYNDDTKYNE KFKGRVTITSDTSASTAYMELS SLRSEDTAVYHCARWRQLGSL DSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:9] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCR ASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSR TDFTLTISSLQAEDVATYYCQQNN EEPWTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:30] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]

Клон	VH	VL
	NO:5]	
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB92/GB100	GB92 (VH-VL): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCL EWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQ PPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVATYYCQQ NNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:31] GB100 (VL-VH): DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVATYYCQQN NEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYN DDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQ LGSLDSWGQGTTVTV [SEQ ID NO:32]	
Гуманизиро-ванное 12H10.G7 GB93/GB101 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTRYVMHWVRQAP GQRLEWMGFINPYNDDTKYNE KFKGRVTITSDTSASTAYMELS SLRSEDTAVYHCARWRQLGSL DSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:9] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID NO:5]	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCR ASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSR TDFTLTISSLQAEDAAVYYCQQN NEEPWTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:34] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB93/GB101	GB93 (VH-VL): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCL EWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQ PPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAAVYYCQQ NNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:35] GB101 (VL-VH):	

Клон	**VH**	**VL**
	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAAVYYCQQN NEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYN DDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQ LGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:36]	
Гуманизиро-ванное 12H10.G7 GB94/GB102	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTRYVMHWVRQAP GQRLEWMGFINPYNDDTKYNE KFKGRVTITRDTSASTAYMELS SLRSEDTAVYYCARWRQLGSL DSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:37] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID NO:5]	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ NNEEPWTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:38] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB94/GB102	GB94 (VH-VL): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCL EWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQ PPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ NNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:39] GB102 (VL-VH): DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQN NEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYN DDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQ LGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:40]	
Гуманизиро-ванное 12H10.G7 GB102	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTRYVMHWVRQAP GQRLEWMGFINPYNDDTKYNE KFKGRVTITRDTSASTAYMELS SLRSEDTAVYYCARWRQLGSL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ

Клон	**VH**	**VL**
D101E	ESWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:41] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID NO:5]	NNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:42] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB102 D101E	VH-VL: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:43] VL-VH: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:44]	
Гуманизиро-ванное 12H10.G7 GB102 M34I	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAPGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:45] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID NO:5]	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:42] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]

Клон	**VH**	**VL**
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB102 M34I	VH-VL: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:47] VL-VH: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:48]	
Гуманизиро-ванное 12H10.G7 GB102 M34I/D101E	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAPGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:49] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLES [SEQ ID NO:50]	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:42] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]
scFv гуманизиро-ванного 12H10.G7 GB102 M34I/D101E	VH-VL: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:51] VL-VH:	

Клон	VH	VL
	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:52]	
Гуманизированное 12H10.G7 консенсусная 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVX$_1$HWVRQAPGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLX$_2$SWGQGTTVTVSS где X$_1$ представляет собой M или I, и X$_2$ представляет собой E или D [SEQ ID NO:53] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLXS, где X представляет собой E или D [SEQ ID NO:55]	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:42] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]
Гуманизированное 12H10.G7 консенсусная 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITX$_1$DTSASTAYMELSSLRSEDTAVYX$_2$CARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS где X$_1$ представляет собой S или R, и X$_2$ представляет собой Y или H [SEQ ID NO:56] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLDS [SEQ ID	DIVMTQSPX$_1$SLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSX$_2$TDFTLTISSLQAEDX$_3$AX$_4$YYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK где X$_1$ представляет собой A или D, X$_2$ представляет собой R или G, и X$_3$ представляет собой A или V, и X$_4$ представляет собой T или V [SEQ ID NO:57] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID

Клон	VH	VL
	NO:5]	NO:8]
Гуманизированное 12H10.G7 консенсусная 3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVX$_1$HWVRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLX$_2$SWGQGTTVTVSS где X$_1$ представляет собой M или I, и X$_2$ представляет собой E или D [SEQ ID NO:58] CDR1: GYTFTRY [SEQ ID NO:11] CDR2: NPYNDD [SEQ ID NO:4] CDR3: WRQLGSLXS, где X представляет собой E или D [SEQ ID NO:55]	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:42] CDR1: RASESVDTYGSSFVH [SEQ ID NO:6] CDR2: LASNLES [SEQ ID NO:7] CDR3: QQNNEEPWT [SEQ ID NO:8]
14A5.E8	EVQLQESGAELVQPGASVRLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPGSSIINYNENFKNRATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTTLTVSS [SEQ ID NO:60] CDR1: GYTFTSY [SEQ ID NO:62] CDR2: YPGSSI [SEQ ID NO:63] CDR3: RVVYLYFDY [SEQ ID NO:64]	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWTSKSPTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:61] CDR1: SASSSVSYMH [SEQ ID NO:65] CDR2: DTSKLAS [SEQ ID NO:66] CDR3: QQWTSKSPT [SEQ ID NO:67]
Гуманизированное 14A5.E8 1551/1552 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQRPGKGLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTVDTSSDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO:68] CDR1: GYTFTSY [SEQ ID NO:62]	EIVLTQSPATLSLSPGEKATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTSFTLTISSLEPEDAAVYYCQQWTSKSPTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:69] CDR1: SASSSVSYMH [SEQ ID NO:65] CDR2: DTSKLAS [SEQ ID NO:66]

Клон	VH	VL
	CDR2: YPGSSI [SEQ ID NO:63] CDR3: RVVYLYFDY [SEQ ID NO:64]	CDR3: QQWTSKSPT [SEQ ID NO:67]
scFv гуманизиро-ванного 14A5.E8 1551/1552	1551 (VH-VL): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQRPGKCLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTVDTSSDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGEKATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTSFTLTISSLEPEDAAVYYCQQWTSKSPTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:70] 1552 (VL-VH): EIVLTQSPATLSLSPGEKATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTSFTLTISSLEPEDAAVYYCQQWTSKSPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQRPGKCLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTVDTSSDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO:71]	
Гуманизиро-ванное 14A5.E8 1553/1554	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQAPGKGLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO:72] CDR1: GYTFTSY [SEQ ID NO:62] CDR2: YPGSSI [SEQ ID NO:63] CDR3: RVVYLYFDY [SEQ ID NO:64]	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:73] CDR1: SASSSVSYMH [SEQ ID NO:65] CDR2: DTSKLAS [SEQ ID NO:66] CDR3: QQWTSKSPT [SEQ ID NO:67]
scFv гуманизиро-ванного 14A5.E8 1553/1554	1553 (VH-VL): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQAPGKCLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFGCGTKVEIK [SEQ ID NO:74]	

Клон	VH	VL
	1554 (VL-VH): EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIY DTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTF GCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQAPGKCLEWMGNIYPGSSIINYNEN FKNRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYW GQGTLVTVSS [SEQ ID NO:75]	
Гуманизиро-ванное 14A5.E8 1689 (созревшая аффинность из 1553)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKVSGYTFPYYWINWVRQAPG KGLEWMGNIYPGSSIINYNENF KNRVTMTEDTSTDTAYMELSS LRSEDTAVYYCARRNVYLTFD YWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO:76] CDR1: GYTFPYY [SEQ ID NO:78] CDR2: YPGSSI [SEQ ID NO:63] CDR3: RNVYLTFDY [SEQ ID NO:79]	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSA SSSVSYIHWYQQKPGQAPRLLIYD TSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFG GGTKVEIK [SEQ ID NO:77] CDR1: SASSSVSYIH [SEQ ID NO:80] CDR2: DTSKLAS [SEQ ID NO:66] CDR3: QQWTSKSPT [SEQ ID NO:67]
scFv гуманизиро-ванного 14A5.E8 1689 (созревшая аффинность из 1553)	VH-VL: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFPYYWINWVRQAPGKCL EWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTA VYYCARRNVYLTFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG S EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYIHWYQQKPGQAPRLLIYD TSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFG CGTKVEIK [SEQ ID NO:81] VL-VH: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYIHWYQQKPGQAPRLLIYD TSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFG CGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKVSGYTFPYYWINWVRQAPGKCLEWMGNIYPGSSIINYNEN FKNRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRNVYLTFDYWG QGTLVTVSS [SEQ ID NO:82]	
Гуманизиро-	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSA

Клон	**VH**	**VL**
ванное 14A5.E8 консенсусная	CKVSGYTFX$_1$X$_2$YWINWVRQX$_3$PGKX$_4$LEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTX$_5$DTSX$_6$DTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRX$_7$VYLX$_8$FDYWGQGTLVTVSS где X$_1$ представляет собой P или T, X$_2$ представляет собой S или Y, X$_3$ представляет собой A или R, X$_4$ представляет собой C или G, X$_5$ представляет собой V или E, X$_6$ представляет собой S или T, X$_7$ представляет собой N или V, и X$_8$ представляет собой T или Y [SEQ ID NO:29] CDR1: GYTFX$_1$X$_2$Y, где X1 представляет собой P или T, и X$_2$ представляет собой S или Y [SEQ ID NO:59] CDR2: YPGSSI [SEQ ID NO:63] CDR3: RX$_1$VYLX$_2$FDY, где X$_1$ представляет собой N или V, и X$_2$ представляет собой T или Y [SEQ ID NO:54]	SSSVSYXHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFGGGTKVEIK где X представляет собой M или I [SEQ ID NO:84] CDR1: SASSSVSYXH, где X представляет собой M или I [SEQ ID NO:86] CDR2: DTSKLAS [SEQ ID NO:66] CDR3: QQWTSKSPT [SEQ ID NO:67]
11F4.B9	EVQLQESGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYYIHWVKQGPEKSLEWIGEIIPSTGSTIYNQKFKAKATLTVDKSSSTAYLQLKSLTSEDSAVYYCERWGDYYGRDYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:85] CDR1: GYSFTGY [SEQ ID NO:87] CDR2: IPSTGS [SEQ ID NO:88] CDR3: WGDYYGRDY [SEQ ID NO:89]	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDIYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPRTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:90] CDR1: RASESVDIYGNSFMH [SEQ ID NO:91] CDR2: RASNLES [SEQ ID NO:92] CDR3: QQSNEDPRT [SEQ ID NO:93]
Humanized 11F4.B9 (back mutations	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVRQGPGQGLEWMGEIIPSTGSTIYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDIYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTINSLQAEDVATYYCQQS

Клон	**VH**	**VL**
underlined)	LRSEDTAVYYCERWGDYYGR DYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO:14] CDR1: GYSFTGY [SEQ ID NO:87] CDR2: IPSTGS [SEQ ID NO:88] CDR3: WGDYYGRDY [SEQ ID NO:89]	NEDPRTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:94] CDR1: RASESVDIYGNSFMH [SEQ ID NO:91] CDR2: RASNLES [SEQ ID NO:92] CDR3: QQSNEDPRT [SEQ ID NO:93]
4A4.A3	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCS FSGFSLTTYGMGVGWIRQPSG KGLEWLANIWFNDNKYYNSTL KSRLTISKDTSNNQVFLKISSVD TTDTATYYCAQITTVVGTFDY WGQGSPLTVSP [SEQ ID NO:95] CDR1: GFSLTTYGM [SEQ ID NO:97] CDR2: WFNDN [SEQ ID NO:99] CDR3: ITTVVGTFDY [SEQ ID NO:100]	RIVMTQSPTTMAASPGEKITITCSA SSSISSIYLHWYQQKPGFSPKLLIF RTSDLASGVPPRFGGSGSGTSYSL TIGTMEAEDVATYYCQQGSSFPRT FGGGTKLEIK [SEQ ID NO:96] CDR1: SASSSISSIYLH [SEQ ID NO:101] CDR2: RTSDLAS [SEQ ID NO:102] CDR3: QQGSSFPRT [SEQ ID NO:103]
4A4.H7	EVQLQESGPELVKPGASVKISC KASGYSFTGYYIHWVKQSPEES LEWIGEIYPNTGITTYNQKFTA KATLTVDKSSNTAYMQLKSLT SEDSAVYYCTRWGDYYGRDY WGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:104] CDR1: GYSFTGY [SEQ ID NO:87] CDR2: YPNTGI [SEQ ID NO:98] CDR3: WGDYYGRDY [SEQ ID NO:89]	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR ASETVDTHGNSFMHWYQQKPGQ PPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGS RTDFTLTINPVEADDVATYYCQQS NEDPRTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:105] CDR1: RASETVDTHGNSFMH [SEQ ID NO:106] CDR2: RASNLES [SEQ ID NO:92] CDR3: QQSNEDPRT [SEQ ID NO:93]
15A11.C8	EVQLQESGGGLVKTGGSRKLS CAASGFTFSDYGMHWVRHTPE KGLEWVVYISSGGNTIFYTDTV KGRFTISRDNAKNTLFLQMTSL RSEDTAVYFCVRQGYYYAMD YWGQGASVTVSS [SEQ ID	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIRCR ASQDITNYLNWYQQKPDGAVKLL ISYTSILQSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQGDVATYFCQQGSSLPW TFGGGTKLEIK

Клон	VH	VL
	NO:107] CDR1: GFTFSDY [SEQ ID NO:109] CDR2: SSGGNT [SEQ ID NO:110] CDR3: QGYYYAMDY [SEQ ID NO:111]	[SEQ ID NO:108] CDR1: RASQDITNYLN [SEQ ID NO:112] CDR2: YTSILQS [SEQ ID NO:113] CDR3: QQGSSLPWT [SEQ ID NO:114]
12C9.E5	EVQLQESGAELVRPGASVKLSCKASGYIFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGITAYSQKFKGKATLTTDTSSSTAYMEFRSLTSEDSAVYYCTRGGLLYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:115] CDR1: GYIFTDY [SEQ ID NO:117] CDR2: DPETGI [SEQ ID NO:118] CDR3: GGLLY [SEQ ID NO:119]	DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSDGETYLNWLQQRPGQSPKRLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTLKISRVEAEDLGIYYCLQGTFYPHTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:116] CDR1: KSSQSLLYSDGETYLN [SEQ ID NO:120] CDR2: QVSKLDP [SEQ ID NO:121] CDR3: LQGTFYPHT [SEQ ID NO:122]
1A2.A3	EVQLQESGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYYIHWVKQSPEESLEWIGEIYPNTGITTYNQKFTAKATLTVDKSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYYCTRWGDYYGRDYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:123] CDR1: GYSFTGY [SEQ ID NO:87] CDR2: YPNTGI [SEQ ID NO:98] CDR3: WGDYYGRDY [SEQ ID NO:89]	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVDTHGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPRTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:124] CDR1: RASETVDTHGNSFMH [SEQ ID NO:106] CDR2: RASNLES [SEQ ID NO:92] CDR3: QQSNEDPRT [SEQ ID NO:93]
4H2.E3	EVQLQESGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYLMHWMKQKPGQGLEWIGYINPYSDGIKYNEKFRDKATLTSDKSSNTAYMELSSLTSEDSAVYYCAHSSGYVGYAMDYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:125]	GIVMTQTTPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTTFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIK [SEQ ID NO:126] CDR1: RSSKSLLHSNGNTYLY

Клон	**VH**	**VL**
	CDR1: GYTFTSY [SEQ ID NO:62] CDR2: NPYSDG [SEQ ID NO:33] CDR3: SSGYVGYAMDY [SEQ ID NO:127]	[SEQ ID NO:128] CDR2: RMSNLAS [SEQ ID NO:129] CDR3: MQHLEYPFT [SEQ ID NO:130]
14H8.E7	EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWLKQRPGQGLEWIGNIYPGSTIINYNEKFKNKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCARRVVYLYFDSWGQGTTLTVSS [SEQ ID NO:131] CDR1: GYTFTNY [SEQ ID NO:132] CDR2: YPGSTI [SEQ ID NO:133] CDR3: RVVYLYFDS [SEQ ID NO:134]	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIFDTSKLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTITNMETEDAATYYCQQWSSKSPTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:83] CDR1: SASSSVSYMH [SEQ ID NO:65] CDR2: DTSKLAS [SEQ ID NO:66] CDR3: QQWSSKSPT [SEQ ID NO:46]

Альтернативно, новые антигенсвязывающие сайты, которые могут связываться с FLT3, могут быть идентифицированы путем скрининга на связывание с аминокислотной последовательностью, определенной SEQ ID NO:135, ее зрелым внеклеточным фрагментом или фрагментом, содержащим домен FLT3 (см., *например*, международную публикацию заявки WO 2018/220584).

SEQ ID NO:135 (внеклеточный домен зрелого человеческого FLT3)
NQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSESPEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEV
DVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGE
YLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLC
DSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECTRLFTIDLNQTPQTTL
PQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILF
AFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSEDYEIDQYEEFCFSVRF
KAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGEYIFHAENDDAQFTKM
FTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKA
NRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPFIQDNIS

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3 (*например*, FLT3 человека), содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную VH антитела, раскрытого в таблице 2, и вариабельный домен легкой цепи антитела (VL), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную VH того же антитела, раскрытого в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, определенные по номенклатуре Кэбата (см. Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Чотиа (см., например, Chothia C & Lesk A M, (1987), J Mol Biol 196: 901-917), МакКаллума (см. MacCallum R M et al., (1996) J Mol Biol 262: 732-745), или любым другим известным в данной области способом определения последовательностей CDR VH и VL антитела, раскрытых в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи легкой цепи антитела, раскрытые в таблице 2.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к 12H10.G7. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%), идентичную SEQ ID NO:2. В некоторых

вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB87 или GB95. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94% , по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по

меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 3 или 12.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB88 или GB96. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй сайт связывания антигена представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94% , по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 15 или 16.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB89 или GB97. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей

мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, не менее 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 19 или 20.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB90 и GB98. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100 %) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй сайт связывания антигена представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94% , по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 23 или 24.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB91 и GB99. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:26. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:

6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй сайт связывания антигена представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94% по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 27 или 28.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB92 или GB100. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, не менее 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:30. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94% , по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 31 или 32.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB93 или GB101. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:34. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 35 или 36.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB94 или GB102. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 37, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, не менее 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:38. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 39 или 40.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB102 или D101E. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 50, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 43 или 44.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB102 или M34I. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94% , по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 47 или 48.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к GB102 или M34I/D101E. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 50, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 50, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94% по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 51 или 52.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к гуманизированному 12H10.G7. Например, в некоторых вариантах

осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 55, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 55, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к гуманизированному 12H10.G7. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:57. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и

CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к гуманизированному 12H10.G7. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 55, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 55, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к 14A5.E8. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 60, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт связан с mAb 1551 или 1552. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:68, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:69. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности

SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 70 или 71.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к mAb 1553 или 1554. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:72, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:73. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 74 или 75.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к mAb 1689. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:76, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:77. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 78, 63 и 79, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 80, 66 и 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 78, 63 и 79, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 80, 66 и 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO: 81 или 82.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к гуманизированному 14A5.E8. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:84. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 59, 63 и 54, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 86, 66 и 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 59, 63 и 54, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 86, 66 и 67, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к 11F4.B9. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:90. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 88 и 89, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 91, 92 и 93, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 88 и 89, соответственно; и (b) VL, который

содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 91, 92 и 93, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к гуманизированному 11F4.B9. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:94. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 88 и 89, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 91, 92 и 93, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 88 и 89, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 91, 92 и 93, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к 4A4.A3. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на

98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:96. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 97, 99 и 100, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 101, 102 и 103, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 97, 99 и 100, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 101, 102 и 103, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к 4A4.H7. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 104, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:105. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98 и 89, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92 и 93, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98 и 89, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92 и 93, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к 15A11.C8. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 107, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:108. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 109, 110 и 111, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 109, 110 и 111, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к 12C9.E5. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:116. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 117, 118 и 119, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 120, 121 и 122, соответственно. В

некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 117, 118 и 119, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 120, 121 и 122, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к 1A2.A3. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 123, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:124. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98, 89, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92, 93, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98, 89, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92, 93, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к 4H2.E3. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 125, и VL, который содержит аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:126. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 33 и 127, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 128, 129 и 130, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 33 и 127, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 128, 129 и 130, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт относится к 14H8.E7. Например, в некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 131, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 132, 133 и 134, соответственно. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 46, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 132, 133 и 134, соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 46, соответственно.

В каждом из вышеизложенных вариантов осуществления в настоящем документе предполагается, что последовательности VH и/или VL, которые вместе связывают FLT3, могут содержать изменения аминокислотного состава (*например*, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 10 аминокислотных замен, делеций или добавлений) в каркасных областях VH и/или VL без существенного влияния на их способность связываться с FLT3.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, описанный в настоящем документе, связывает FLT3 (*например*, человеческий FLT3) с K_D (т.е. константой диссоциации) 1 нМ или ниже, 5 нМ или ниже, или 10 нМ или ниже, 15 нМ или ниже, или 20 нМ или ниже, по данным измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (*например*, с использованием способа, описанного в примере 1 *ниже*) или с помощью биослойной интерферометрии (BLI), и/или связывает FLT3 из биологической жидкости организма, ткани и/или клетки субъекта. В некоторых вариантах осуществления любое из указанных выше выделенных антител имеет K_d (т.е. скорость диссоциации, также называемую K_{off}), равную или меньшую, чем 1×10^{-5}, 1×10^{-4}, 1×10^{-3}, 5×10^{-3}, 0,01, 0,02 или 0,05 1/с при измерении с помощью SPR (*например*, с использованием способа, описанного в примере 1 ниже) или с помощью BLI.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, раскрытый в настоящем документе, например, антигенсвязывающий сайт, относящийся к 12H10.G7, GB87, GB88, GB89, GB90, GB91, GB92, GB93, GB94, GB95, GB96, GB97, GB98, GB99, GB100, GB101, GB102, GB102 M34I, GB102 D101E, GB102 M34I/D101E или гуманизированному 12H10.G7, раскрытому выше, связывает вариант FLT3 человека, имеющий мутацию T227M, или его внеклеточную область. Аминокислотная последовательность внеклеточной области hFLT3-T227M представляет собой следующую:

NQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSESPEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEV
DVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGE
YLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLC
DSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGMDIRCCARNELGRECTRLFTIDLNQTPQTTL
PQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILF
AFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSEDYEIDQYEEFCFSVRF
KAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGEYIFHAENDDAQFTKM
FTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKA

NRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPFIQDNIS (SEQ ID NO:318).

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, раскрытый в настоящем документе, например, антигенсвязывающий сайт, относящийся к 12H10.G7, GB87, GB88, GB89, GB90, GB91, GB92, GB93, GB94, GB95, GB96, GB97, GB98, GB99, GB100, GB101, GB102, GB102 M34I, GB102 D101E, GB102 M34I/D101E или гуманизированному 12H10.G7, раскрытым выше, связывает вариант FLT3 человека, имеющий мутацию ITD, или его внеклеточную область. Аминокислотная последовательность внеклеточной области hFLT3-ITD представляет собой следующую:

NQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSESPEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEV
DVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGE
YLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLC
DSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECTRLFTIDLNQTPQTTL
PQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILF
AFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSEDYEIDQYEEFCFSVRF
KAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGEYIFHAENDDAQFTKM
FTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKA
NRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPFIQDNIS
(SEQ ID NO:319).

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, раскрытый в настоящем документе, *например*, антигенсвязывающий сайт, относящийся к 12H10.G7, GB87, GB88, GB89, GB90, GB91, GB92, GB93, GB94, GB95, GB96, GB97, GB98, GB99, GB100, GB101, GB102, GB102 M34I, GB102 D101E, GB102 M34I/D101E, гуманизированному 12H10.G7, 14A5.E8, 1551, 1552, 1553, 1554, 1689, гуманизированному 14A5.E8, 11F4.B9, 4A4.A3, 4A4.H7, 15A11.C8, 1A2.A3, 4H2.E3 или 14H8.E7, раскрытым выше, связывает FLT3 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, раскрытый в настоящем документе, *например*, антигенсвязывающий сайт, относящийся к 12H10.G7, GB87, GB88, GB89, GB90, GB91, GB92, GB93, GB94, GB95, GB96, GB97, GB98, GB99, GB100, GB101, GB102, GB102 M34I, GB102 D101E, GB102 M34I/D101E, гуманизированному 12H10.G7, 14A5.E8, 1551, 1552, 1553, 1554, 1689, гуманизированному 14A5.E8, 11F4.B9, 4A4.A3, 4A4.H7, 12C9.E5, 1A2.A3, 4H2.E3 или 14H8.E7, раскрытым выше, не конкурирует с FLT3L за связывание FLT3.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт конкурирует за связывание с FLT3 (*например*, FLT3 человека, FLT3 яванского макака) с антигенсвязывающим сайтом, описанным выше. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт конкурирует с антигенсвязывающим сайтом, относящимся к раскрытому выше 1A2.A3, за связывание с FLT3. В одном варианте осуществления второй антигенсвязывающий сайт конкурирует с 1A2.A3 за связывание с FLT3. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт по настоящему изобретению конкурирует с антигенсвязывающим сайтом, относящимся к раскрытому выше 4A4.A3, за связывание с FLT3. В одном варианте осуществления второй антигенсвязывающий сайт конкурирует с 4A4.A3 за связывание с FLT3. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт по настоящему изобретению конкурирует с антигенсвязывающим сайтом, относящимся к раскрытому выше 4H2.E3, за связывание с FLT3. В одном варианте осуществления второй антигенсвязывающий сайт конкурирует с 4H2.E3 за связывание с FLT3. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт по настоящему изобретению конкурирует с антигенсвязывающий сайтом, относящимся к раскрытому выше 11F4.B9, за связывание с FLT3. В одном варианте осуществления второй антигенсвязывающий сайт конкурирует с 11F4.B9 за связывание с FLT3.

Fc-домен

Внутри Fc-домена связывание CD16 опосредовано шарнирной областью и доменом CH2. Например, в IgG1 человека взаимодействие с CD16 в первую очередь сосредоточено на аминокислотных остатках Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239 и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамина в домене CH2 (см. Sondermann *et al.*, Nature, 406 (6793):267-273). На основе известных доменов могут быть выбраны мутации для усиления или снижения аффинности связывания с CD16, например, путем использования библиотек фагового дисплея или библиотек кДНК дисплея на поверхности дрожжей, или их можно разработать на основе известной трехмерной структуры взаимодействия. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела или его часть содержит шарнир и домен CH2.

Сборка гетеродимерных тяжелых цепей антител может быть осуществлена путем экспрессии двух разных последовательностей тяжелых цепей антител в одной и той же клетке, что может привести к сборке гомодимеров тяжелой цепи каждого

антитела, а также к сборке гетеродимеров. Стимулирование предпочтительной сборки гетеродимеров может быть достигнуто путем включения различных мутаций в домен CH3 константной области тяжелой цепи каждого антитела, как показано в US13/494870, US16/028850, US11/533709, US12/875015, US13/289934, US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480 и US14/830336. Например, мутации могут быть сделаны в домене CH3 на основе IgG1 человека и включают различные пары аминокислотных замен в первом полипептиде и втором полипептиде, которые позволяют этим двум цепям селективно гетеродимеризоваться друг с другом. Положения аминокислотных замен, проиллюстрированные ниже, пронумерованы в соответствии с индексом EC, как в Кэбат.

В одном сценарии аминокислотная замена в первом полипептиде заменяет исходную аминокислоту на более крупную аминокислоту, выбранную из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) или триптофана (W), и по меньшей мере одна аминокислотная замена во втором полипептиде заменяет исходную аминокислоту(ы) на аминокислоту(ы) меньшего размера, выбранную из аланина (A), серина (S), треонина (T) или валина (V), таким образом, что более крупная аминокислотная замена (выступ) встраивается в поверхность более мелких аминокислотных замен (полость). Например, один полипептид может встраивать замену T366W, а другой может встраивать три замены, включая T366S, L368A и Y407V.

Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по изобретению может быть необязательно связан с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной константной области антитела, такой как константная область IgG, включающая шарнир, домены CH2 и CH3 с доменом CH1 или без него. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области человеческого антитела, такой как константная область IgG1 человека, константная область IgG2, константная область IgG3 или константная область IgG4. В одном варианте осуществления Fc-домен антитела или его часть, достаточная для связывания CD16, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичную последовательности Fc человеческого IgG1 дикого типа:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:136). В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела от другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кошка, мышь или лошадь.

В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела, связанный с scFv или Fab фрагментом, способен связываться с CD16. В некоторых вариантах осуществления белок включает часть Fc-домена антитела (например, часть Fc-домена антитела, достаточную для связывания CD16), где Fc-домен антитела содержит шарнир и домен CH2 (например, шарнир и домен CH2 человеческого антитела IgG1), и/или аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 90% идентичные аминокислотной последовательности 234-332 человеческого антитела IgG.

Одна или более мутаций могут быть включены в константную область по сравнению с константной областью IgG1 человека, например, в Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и/или K439. Примеры замен включают, например, Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, T350V, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, T394W, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I , Y407V, K409F, K409W, K409D, K409R, T411D, T411E, K439D и K439E.

В некоторых вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в CH1 константной области человеческого IgG1, могут быть по аминокислотам V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171 и/или V173 В некоторых вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в Ск константной области IgG1 человека, могут быть по аминокислотам E123, F116, S176, V163, S174 и/или T164.

Альтернативно аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, показанных в таблице 3.

Таблица 3		
	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	S364E/F405A	Y349K/T394F
Набор 2	S364H/D401K	Y349T/T411E
Набор 3	S364H/T394F	Y349T/F405A
Набор 4	S364E/T394F	Y349K/F405A
Набор 5	S364E/T411E	Y349K/D401K
Набор 6	S364D/T394F	Y349K/F405A
Набор 7	S364H/F405A	Y349T/T394F
Набор 8	S364K/E357Q	L368D/K370S
Набор 9	L368D/K370S	S364K
Набор 10	L368E/K370S	S364K
Набор 11	K360E/Q362E	D401K
Набор 12	L368D/K370S	S364K/E357L
Набор 13	K370S	S364K/E357Q
Набор 14	F405L	K409R
Набор 15	K409R	F405L

Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, показанных в таблице 4.

Таблица 4		
	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	K409W	D399V/F405T
Набор 2	Y349S	E357W
Набор 3	K360E	Q347R
Набор 4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, показанных в таблице 5.

Таблица 5		

	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	T366K/L351K	L351D/L368E
Набор 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
Набор 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
Набор 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
Набор 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
Набор 6	E356K/D399K	K392D/K409D

Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена в каждой полипептидной цепи может быть выбрана из таблицы 6.

Таблица 6	
Первый полипептид	Второй полипептид
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F K392D, K392E, K409F, K409W, T411D и T411E

Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующих наборов замен в таблице 7, при этом положение(я), указанное в столбце «Первый полипептид», заменено любой известной отрицательно-заряженной аминокислотой, и положение(я), указанное в столбце «Второй полипептид», заменено любой известной положительно-заряженной аминокислотой.

Таблица 7	
Первый полипептид	Второй полипептид
K392, K370, K409 или K439	D399, E356 или E357

Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора в таблице 8, при этом положение(я), указанное в столбце «Первый полипептид», заменено любой известной положительно-заряженной аминокислотой, и положение(я), указанное в столбце «Второй полипептид», заменено любой известной отрицательно-заряженной аминокислотой.

Таблица 8	

Первый полипептид	Второй полипептид
D399, E356 или E357	K409, K439, K370 или K392

Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов в таблице 9.

Таблица 9	
Первый полипептид	Второй полипептид
T350V, L351Y, F405A и Y407V	T350V, T366L, K392L и T394W

В качестве альтернативы или в дополнение структурная стабильность гетеромультимерного белка может быть повышена путем введения S354C в любую из первой или второй полипептидной цепи и Y349C в противоположную полипептидную цепь, что образует искусственный дисульфидный мостик в пределах поверхности раздела двух полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела область отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, L368 и Y407.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, L368 и Y407, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или

нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из E357, K360 , Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из L351, D399, S400 и Y407 и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, N390, K392, K409 и T411.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, N390, K392, K409 и T411, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из L351, D399, S400 и Y407.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или

нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, K360 и K409, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Q347, E357, D399 и F405.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Q347, E357, D399 и F405, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Y349, K360, Q347 и K409.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из K370, K392, K409 и K439, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из D356, E357 и D399.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из D356, E357 и D399, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из K370, K392, K409 и K439.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из L351, E356, T366 и D399, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи

константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Y349, L351, L368, K392 и K409.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Y349, L351, L368, K392 и K409, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из L351, E356, T366 и D399.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C, при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела область отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C, при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела область отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W, при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи антитела константная область отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами Q347R, D399V и F405T.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами Q347R, D399V и F405T, при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной

цепи константная область антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366W, при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела область отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V, при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой T366W.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V, при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W, при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V.

Иллюстративные мультиспецифические связывающие белки

Ниже перечислены примеры TriNKET, содержащие антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, и антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, каждый из которых связан с константной областью антитела, при этом константные области антитела включают мутации, которые обеспечивают гетеродимеризацию двух цепей Fc. Последовательности CDR по Чотиа подчеркнуты. F3-GB102 представлены в

формате F3, *т.е.* антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, представляет собой Fab, и антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. Другие TriNKET имеют формат F3', *т.е.* антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, представляет собой scFv, и антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой Fab. В каждом TriNKET scFv содержит замену Cys на аминокислотные остатки в положении 100 VL и положении 44 VH, тем самым облегчая образование дисульфидного мостика между VH и VL scFv.

VH и VL scFv могут быть соединены через линкер, *например*, пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой гибкий линкер. Что касается аминокислотного состава линкера, пептиды выбирают со свойствами, которые придают гибкость, не влияют на структуру и функцию других доменов белков по настоящему изобретению и устойчивы к расщеплению протеазами. Например, остатки глицина и серина обычно обеспечивают устойчивость к протеазам. В некоторых вариантах осуществления VL связан на N-конце или C-конце с VH через линкер $(GlyGlyGlyGlySer)_4$ ($(G_4S)_4$) (SEQ ID NO:137).

Длина линкера (*например*, гибкого линкера) может быть «короткой», *например*, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков, или «длинной», *например*, по меньшей мере 13 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой 10-50, 10-40, 10-30, 10-25, 10-20, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, 15-20, 20-50, 20-40, 20-30 или 20-25 аминокислотных остатков в длину.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из последовательности $(GS)_n$ (SEQ ID NO:290), $(GGS)_n$ (SEQ ID NO:291), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:292), $(GGSG)_n$ (SEQ ID NO:293), $(GGSGG)_n$ (SEQ ID NO:294) и $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:295), где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:201, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152 и SEQ ID NO:154, как указано в таблице 10.

Таблица 10	
SEQ ID	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO:296	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS

SEQ ID NO:297	GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO:298	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG GGSGGGSGGGS
SEQ ID NO:299	GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GSGGGSGGGSG
SEQ ID NO:300	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
SEQ ID NO:301	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:137	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:302	GGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:303	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:304	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGG

В F3-GB102 NKG2D-связывающий scFv связан с N-концом Fc через линкер Ala-Ser. В F3’-TriNKET FLT3-связывающий scFv связан с N-концом Fc через линкер Gly-Ser. Линкер Ala-Ser или Gly-Ser включен в последовательность шарнирной области, чтобы сбалансировать гибкость и оптимальную геометрию. В некоторых вариантах осуществления дополнительная последовательность Thr-Lys-Gly может быть добавлена на N-конце или C-конце к последовательности Ala-Ser или Gly-Ser на шарнире.

Используемый в настоящем документе для описания этих иллюстративных TriNKET, Fc включает шарнир, CH2 и CH3 антитела. В каждом иллюстративном TriNKET домен Fc, связанный с scFv, содержит мутации Q347R, D399V и F405T, и домен Fc, связанный с Fab, содержит соответствующие мутации K360E и K409W для образования гетеродимера. Домен Fc, связанный с scFv, дополнительно включает замену S354C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой Y349C на Fc, связанном с Fab. Эти замены выделены жирным шрифтом в последовательностях, описанных в этом подразделе.

Например, TriNKET по настоящему раскрытию представляет собой F3’-GB102. F3'-GB102 включает (a) FLT3-связывающую последовательность scFv, полученную из GB102, связанную с доменом Fc, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, включающий часть тяжелой цепи, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с доменом Fc. F3’-GB102 включает три полипептида, как указано ниже.

GB102-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:277)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPY
NDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQ
GTTVTVSS
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

A49MI-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:278)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYI
YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWG
QGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:279)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

GB102-VL-VH-Fc представляет собой полную последовательность FLT3-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Gly-Ser. Домен Fc, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой

Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv (SEQ ID NO:40) включает вариабельный домен тяжелой цепи GB102, соединенный с C-концом вариабельного домена легкой цепи GB102 через линкер $(G_4S)_4$. Тяжелый и легкий вариабельные домены scFv также соединены посредством дисульфидного мостика между C100 VL и C44 VH в результате замен R100C и G44C в VL и VH, соответственно.

A49MI-VH-CH1-Fc представляет часть тяжелой цепи Fab-фрагмента, который содержит вариабельный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:254) NKG2D-связывающего A49MI и домен CH1, соединенный с доменом Fc. Домен Fc в A49MI-VH-CH1-Fc включает замену Y349C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой S354C в Fc в GB102-VL-VH-Fc. В A49MI-VH-CH1-Fc домен Fc также включает замены K360E и K409W для гетеродимеризации с Fc в GB102-VL-VH-Fc.

A49MI-VL-CL представляет часть легкой цепи Fab-фрагмента, содержащую вариабельный домен легкой цепи NKG2D-связывающего A49MI (SEQ ID NO:239) и константный домен легкой цепи.

Другой TriNKET по настоящему изобретению представляет собой F3-GB102. F3-GB102 включает (a) NKG2D-связывающую последовательность scFv, полученную из A49, связанную с Fc-доменом, и (b) FLT3-связывающий Fab-фрагмент, полученный из GB102, включающий часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с доменом Fc. F3-GB102 включает три полипептида, как указано ниже.

A49-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:280)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGCGTKVEIK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSSYI
YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPW
GQGTLVTVSS
AS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GB102-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:281)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPY
NDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQ
GTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GB102-VL-CL (SEQ ID NO:282)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

A49-VL-VH-Fc представляет полную последовательность NKG2D-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser. Домен Fc, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в GB102-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv (SEQ ID NO:246) включает вариабельный домен тяжелой цепи A49, соединенный с C-концом вариабельного домена легкой цепи A49 через линкер $(G_4S)_4$. Тяжелый и легкий вариабельные домены scFv также соединены посредством дисульфидного мостика между C100 VL и C44 VH в результате замен Q100C и G44C в VL и VH, соответственно.

GB102-VH-CH1-Fc представляет часть тяжелой цепи Fab-фрагмента, которая содержит вариабельный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:37) FLT3-связывающего GB102 и домен CH1, соединенный с Fc-доменом. Домен Fc в GB102-VH-CH1-Fc включает замену Y349C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой S354C в Fc в A49-VL-VH-Fc. В GB102-VH-CH1-Fc домен Fc также включает замены K360E и K409W для гетеродимеризации с Fc в A49-VL-VH-Fc.

GB102-VL-CL представляет часть легкой цепи Fab-фрагмента, содержащую вариабельный домен легкой цепи FLT3-связывающего GB102 (SEQ ID NO:38) и константный домен легкой цепи.

Другой TriNKET по настоящему изобретению представляет собой F3’-1553. F3'-1553 включает (a) FLT3-связывающую последовательность scFv, полученную из mAb

1553, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, включающий часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с доменом Fc. F3'-1553 включает три полипептида: 1553-VH-VL-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc, A49MI-VL-CL. A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL описаны выше в контексте F3'-GB102. Полипептид 1553-VH-VL-Fc представлен ниже.

1553-VH-VL-Fc (SEQ ID NO:283)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQAPGKCLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFGCGTKVEIK
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

1553-VH-VL-Fc представляет собой полную последовательность FLT3-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Gly-Ser. Домен Fc, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv (SEQ ID NO:74) включает вариабельный домен тяжелой цепи 1553, соединенный с N-концом вариабельного домена легкой цепи 1553 через линкер $(G_4S)_4$. Тяжелый и легкий вариабельные домены scFv также связаны дисульфидным мостиком между C100 VL и C44 VH в результате замен G100C и G44C в VL и VH, соответственно.

Другой TriNKET по настоящему изобретению представляет собой F3'-1689. F3'-1689 включает (a) FLT3-связывающую последовательность scFv, полученную из mAb 1689, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, включающий часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с доменом Fc. F3'-1689 включает три полипептида: 1689-VH-VL-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc, A49MI-VL-

CL. A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL описаны выше в контексте F3’-GB102. Полипептид 1689-VH-VL-Fc представлен ниже.

1689-VH-VL-Fc (SEQ ID NO:284)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFPYYWINWVRQAPGKCLEWMGNIYPGS
SIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRNVYLTFDYWGQG
TLVTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYIHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFGCGTKVEIK
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

1689-VH-VL-Fc представляет собой полную последовательность FLT3-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Gly-Ser. Домен Fc, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv (SEQ ID NO:81) содержит набор мутаций относительно scFv в 1553-VH-VL-Fc, которые потенциально повышают аффинность связывания с FLT3.

Другой TriNKET по настоящему раскрытию представляет собой F3’-GB102_M34I. F3'-GB102_M34I включает (a) FLT3-связывающую последовательность scFv, полученную из GB102 M34I, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, включающий часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. F3’-GB102_M34I включает три полипептида: GB102_M34I-VL-VH-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc, A49MI-VL-CL. A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL описаны выше в контексте F3’-GB102. Полипептид GB102_M34I-VL-VH-Fc представлен ниже.

GB102_M34I-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:285)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAPGQCLEWMGFINPYN
DDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQG
TTVTVSS
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GB102_M34I-VL-VH-Fc представляет полную последовательность FLT3-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Gly-Ser. Домен Fc, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv (SEQ ID NO:48) содержит замену M34I относительно VH в GB102-VL-VH-Fc для устранения предполагаемой лабильности последовательности.

Другой TriNKET по настоящему раскрытию представляет собой F3'-GB102_D101E. F3'-GB102_D101E включает (a) FLT3-связывающую последовательность scFv, полученную из GB102 D101E, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, включающий часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. F3'-GB102_D101E включает три полипептида: GB102_D101E-VL-VH-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc, A49MI-VL-CL. A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL описаны выше в контексте F3'-GB102. Полипептид GB102_D101E-VL-VH-Fc представлен ниже.

GB102_D101E-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:286)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPY
NDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQ
GTTVTVSS
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GB102_D101E-VL-VH-Fc представляет собой полную последовательность FLT3-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Gly-Ser. Домен Fc, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv (SEQ ID NO:44) содержит замену D101E относительно VH в GB102-VL-VH-Fc для устранения предполагаемой лабильности последовательности.

Другой TriNKET по настоящему раскрытию представляет собой F3'-GB102_M34I_D101E. F3'-GB102_M34I_D101E включает (a) FLT3-связывающую последовательность scFv, полученную из GB102 M34I/D101E, связанную с доменом Fc, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, включающий часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи, и домен CH1 и часть легкой цепи, включающую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. F3'-GB102_M34I_D101E включает три полипептида: GB102_M34I_D101E-VL-VH-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc, A49MI-VL-CL. A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL описаны выше в контексте F3'-GB102. Полипептид GB102_M34I_D101E-VL-VH-Fc представлен ниже.

GB102_M34I_D101E-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:287)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAPGQCLEWMGFINPYN
DDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQG
TTVTVSS
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GB102_M34I_D101E-VL-VH-Fc представляет полную последовательность FLT3-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Gly-Ser. Домен Fc, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv (SEQ ID NO:52) содержит замены

M34I и D101E относительно VH в GB102-VL-VH-Fc для устранения предполагаемой лабильности последовательности.

Другой TriNKET по настоящему изобретению представляет F3’-GB99. F3'-GB99 включает (a) FLT3-связывающую последовательность scFv, полученную из GB99, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, включающий часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. F3’-GB99 включает три полипептида: GB99-VL-VH-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc, A49MI-VL-CL. A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL описаны выше в контексте F3’-GB102. Полипептид GB99-VL-VH-Fc представлен ниже.

GB99-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:288)

DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPY
NDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQ
GTTVTVSS
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GB99-VL-VH-Fc представляет полную последовательность FLT3-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Gly-Ser. Домен Fc, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv (SEQ ID NO:28) содержит набор обратных мутаций в каркасных областях по сравнению с scFv в GB102-VL-VH-Fc для потенциального улучшения структуры и активности антитела.

Другой TriNKET по настоящему изобретению представляет собой F3’-GB89. F3'-GB89 включает (a) FLT3-связывающую последовательность scFv, полученную из GB89, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, включающий часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный

домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. F3'-GB89 включает три полипептида: GB89-VH-VL-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc, A49MI-VL-CL. A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL описаны выше в контексте F3'-GB102. Полипептид GB89-VH-VL-Fc представлен ниже.

GB89-VH-VL-Fc (SEQ ID NO:289)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQAPGQCLEWMGFINPY
NDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQ
GTTVTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GB89-VH-VL-Fc представляет полную последовательность FLT3-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Gly-Ser. Домен Fc, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv (SEQ ID NO:19) включает вариабельный домен тяжелой цепи GB89, соединенный с N-концом вариабельного домена легкой цепи GB89 через линкер $(G_4S)_4$. Тяжелый и легкий вариабельные домены scFv также соединены посредством дисульфидного мостика между C100 VL и C44 VH в результате замен R100C и G44C в VL и VH, соответственно. scFv также содержит набор обратных мутаций в каркасных областях относительно VH и VL GB102-VL-VH-Fc для потенциального улучшения структуры и активности антитела.

В определенном варианте осуществления TriNKET по настоящему изобретению идентичен одному из иллюстративных TriNKET, описанных выше, который включает мутации Fc EW-RVT, за исключением того, что Fc-домен, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, содержит замены Q347R, D399V и F405T, а домен Fc, связанный с HER2-связывающим scFv, содержит соответствующие замены K360E и K409W для образования гетеродимера. В некоторых вариантах осуществления TriNKET по настоящему изобретению идентичен одному из иллюстративных TriNKET, описанных выше, который включает мутации KiH Fc, за исключением того, что домен

Fc, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, содержит замены «полость» T366S, L368A и Y407V, и Fc-домен, связанный с HER2-связывающим scFv, содержит замену «выступ» T366W для образования гетеродимера.

В некоторых вариантах осуществления TriNKET по настоящему раскрытию идентичен одному из иллюстративных TriNKET, описанных выше, за исключением того, что Fc-домен, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, включает замену S354C в домене CH3, и Fc-домен, связанный с HER2-связывающим scFv, включает соответствующую замену Y349C в домене CH3 для образования дисульфидной связи.

Специалисту в данной области должно быть понятно, что во время продукции и/или хранения белков N-концевой глутамат (E) или глутамин (Q) может быть циклизован с образованием лактама (*например*, спонтанно или катализируемого ферментом, присутствующим при производстве и/или хранении). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, где N-концевой остаток аминокислотной последовательности полипептида представляет собой E или Q, в настоящем документе также рассматривается соответствующая аминокислотная последовательность с E или Q, замененным пироглутаматом.

Специалисту в данной области также понятно, что во время продукции и/или хранения белка C-концевой лизин (K) белка может быть удален (*например*, спонтанно или катализируемого ферментом, присутствующим во время продукции и/или хранения). Такое удаление K часто наблюдается с белками, которые содержат Fc-домен на своем C-конце. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, где C-концевой остаток аминокислотной последовательности полипептида (*например*, последовательности Fc-домена) представляет собой K, в настоящем документе также рассматривается соответствующая аминокислотная последовательность с удаленным K.

Мультиспецифические белки, описанные выше, могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалистам в данной области. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в первый вектор экспрессии; вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована во второй вектор экспрессии; третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в третий вектор

экспрессии; и первый, второй и третий векторы экспрессии могут быть стабильно трансфицированы вместе в клетки-хозяева с получением мультимерных белков.

Для достижения максимального выхода мультиспецифического белка могут быть изучены различные соотношения первого, второго и третьего векторов экспрессии для определения оптимального соотношения для трансфекции в клетки-хозяева. После трансфекции отдельные клоны могут быть выделены для создания банка клеток с использованием способов, известных в данной области, таких как ограниченное разведение, ELISA, FACS, микроскопия или Clonepix.

Клоны могут быть культивированы в условиях, подходящих для масштабирования до биореактора и поддержания экспрессии мультиспецифического белка. Мультиспецифические белки могут быть выделены и очищены с использованием способов, известных в данной области, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, лизис клеток, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, гидрофобную обменную хроматографию и хроматографию со смешанным режимом.

II. Характеристики мультиспецифических белков

Мультиспецифические белки, описанные в настоящем документе, включают NKG2D-связывающий сайт, FLT3-связывающий сайт, который связывает FLT3, и Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки содержат дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывается с FLT3, как проиллюстрировано в формате F4-TriNKET.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки демонстрируют термическую стабильность, аналогичную соответствующему моноклональному антителу, *т.е.* моноклональному антителу, содержащему тот же FLT3-связывающий сайт, что и сайт, включенный в мультиспецифические белки.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки одновременно связываются с клетками, экспрессирующими NKG2D и/или CD16, такими как NK-клетки, и клетками, экспрессирующими FLT3, такими как некоторые опухолевые клетки. Связывание мультиспецифических белков с NK-клетками может усиливать активность NK-клеток в отношении разрушения FLT3-экспрессирующих опухолевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки связываются с FLT3 с такой же аффинностью, что и соответствующее анти-FLT3 моноклональное антитело (*т.е.* моноклональное антитело, содержащее тот же FLT3-связывающий сайт, что и сайт, включенный в мультиспецифический белки). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки более эффективно убивают опухолевые клетки, экспрессирующие FLT3, чем соответствующие моноклональные антитела.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки, описанные в настоящем документе, которые включают сайт связывания для FLT3, активируют первичные NK-клетки человека при совместном культивировании с клетками, экспрессирующими FLT3. Активация NK-клеток характеризуется увеличением дегрануляции CD107a и продукции цитокинов IFN-γ. Кроме того, по сравнению с соответствующим анти-FLT3 моноклональным антителом, мультиспецифические белки могут демонстрировать более высокую активацию человеческих NK-клеток в присутствии клеток, экспрессирующих FLT3.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки, описанные в настоящем документе, которые включают сайт связывания для FLT3, усиливают активность покоящихся и IL-2-активированных NK-клеток человека при совместном культивировании с клетками, экспрессирующими FLT3.

В некоторых вариантах осуществления, по сравнению с соответствующим моноклональным антителом, которое связывается с FLT3, мультиспецифические белки обеспечивают преимущество в нацеливании на опухолевые клетки, которые экспрессируют средние и низкие уровни FLT3.

В некоторых вариантах осуществления бивалентный формат F4 TriNKET (*т.е.* TriNKET включают дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывается с FLT3) улучшает авидность, с которой TriNKET связывается с FLT3, что фактически стабилизирует экспрессию и поддержание высоких уровней FLT3 на поверхности опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления F4-TriNKET опосредуют более мощное уничтожение опухолевых клеток, чем соответствующие F3-TriNKET или F3'-TriNKET.

III. Терапевтические применения

Изобретение обеспечивает способы лечения аутоиммунного заболевания или рака с использованием мультиспецифического связывающего белка, описанного в настоящем документе, и/или фармацевтической композиции, описанной в настоящем

документе. Способы могут быть использованы для лечения различных видов рака, экспрессирующих FLT3.

Терапевтический способ может быть охарактеризован в соответствии с видом рака, подлежащего лечению. Например, в некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование или лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфобластный лейкоз (ALL), миелодисплазию, миелодиспластические синдромы, острый Т-лимфобластный лейкоз или острый промиелоцитарный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз или миелоидный бластный криз хронического миелоидного лейкоза.

Другие иллюстративные виды рака, подлежащие лечению с помощью мультиспецифических связывающих белков, нацеленных на FLT3, включают рак молочной железы, рак яичников, рак пищевода, рак мочевого пузыря или желудка, карциному слюнных протоков, карциному слюнных протоков, аденокарциному легкого или агрессивные формы рака матки, такие как серозная карцинома эндометрия матки. В некоторых других вариантах осуществления рак представляет собой рак головного мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, лейкоз, рак легких, рак печени, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак желудка, рак яичек или рак матки. В других вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточную карциному, аденокарциному, мелкоклеточную карциному, меланому, нейробластому, саркому (*например*, ангиосаркому или хондросаркому), рак гортани, рак околоушной железы, рак желчных путей, рак щитовидной железы, акральную лентигинозную меланому, актинический кератоз, острый лимфолейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденоидно-кистозную карциному, аденому, аденосаркому, аденосквамозную карциному, рак анального канала, рак аноректума, астроцитарную опухоль, карциному бартолиновой железы, базально-клеточную карциному, рак желчевыводящих путей, рак кости, рак костного мозга, рак бронхов, рак бронхиальной железы, карциноид, холангиокарциному, хондосаркому, папиллому/карциному сосудистого сплетения, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный лейкоз, светлоклеточный рак, рак соединительной ткани, цистаденому, рак пищеварительной системы, рак двенадцатиперстной кишки, рак эндокринной системы, опухоль эндодермального синуса, гиперплазию эндометрия, стромальную саркому эндометрия, эндометриоидную аденокарциному, эндотелиально-клеточный рак, эпендимальный

рак, эпителиально-клеточный рак, саркому Юинга, рак глаза и орбиты, рак женских половых органов, очаговую узловую гиперплазию, рак желчного пузыря, рак антрального отдела желудка, рак дна желудка, гастриному, глиобластому, глюкагономy, рак сердца, гемангиобластому, гемангиоэндотелиому, гемангиому, аденому печени, аденоматоз печени, гепатобилиарный рак, гепатоцеллюлярную карциному, болезнь Ходжкина, рак подвздошной кишки, инсулиному, интраэпителиальную неоплазию, межэпителиальную плоскоклеточную неоплазию, рак внутрипеченочных желчных протоков, инвазивную плоскоклеточную карциному, рак тощей кишки, рак суставов, саркому Капоши, рак малого таза, крупноклеточную карциному, рак толстой кишки, лейомиосаркому, злокачественную меланому лентиго, лимфому, рак мужских половых органов, злокачественную меланому, злокачественные мезотелиальные опухоли, медуллобластому, медуллоэпителиому, рак мозговых оболочек, мезотелиальный рак, метастатическую карциному, рак ротовой полости, мукоэпидермоидную карциному, множественную миелому, рак мышц, рак носового тракта, рак нервной системы, нейроэпителиальную аденокарциному, узловую меланому, неэпителиальный рак кожи, неходжкинскую лимфому, овсяноклеточную карциному, олигодендроглиальный рак, рак полости рта, остеосаркому, папиллярно-серозную аденокарциному, рак полового члена, рак глотки, опухоли гипофиза, плазмоцитому, псевдосаркому, бластому легких, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак дыхательной системы, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому, серозный рак, рак придаточных пазух носа, рак кожи, мелкоклеточный рак, рак тонкой кишки, рак гладкой мускулатуры, рак мягких тканей, соматостатин-секретирующую опухоль, рак позвоночника, плоскоклеточную карциному, рак поперечнополосатых мышц, субмезотелиальный рак, поверхностно-распространяющуюся меланому, Т-клеточный лейкоз, рак языка, недифференцированную карциному, рак мочеточника, рак уретры, рак мочевого пузыря, рак мочевыделительной системы, рак шейки матки, рак тела матки, увеальную меланому, рак влагалища, веррукозную карциному, ВИПому, рак вульвы, высокодифференцированную карциному или опухоль Вильмса.

В некоторых других вариантах осуществления подлежащий лечению рак представляет собой неходжкинскую лимфому, такую как В-клеточная лимфома или Т-клеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой В-клеточную лимфому, такую как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, малая лимфоцитарная лимфома, лимфома клеток мантийной

зоны, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны, узловая В-клеточная лимфома маргинальной зоны, В-клеточная лимфома маргинальной зоны селезенки, лимфома Беркитта, лимфоплазмоцитарная лимфома, волосатоклеточный лейкоз или первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых других вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой Т-клеточную лимфому, такую как Т-лимфобластная лимфома-предшественница, периферическая Т-клеточная лимфома, кожная Т-клеточная лимфома, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, экстранодальная естественная киллерная/Т-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома энтеропатического типа, подкожная панникулитоподобная Т-клеточная лимфома, анапластическая крупноклеточная лимфома или периферическая Т-клеточная лимфома.

IV. КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

Другой аспект изобретения относится к комбинированной терапии. Описанный в настоящем документе мультиспецифический связывающий белок можно применять в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами для лечения аутоиммунного заболевания или для лечения рака.

Примеры терапевтических агентов, которые можно применять как часть комбинированной терапии при лечении аутоиммунных воспалительных заболеваний, описаны в Li *et al.* (2017) Front. Pharmacol., 8:460, и включают, например, нестероидные противовоспалительные препараты (NSAID) (*например*, ингибиторы COX-2), глюкокортикоиды (*например*, преднизолон/преднизолон, метилпреднизолон и фторированные глюкокортикоиды, такие как дексаметазон и бетаметазон), болезнь-модифицирующие противоревматические препараты (DMARD) (*например*, метотрексат, лефлуномид, соединения золота, сульфасалазин, азатиоприн, циклофосфамид, противомалярийные препараты, D-пеницилламин и циклоспорин), биологические препараты против TNF (*например*, инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб, голимумаб, цертолизумаб пегол и их биоаналоги) и другие биологические препараты, нацеленные на CTLA-4 (*например*, абатацепт), рецептор IL-6 (*например*, тоцилизумаб), IL-1 (*например*, анакинра), Th1-иммунные ответы (IL-12/IL-23) (*например*, устекинумаб), Th17-иммунные ответы (IL-17) (*например*, секукинумаб) и CD20 (*например*, ритуксимаб).

Иллюстративные терапевтические агенты, которые можно применять как часть комбинированной терапии при лечении рака включают, например, лучевую терапию, митомицин, третиноин, рибомустин, гемцитабин, винкристин, этопозид, кладрибин, митобронитол, метотрексат, доксорубицин, карбоквон, пентостатин, нитракрин, зиностатин, цетрореликс, летрозол, ралтитрексед, даунорубицин, фадрозол, фотемустин, тималфазин, собузоксан, недаплатин, цитарабин, бикалутамид, винорелбин, веснаринон, аминоглютетимид, амсакрин, проглумид, эллиптиния ацетат, кетансерин, доксифлуридин, этретинат, изотретиноин, стрептозоцин, нимустин, виндезин, флутамид, дрогенил, бутоцин, кармофур, разоксан, сизофилан, карбоплатин, митолактол, тегафур, ифосфамид, преднимустин, пицибанил, левамизол, тенипозид, импросульфан, эноцитабин, лизурид, оксиметолон, тамоксифен, прогестерон, мепитиостан, эпитиостанол, форместан, интерферон-альфа, интерферон-2 альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма (IFN-γ), колониестимулирующий фактор-1, колониестимулирующий фактор-2, денилейкин дифтитокс, интерлейкин-2, фактор высвобождения лютеинизирующего гормона и варианты вышеупомянутых агентов, которые могут проявлять дифференциальное связывание с родственным рецептором или же увеличивать или уменьшать время полужизни в сыворотке.

Дополнительным классом агентов, которые можно использовать как часть комбинированной терапии при лечении рака, являются ингибиторы иммунных контрольных точек. Примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают агенты, которые ингибируют один или несколько из (i) антигена 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA4), (ii) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v)) B7-H3, (vi) B7-H4 и (vii) TIM3. Ингибитор CTLA4 ипилимумаб одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения меланомы.

Еще другие агенты, которые можно применять как часть комбинированной терапии при лечении рака, представляют собой агенты на основе моноклональных антител, которые нацелены на мишени, не являющиеся контрольными точками (*например*, герцептин), и нецитотоксические агенты (*например*, ингибиторы тирозинкиназы).

Еще другие категории противораковых агентов включают, например: (i) ингибитор, выбранный из ингибитора ALK, ингибитора ATR, антагониста A2A, ингибитора эксцизионной репарации оснований, ингибитора тирозинкиназы Bcr-Abl, ингибитора тирозинкиназы Брутона, ингибитора CDC7, ингибитора CHK1, ингибитора

циклинзависимой киназы, ингибитора DNA-PK, ингибитора DNA-PK и mTOR, ингибитора DNMT1, ингибитора DNMT1 плюс 2-хлор-дезоксиаденозин, ингибитора HDAC, ингибитора сигнального пути Hedgehog, ингибитора IDO, ингибитора JAK, ингибитора mTOR, ингибитора MEK, ингибитора MELK, ингибитора MTH1, ингибитора PARP, ингибитора фосфоинозитид-3-киназы, ингибитора PARP1 и DHODH, ингибитора протеасом, ингибитора топоизомеразы-II, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора VEGFR и ингибитора WEE1; (ii) агонист OX40, CD137, CD40, GITR, CD27, HVEM, TNFRSF25 или ICOS; и (iii) цитокин, выбранный из IL-12, IL-15, GM-CSF и G-CSF.

Белки по изобретению также можно применять в качестве дополнения к хирургическому удалению основного поражения.

Количество мультиспецифического связывающего белка и дополнительного терапевтического агента, а также относительное время введения можно выбирать для достижения желаемого комбинированного терапевтического эффекта. Например, при введении комбинированной терапии пациенту, нуждающемуся в таком введении, терапевтические агенты в комбинации или фармацевтическую композицию или композиции, содержащие терапевтические агенты, можно вводить в любом порядке, таком как, например, последовательно, параллельно, вместе, одновременно и т.п. Кроме того, например, мультиспецифический связывающий белок можно вводить во время того, когда дополнительный терапевтический агент(ы) проявляет свое профилактическое или терапевтическое действие, или наоборот.

V. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

Настоящее раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат терапевтически эффективное количество белка, описанного в настоящем документе. Композиция может быть составлена для использования в различных системах доставки лекарственных средств. Один или несколько физиологически приемлемых вспомогательных веществ или носителей также могут быть включены в композицию для надлежащего состава. Подходящие составы для применения в настоящем раскрытии можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Краткий обзор способов доставки лекарств *см., например*, в Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

Состав для внутривенной доставки лекарственного средства по настоящему изобретению может содержаться в пакете, ручке или шприце. В некоторых вариантах

осуществления пакет может быть соединен с каналом, содержащим трубку и/или иглу. В некоторых вариантах осуществления состав может представлять собой лиофилизированный состав или жидкий состав. В некоторых вариантах осуществления состав может быть высушен замораживанием (лиофилизирован) и содержаться примерно в 12-60 ампулах. В некоторых вариантах осуществления состав может быть высушен замораживанием, и в одном флаконе может содержаться 45 мг высушенного замораживанием состава. В некоторых вариантах осуществления в одном флаконе может содержаться от около 40 мг до около 100 мг высушенного замораживанием состава. В некоторых вариантах осуществления высушенный замораживанием состав из 12, 27 или 45 флаконов объединяют для получения терапевтической дозы белка в лекарственном составе для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления состав может представлять собой жидкий состав и храниться в количестве от примерно 250 мг/флакон до примерно 1000 мг/флакон. В некоторых вариантах осуществления состав может представлять собой жидкий состав и храниться в количестве примерно 600 мг/флакон. В некоторых вариантах осуществления состав может представлять собой жидкий состав и храниться в количестве примерно 250 мг/флакон.

Белок может существовать в жидком водном фармацевтическом составе, включающем терапевтически эффективное количество белка в забуференном растворе, образующем состав.

Эти композиции могут быть стерилизованы обычными методами стерилизации или могут быть подвергнуты стерилизующей фильтрации. Полученные водные растворы могут быть упакованы для использования как есть или лиофилизированы, при этом перед введением лиофилизированный препарат смешивают со стерильным водным носителем. pH препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 или от 6 до 8 и наиболее предпочтительно от 7 до 8, например, от 7 до 7,5. Конечные композиции в твердой форме могут быть расфасованы в несколько упаковок однократной дозы, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутого агента или агентов. Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер для «гибкого» количества.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает состав с увеличенным сроком хранения, включающий белок согласно настоящему изобретению в сочетании с маннитом, моногидратом лимонной кислоты, цитратом

натрия, дигидратом динатрийфосфата, дигидратом дигидрофосфата натрия, хлоридом натрия, полисорбатом 80, вода и гидроксидом натрия.

В некоторых вариантах осуществления готовят водную композицию, включающую белок по настоящему изобретению в pH-буферном растворе. Буфер по настоящему изобретению может иметь pH от примерно 4 до примерно 8, например, от примерно 4,5 до примерно 6,0, или от примерно 4,8 до примерно 5,5, или может иметь pH от примерно 5,0 до примерно 5,2. Также, предполагается, что промежуточные диапазоны для приведенных выше значений pH являются частью этого раскрытия. Например, предполагается включение диапазонов значений, использующих комбинацию любых из приведенных выше значений в качестве верхнего и/или нижнего пределов. Примеры буферов, которые будут контролировать pH в этом диапазоне, включают ацетатный (*например*, ацетат натрия), сукцинатный (такой как сукцинат натрия), глюконатный, гистидиновый, цитратный и другие буферы на основе органических кислот.

В некоторых вариантах осуществления состав включает буферную систему, которая содержит цитрат и фосфат для поддержания pH в диапазоне от примерно 4 до примерно 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH может составлять от примерно 4,5 до примерно 6,0 или от примерно pH от 4,8 до примерно 5,5 или диапазон pH от примерно 5,0 до примерно 5,2. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает моногидрат лимонной кислоты, цитрат натрия, дигидрат динатрийфосфата и/или дигидрат дигидрофосфата натрия. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает примерно 1,3 мг/мл лимонной кислоты (*например*, 1,305 мг/мл), примерно 0,3 мг/мл цитрата натрия (*например*, 0,305 мг/мл), примерно 1,5 мг/мл динатрийфосфата дигидрата (*например*, 1,53 мг/мл), примерно 0,9 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия (*например*, 0,86 мг/мл) и примерно 6,2 мг/мл хлорида натрия (*например*, 6,165 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления буферная система включает от примерно 1 до примерно 1,5 мг/мл лимонной кислоты, от примерно 0,25 до примерно 0,5 мг/мл цитрата натрия, от примерно 1,25 до примерно 1,75 мг/мл дигидрата динатрийфосфата, от примерно 0,7 до примерно 1,1 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия и от примерно 6,0 до примерно 6,4 мг/мл хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления pH состава регулируют с помощью гидроксида натрия.

В состав также может быть включен полиол, который действует в качестве регулятора тоничности и может стабилизировать антитело. Полиол добавляют в состав в количестве, которое может варьироваться в зависимости от желаемой изотоничности состава. В некоторых вариантах осуществления водный состав может быть изотоническим. Количество добавляемого полиола также может быть изменено в зависимости от молекулярной массы полиола. Например, может быть добавлено меньшее количество моносахарида (*например*, маннита) по сравнению с дисахаридом (таким как трегалоза). В некоторых вариантах осуществления полиол, который может быть использован в составе в качестве агента, регулирующего тоничность, представляет собой маннит. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от примерно 5 до примерно 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от примерно 7,5 до примерно 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от примерно 10 до примерно 14 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять примерно 12 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в состав может быть включен полиол сорбит.

В состав также может быть добавлен детергент или поверхностно-активное вещество. Примеры детергентов включают неионогенные детергенты, такие как полисорбаты (*например*, полисорбаты 20, 80 и т.д.) или полоксамеры (*например*, полоксамер 188). Количество добавляемого детергента является таким, что оно уменьшает агрегацию антитела в составе и/или сводит к минимуму образование частиц в составе и/или уменьшает адсорбцию. В некоторых вариантах осуществления состав может включать поверхностно-активное вещество, которое представляет собой полисорбат. В некоторых вариантах осуществления состав может содержать детергент полисорбат 80 или твин 80. Твин 80 относится к термину, используемому для описания полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата (*см*. Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996). В некоторых вариантах осуществления состав может содержать от примерно 0,1 мг/мл до примерно 10 мг/мл полисорбата 80 или от примерно 0,5 мг/мл до примерно 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в состав может быть добавлено около 0,1% полисорбата 80.

В некоторых вариантах осуществления белковый продукт по настоящему раскрытию составлен в виде жидкого состава. Жидкий состав может быть представлен при концентрации 10 мг/мл во флаконах USP/Ph Eur типа I 50R, закрытых резиновой пробкой и запечатанных алюминиевым обжимным колпачком. Пробка может быть

изготовлена из эластомера, соответствующего USP и Ph Eur. В некоторых вариантах осуществления флаконы могут быть заполнены 61,2 мл раствора белкового продукта, чтобы обеспечить экстрагируемый объем 60 мл. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может быть разбавлен 0,9% солевым раствором.

В некоторых вариантах осуществления жидкий состав по настоящему изобретению может быть приготовлен в виде раствора с концентрацией 10 мг/мл в сочетании с сахаром при стабилизирующих уровнях. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может быть приготовлен в водном носителе. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор может быть добавлен в количестве, не превышающем количество, которое может привести к нежелательной или непригодной для внутривенного введения вязкости. В некоторых вариантах осуществления сахар может представлять собой дисахариды, *например*, сахарозу. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может также включать один или несколько буферных агентов, поверхностно-активных веществ и консервантов.

В некоторых вариантах осуществления pH жидкого состава можно отрегулировать путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемой кислотой может быть соляная кислота. В некоторых вариантах осуществления основание может представлять собой гидроксид натрия.

В дополнение к агрегации, дезамидирование является распространенным вариантом продукта пептидов и белков, которое может происходить во время ферментации, сбора/осветления клеток, очистки, хранения лекарственного активного вещества/лекарственного продукта и во время анализа образцов. Дезаминирование представляет собой потерю NH_3 из белка с образованием промежуточного соединения сукцинимида, которое может подвергаться гидролизу. Промежуточное соединение сукцинимида приводит к уменьшению массы исходного пептида на 17 дальтон. Последующий гидролиз приводит к увеличению массы на 18 дальтон. Выделение промежуточного соединения сукцинимида затруднено из-за нестабильности в водных условиях. Таким образом, дезамидирование обычно обнаруживается по увеличению массы на 1 дальтон. В результате дезамидирования аспарагина образуется либо аспарагиновая, либо изоаспарагиновая кислота. Параметры, влияющие на скорость дезамидирования, включают pH, температуру, диэлектрическую проницаемость растворителя, ионную силу, первичную последовательность, локальную конформацию полипептида и третичную структуру. Аминокислотные остатки, соседние с Asn в

пептидной цепи, влияют на скорость дезамидирования. Gly и Ser, следующие за Asn в белковых последовательностях, приводят к более высокой подверженности дезамидированию.

В некоторых вариантах осуществления жидкий состав по настоящему изобретению может храниться в условиях pH и влажности для предотвращения дезаминирования белкового продукта.

Водный носитель, представляющий интерес в настоящем документе, представляет собой носитель, который является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для изготовления жидкого состава. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (*например*, фосфатно-солевой буфер), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

Консервант может быть необязательно добавлен в составы по настоящему изобретению для снижения бактериального действия. Добавление консерванта может, например, облегчить получение многоразового (многодозового) состава.

Внутривенные (IV) составы могут быть предпочтительным путем введения в конкретных случаях, например, когда пациент находится в больнице после трансплантации, получая все лекарственные препараты внутривенно. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав перед введением разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления разведенный лекарственный продукт для инъекции является изотоническим и подходит для введения путем внутривенной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления соль или буферные компоненты могут быть добавлены в количестве от 10 мМ до 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и получены из различных известных кислот (неорганических и органических) с «образующими основания» металлами или аминами. В некоторых вариантах осуществления буфер может представлять собой фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер может быть глицинатным, карбонатным, цитратным буфером, и в этом случае в качестве противоиона могут служить ионы натрия, калия или аммония.

Консервант может быть необязательно добавлен в составы по настоящему изобретению для снижения бактериального действия. Добавление консерванта может, например, облегчить получение многоразового (многодозового) состава.

Водный носитель, представляющий интерес в настоящем документе, представляет собой такой водный носитель, который является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для изготовления жидкого состава. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-солевой буфер), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

Белок по настоящему изобретению может существовать в лиофилизированном составе, включающем белки и лиопротектор. Лиопротектор может представлять собой сахар, *например*, дисахариды. В некоторых вариантах осуществления лиопротектор может представлять собой сахарозу или мальтозу. Лиофилизированный состав может также включать один или несколько буферных агентов, поверхностно-активных веществ, наполнителей и/или консервантов.

Количество сахарозы или мальтозы, применимое для стабилизации лиофилизированного лекарственного продукта, может находится в массовом соотношении по меньшей мере 1:2 белка к сахарозе или мальтозе. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение белка к сахарозе или мальтозе может составлять от 1:2 до 1:5.

В некоторых вариантах осуществления pH состава перед лиофилизацией можно отрегулировать путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемой кислотой может быть соляная кислота. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемое основание может представлять собой гидроксид натрия.

Перед лиофилизацией pH раствора, содержащего белок по настоящему изобретению, можно довести до значения от 6 до 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH для лиофилизированного лекарственного продукта может составлять от 7 до 8.

В некоторых вариантах осуществления соль или буферные компоненты могут быть добавлены в количестве от 10 мМ до 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и получены из различных известных кислот (неорганических и органических) с «образующими основания» металлами или аминами. В некоторых вариантах осуществления буфер может представлять собой фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер может быть

глицинатным, карбонатным, цитратным буфером, и в этом случае в качестве противоиона могут служить ионы натрия, калия или аммония.

В некоторых вариантах осуществления может быть добавлен «наполнитель». «Наполнитель» представляет собой соединение, которое увеличивает массу лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной массы (*например*, облегчает получение по существу однородной лиофилизированной массы, сохраняющей структуру с открытыми порами). Примеры наполнителей включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лиофилизированные составы по настоящему изобретению могут содержать такие наполнители.

Консервант может быть необязательно добавлен в составы по настоящему изобретению для снижения бактериального действия. Добавление консерванта может, например, облегчить получение многоразового (многодозового) состава.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт может быть составлен с водным носителем. Водный носитель, представляющий интерес в настоящем документе, представляет собой такой носитель, который является фармацевтически приемлемым (*например*, безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для изготовления жидкого состава после лиофилизации. Иллюстративные разбавители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-солевой буфер), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт по настоящему изобретению восстанавливают либо стерильной водой для инъекций, USP (SWFI), либо раствором 0,9% хлорида натрия для инъекций, USP. Во время восстановления лиофилизированный порошок растворяется в растворе.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт по настоящему раскрытию состоит из примерно 4,5 мл воды для инъекций и разбавлен 0,9% солевым раствором (раствором хлорида натрия).

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться для получения количества активного ингредиента, эффективного для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента.

Конкретная доза может представлять собой единую дозу для каждого пациента, например, 50-5000 мг белка. В качестве альтернативы доза пациента может быть адаптирована к приблизительной массе тела или площади поверхности тела пациента. Другие факторы при определении подходящей дозировки могут включать заболевание или состояние, подлежащее лечению или профилактике, тяжесть заболевания, способ введения, а также возраст, пол и состояние здоровья пациента. Дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения подходящей дозы для лечения, обычно проводится специалистами в данной области, особенно в свете информации о дозировке и анализов, раскрытых в настоящем документе. Дозировка также может быть определена посредством использования известных анализов для определения дозировок, используемых в сочетании с соответствующими данными доза-ответ. Индивидуальная доза для пациента может быть скорректирована по мере наблюдения за течением заболевания. Уровни в крови целевой конструкции или комплекса у пациента можно измерить, чтобы увидеть, нужно ли корректировать дозировку для достижения или поддержания эффективной концентрации. Фармакогеномика может быть использована для определения того, какие целевые конструкции и/или комплексы и их дозы являются наиболее эффективными для данного индивидуума (Schmitz et al., *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer et al., Clinica Chimica Acta 308: 33-41, 2001).

Как правило, дозы в расчете на массу тела составляют от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мг на кг массы тела, такие как от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 50 мкг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 10 мкг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 1 мкг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 0,1 мкг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 10 мкг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 1 мкг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 100 мкг/кг

массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 50 мкг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 10 мкг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 50 мкг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 1 мг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 1 мг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 1 мг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 10 мг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 10 мг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 50 мг до примерно 100 мг/кг массы тела.

Дозы можно вводить один или несколько раз в день, еженедельно, ежемесячно или ежегодно или даже один раз каждые 2-20 лет. Специалисты в данной области могут легко оценить частоту повторения дозирования на основе измеренных значений времени пребывания и концентраций нацеливаемого конструкта или комплекса в биологических жидкостях или тканях. Введение по настоящему изобретению может быть внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутриплевральным, подоболочечным, внутриполостным, перфузией через катетер или прямой инъекцией в очаг поражения. Введение можно осуществлять один или несколько раз в сутки, один или несколько раз в неделю, один или несколько раз в месяц и один или несколько раз в год.

Вышеприведенное описание представляет множество аспектов и вариантов осуществления изобретения. Патентная заявка конкретно рассматривает все комбинации и перестановки аспектов и вариантов осуществления.

ПРИМЕРЫ

Изобретение, описанное в общих чертах, будет легче понять со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации некоторых аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1. Характеристика супернатантов отобранных гибридомных клонов

FLT3-специфические антитела получали путем иммунизации мышей белком слияния hFLT3-His. Супернатанты 228 гибридом оценивали на связывание FLT3 с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), и 96 гибридом нековалентно связывали с белком hFLT3-His. Одиннадцать клонов были отобраны на основе предварительных оценок аффинности связывания с помощью бислойной интерферометрии (BLI), связывания с клетками человека и яванского макака, экспрессирующими FLT3, и разнообразия эпитопов. Способность этих 11 клонов связывать hFLT3-His дополнительно анализировали с помощью поверхностного плазмонного резонанса высокого разрешения (SPR). Эксперимент проводили при температуре 37°C для имитации физиологической температуры с использованием прибора Biacore 8K. Сенсорограммы и кинетические параметры Biacore представлены в **таблице 12**, а необработанные данные и подгонки показаны на **ФИГ. 18**. Семь из одиннадцати гибридом связывались с K_D менее 10 нМ, а пять показали константу с медленной скоростью диссоциации (kd <5 x 10^{-4} c^{-1}).

Биннинг слияний гибридом с эталонными mAb выполняли с помощью BLI с использованием OctetRed384 (ForteBio). Вкратце, супернатанты гибридом наносили на наконечники датчиков захвата анти-мышиных IgG на 15 минут и уравновешивали в течение 5 минут в PBSF. Датчики погружали в 200 нМ hFLT3-His и оставляли для ассоциации на 180 секунд с последующим погружением в 100 нМ раствор контрольных IgG или 200 нМ раствор FTL3-лиганда. Увеличение числа единиц ответа указывает на то, что гибридома не является конкурентом эталонного mAb, в то время как отсутствие увеличения сигнала указывает на то, что гибридома действительно конкурирует с эталонным mAb. FL23 (Amgen) и FL39 (Amgen) связываются с Доменом 1. EB10 (ImClone), известный блокатор лиганда FLT3, связывается с Доменом 3. FL61 (Amgen) также связывается с доменом 3, но не с блокатором лиганда FLT3. 4G8 (Synimmune) связывается с Доменом 4. NC7 (Imclone) связывается с Доменом 5. Последовательности VH и VL этих эталонных антител представлены в таблице 11.

Таблица 11. Эталонные антитела

α-FLT3 mAb	VH	VL
4G8 (Synimmune), раскрыт в публикации заявки на патент США 2015/0119555A1	QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSG YTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEI DPSDSYKDYNQKFKDKATLTVDRSS NTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITT TPFDFWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:306)	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCR ASQSISNNLHWYQQKSHESPRLL IKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFT LSINSVETEDFGVYFCQQSNTWP YTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:307)
EB10 (ImClone/Lilly),	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMG	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLLHSNGNNYLDWYLQKPG

раскрыт в публикации заявки на патент США 2011/0008355A1	IINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGVGAHDAFDIWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:308)	QSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSDTDFTLQISRVEAEDVGVYYCMQGTHPAISFGQGTRLEIK (SEQ ID NO:309)
NC7 (Imclone/Lilly), раскрыт в публикации заявки на патент США 2011/0008355A1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCATFALFGFREQAFDIWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:310)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:311)
FL23 (Amgen), раскрыт в публикации заявки на патент США 2017/0037149A1	QVTLKESGPALVKPTETLTLTCTVSGFSFRNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTLTNMDPVDTATYFCARMPEYSSGWSGAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:312)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGYDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLIISSLQPEDFATYYCLQHNSFPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:313)
FL39 (Amgen), раскрыт в публикации заявки на патент США 2017/0037149A1	QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVVLTMTNVDPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:314)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:315)
FL61 (Amgen), раскрыт в публикации заявки на патент США 2017/0037149A1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNEFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGEITMVRGVIGYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:316)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:317)

Было обнаружено, что антитела, полученные из пяти гибридом, а именно 4A4, 11F4, 1A2, 4H2 и 13C9, не конкурировали ни с одним из эталонных антител за связывание с hFLT3-His. Перекрестную реактивность с FLT3 яванского макака (cFLT3) оценивали путем измерения связывания антител с изогенными клетками RMA, экспрессирующими cFLT3.

Вкратце, клетки RMA трансдуцировали ретровирусным вектором, кодирующим cFLT3 или FLT3 человека (hFLT3). Связывание α-FLT3 mAb из неочищенных сборов гибридом с изогенными клеточными линиями hFLT3 или cFLT3, а также с FLT3+ линиями раковых клеток осуществляли следующим образом. Добавляли 100000 клеток RMA, REH или SEM в лунку 96-луночного круглодонного планшета. Клетки центрифугировали и осадок осторожно диссоциировали встряхиванием. Добавляли по 50 мкл красителя Zombie live/dead (PBS + краситель 1:2000) на лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут. Клетки промывали 200 мкл буфера FACS (PBS + 2% FBS). К промытым клеткам добавляли 50 мкл супернатантов

гибридом и смеси инкубировали в течение 30 минут на льду в темноте. Клетки промывали один раз, затем добавляли 50 мкл анти-мышиного Fc-PE вторичного реагента (разведение 1:200) и инкубировали в течение 20 минут на льду в темноте. Клетки промывали и фиксировали 50 мкл 4% параформальдегида в течение 15 минут на льду. Клетки снова промывали, а затем ресуспендировали в 200 мкл FACS-буфера и хранили при 4°C до готовности к обнаружению. Образцы анализировали на BD FACSCelesta, оснащенном HTS (высокопроизводительным пробоотборником).

Также измеряли аффинность связывания супернатантов гибридом с раковыми клетками REH (номер по каталогу ATCC CRL-8286), линией клеток ALL человека, которая, как сообщается, экспрессирует FLT3. Как показано в таблице 12, большинство клонов проявляли аффинность связывания с раковыми клетками, экспрессирующими hFLT3, и перекрестную реактивность с cFLT3. Данные по связыванию FLT3 яванских макак для 14A5 и 15A11 не собирали.

Таблица 12. Кинетические параметры и аффинность связывания FLT3-His с антителами, полученными из гибридом-кандидатов

Тестируемые наименования	Профиль биннинга	SPR при 37°C			Связывание клеток MFI		
		k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (нМ)	RMA-hFLT3	RMA-cFLT3	REH
4A4	уникал.	3.38×10^5	3.35×10^{-4}	1.0	1493	2002	2002
11F4	уникал.	1.73×10^5	1.88×10^{-4}	1.1	305	495	495
12H10	4G8	1.74×10^5	3.43×10^{-4}	2.0	544	696	696
15A11	EB10	4.99×10^5	1.17×10^{-4}	2.3	332	n/a	n/a
12C9	FL23	5.67×10^4	3.11×10^{-4}	5.4	1020	3937	664
1A2	уникал.	1.14×10^5	7.49×10^{-4}	6.5	238	461	461
14A5	FL23	1.70×10^5	1.49×10^{-3}	8.7	1005	n/a	2071
4H2	уникал.	8.05×10^4	9.18×10^{-4}	11	570	1017	1017
13C9	уникал.	2.12×10^5	3.02×10^{-3}	14	546	834	834
8F02	FL23	1.67×10^5	2.80×10^{-3}	17	829	2729	2271
14H08	FL23	1.29×10^5	2.40×10^{-3}	19	959	3074	1776

Пример 2. Анализ очищенных мышиных антител против FLT3

На основании анализа, описанного в примере 1, восемь гибридом (4A4, 11F4, 12H10, 15A11, 12C09, 1A2, 14A5, 4H2) отбирали для субклонирования и секвенирования. Получали и анализировали по два субклона от каждой родительской гибридомы. Последовательности из каждой гибридомы определяли как уникальные. Каждый субклон очищали из гибридомной культуры, и связывание с hFLT3-His подтверждали с помощью SPR, как показано на **ФИГ. 19**. Кинетические константы и

аффинности связывания hFLT3 с очищенными мышиными субклонированными mAb показаны в таблице 13. Биннинг с эталонными антителами проводили с использованием способа, описанного в примере 1, и четыре антитела, а именно, 4A4.A3, 11F4.B9, 1A2.A3 и 4H2.E3 не конкурировали ни с одним из эталонных антител за связывание с hFLT3-His.

Таблица 13: Кинетические параметры и аффинность связывания hFLT3 с очищенными мышиными субклонами

Тестируемые наименования	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D, (нМ)
1A2.A3	1.1×10^5	8.9×10^{-4}	8.5
4A4.A3	1.1×10^5	8.2×10^{-4}	7.3
4H2.E3	5.7×10^4	1.0×10^{-3}	17.6
11F4.B9	1.5×10^5	2.5×10^{-4}	1.7
12C9.E5	3.4×10^4	6.3×10^{-4}	18.7
12H10.G7	1.0×10^5	5.5×10^{-4}	5.4
14A5.E8	1.3×10^5	1.9×10^{-3}	15.1
15A11.C8	4.5×10^4	4.8×10^{-4}	10.5

Связывание очищенных субклонированных mAb с клетками подтверждали с использованием изогенных линий клеток RMA, экспрессирующих FLT3 человека и яванского макака. За исключением 12C9.E5, все клоны, связанные с клеточной поверхностью, экспрессировали FLT3 человека и яванского макака (таблица 14). Аналогично, все субклоны связывались с высокой аффинностью с SEM (номер по каталогу DSMZ ACC 546), линией клеток ALL человека, которая, как сообщалось, экспрессировала FLT3.

Таблица 14: Подтверждение клеточного связывания очищенных мышиных mAb с клеточными линиями FLT3 RMA человека и яванского макака

Тестируемые наименования	RMA-hFLT3 EC50 (нМ)	RMA-hFLT3 Max MFI	RMA-cFLT3 EC50 (нМ)	RMA-cFLT3 Max MFI	SEM EC50 (нМ)	SEM Max MFI
1A2.A3	0.80	499	1.82	2834	5.47	1361
4A4.A3	0.72	1021	1.07	5566	3.29	2352
4H2.E3	0.66	696	1.56	3454	7.57	1510
11F4.B9	0.53	493	1.23	2589	2.43	1141
12C9.E5	NB*	NB	NB	NB	NB	NB
12H10.G7	0.36	1136	0.94	5262	3.20	2831
14A5.E8	~ 2.07	415	1.25	1779	~ 1.07	1956
15A11.C8	0.41	1406	0.82	6512	~ 1.13	3861

Пример 3. Блокирующие лиганд свойства выбранных мышиных антител против FLT3

В этом примере описаны эксперименты, предназначенные для характеристики способности выбранных мышиных антител против FLT3 блокировать взаимодействие FLT3 с FLT3-лигандом. Способность α-FLT3 mAb связывать FLT3-экспрессирующие раковые клетки EOL-1 (номер по каталогу DSMZ ACC 386) тестировали до и после добавления насыщающих концентраций растворимого FLT3-лиганда. Для каждого антитела рассчитывали его процент величины блокирования лиганда как уменьшение сигнала связывания mAb, полученного в присутствии FLT3-лиганда, по сравнению с сигналом, полученным в отсутствие указанного FLT3-лиганда. В качестве положительного контроля использовали известный блокатор FLT3-лиганда EB10 mAb. Как показано на **ФИГ. 20**, антитела 12H10.G7, 11F4.B9 и 4A4.A3, 14A5.E8 не препятствовали связыванию FLT3 с FLT3-лигандом, тогда как антитело 15A11.C8 блокировало связывание FLT3-лиганда с FLT3.

Пример 4. Анализ предполагаемых лабильностей последовательностей

В этом примере описаны эксперименты, разработанные для изучения потенциальных лабильностей последовательностей в CDR (идентифицированных по Чотиа) антител 12H10.G7, 11F4.B9 и 4A4.A3, 14A5.E8. Были рассмотрены следующие потенциальные лабильности: M (потенциальный сайт окисления); мотив последовательности NG, NS и NT (потенциальный сайт дезамидирования); мотив последовательности DG, DS и DT (потенциальный сайт изомеризации); мотив последовательности DP (потенциальный сайт химического гидролиза). Результаты представлены в обобщенном виде в таблице 15.

Таблица 15. Предполагаемые лабильности последовательностей в CDR выбранных мышиных mAb

Клон ID	Мотив потенциальной лабильности последовательности	Локализация мотива лабильности последовательности
12H10.G7	DS (сайт изомеризации)	CDRH3
14A5.E8	M (сайт окисления)	CDRL1
11F4.B9	M (сайт окисления), NS (дезамидирование)	CDRL1
	DP (химический гидролиз)	CDRL3
4A4.A3	нет	

Кроме того, также была идентифицирована предполагаемая лабильность последовательности в M34, которая попадает в CDRH1 12H10.G7 по Кэбату. Варианты

этих антител были разработаны для удаления мотивов предполагаемых лабильностей последовательностей.

Пример 5. Гуманизация и созревание аффинности

На основании собранных данных, касающихся кинетики и аффинности для рекомбинантного белка hFLT3, связывания с клеточными линиями, экспрессирующими FLT3 человека и яванского макака, связывания с различными раковыми клетками AML и ALL, профиля биннинга, а также отсутствия ингибирования связывания человеческого FLT3-лиганда, четыре субклона мышиных гибридом, а именно 12H10.G7, 11F4.B9, 4A4.A3 и 14A5.E8, были отобраны для гуманизации. Хотя 4A4.A3 и 14A5.E8 показали несколько более низкую аффинность к hFLT3, чем 12H10.G7 и 11F4.B9, эти антитела, по-видимому, связывались с уникальным эпитопом (без перекрестного блокирования эталонными антителами) и Доменом 1 FLT3, соответственно, и поэтому были дополнительно проанализированы для изучения разнообразия эпитопов.

Антитело 12H10.G7 гуманизировали для создания GB94 и GB102, как описано выше, которые имели одинаковые последовательности VH и VL. Обратные мутации вводили в каркасные области для создания вариантов от GB87 до GB93 и от GB95 до GB101.

Антитело 11F4.B9 гуманизировали для создания 1153 и 1154, как описано выше, которые имели одинаковые последовательности VH и VL. Обратные мутации вводили в каркасные области для создания вариантов 1151 и 1152. Антитело 1153 также подвергали созреванию аффинности. Вкратце, библиотека, сфокусированная на CDR 1553 FLT3 scFv, была разработана и экспонирована на поверхности дрожжей. Отбор FACS проводили дважды путем инкубации дрожжей с биотинилированным человеческим антигеном FLT3-His. FACS-обогащенные выходные образцы объединяли с дополнительными мутантами CDR для создания второй библиотеки. Два раунда дополнительной селекции FACS проводили путем титрования биотинилированным человеческим FLT3-His от 100 нМ до 1 нМ. Сортировку проводили при 10 нМ, при этом для библиотеки наблюдалось явное увеличение сигнала по сравнению с родительской библиотекой. Отсортированные клоны дрожжей высевали и подвергали скринингу.

Пример 6. Оценка связывания TriNKET с клетками, экспрессирующими раковые антигены человека

Изогенные клеточные линии, эктопически экспрессирующие FLT3 человека и яванского макака, использовали для оценки перекрестной реактивности между FLT3 человека и яванского макака. Линию раковых клеток человека RMA, экспрессирующую hFLT3 или cFLT3, использовали для оценки связывания опухолевого антигена TriNKET, нацеленного на FLT3, и исходного mAb. Линии клеток AML человека MOLM-13 и MV4-11 и линию клеток ALL человека REH использовали для оценки связывающей способности TriNKET или исходного mAb. В частности, клетки MOLM-13 и клетки MV4-11, которые экспрессировали FLT3-T227M и FLT3-ITD, соответственно, использовали для оценки способности TriNKET, нацеленного на FLT3, и исходного mAb связывать мутантный FLT3.

Моноклональное антитело GB102 в формате человеческого IgG1, также называемое 1158 mAb, и соответствующее ему TriNKET F3'-GB102, описанное выше, также называемое F3'-1158, разводили и инкубировали с соответствующими клетками. Затем клетки инкубировали с вторичным антителом против IgG человека, конъюгированным с флуорофором, и анализировали с помощью проточной цитометрии. Средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) нормализовали к вторичному контролю только с антителами, чтобы получить значения кратности по сравнению с фоном (FOB).

Как показано на **ФИГ. 21A** и **ФИГ. 21B**, mAb F3'-1158 и 1158, каждое, связывало клетки RMA, эктопически экспрессирующие FLT3 человека и яванского макака, с эквивалентной активностью. Как показано на **ФИГ. 21C**, mAb F3'-1158 и 1158 связывали клетки REH, которые представляли собой клетки ALL человека. Как показано на **ФИГ. 22A и 22B**, mAb F3'-1158 и 1158, каждое, связывало клетки MOLM-13 и клетки MV4-11, которые экспрессировали FLT3-T227M и FLT3-ITD, соответственно.

Пример 7. Оценка интернализации TriNKET или mAb

Линию раковых клеток человека EOL-1, полученную из эозинофильного лейкоза, использовали для оценки интернализации FLT3 после инкубации с mAb F3'-1158 или 1158. Клетки EOL-1 в чашках-дубликатах инкубировали с mAb F3'-1158, 1158 или контрольным антителом изотипа hIgG1 при 37°C в течение двух часов. После инкубации клетки промывали и окрашивали общий FLT3 с использованием неконкурентного антитела против FLT3. Интернализацию FLT3 рассчитывали следующим образом:

% интернализации = (1-(MFI образца 2 ч / MFI изотипа hIgG1 2 ч)) × 100%

На **ФИГ. 23А-23В** показана интернализация FLT3 после инкубации с mAb F3'-1158 и 1158 в REH (**ФИГ. 23А**) и EOL-1 (**ФИГ. 23В**). Исходное mAb индуцировало менее 10% интернализации FLT3, в то время как TriNKET, нацеленный на FLT3, индуцировал менее 5% интернализации FLT3.

Пример 8. Анализ цитотоксичности первичных NK-клеток человека

Лизис клеток-мишеней измеряли с помощью анализа цитотоксичности DELFIA. Вкратце, линии раковых клеток человека, экспрессирующие FLT3, собирали из культуры, промывали HBS и ресуспендировали в ростовой среде при 10^6/мл для мечения реагентом BATDA (Perkin Elmer C136-100). Следовали инструкциям производителя по мечению клеток-мишеней. После мечения клетки трижды промывали HBS и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации 0,5-$1{,}0\times10^5$/мл. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 100 мкл BATDA-меченых клеток. Моноклональные антитела или TriNKET против FLT3 разводили в культуральной среде и в каждую лунку добавляли по 50 мкл разбавленных mAb или TriNKET.

Для получения NK-клеток PBMC выделяли из лейкоцитарных пленок периферической крови человека с использованием центрифугирования в градиенте плотности, промывали и готовили для выделения NK-клеток. NK-клетки выделяли методом отрицательной селекции с использованием магнитных шариков. Чистота выделенных NK-клеток обычно составляла >90% CD3-CD56+. Изолированные NK-клетки оставляли на ночь и собирали из культуры. Затем клетки промывали и ресуспендировали при концентрациях 10^5-$2{,}0\times10^6$/мл в культуральной среде при соотношении эффектор-мишень (E:T) 5:1. В каждую лунку планшета добавляли по 50 мкл NK-клеток до общего объема культуры 200 мкл. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO_2 в течение 2-3 часов.

После инкубации планшет удаляли из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200×g в течение 5 минут. 20 мкл культурального супернатанта переносили в чистый микропланшет и в каждую лунку добавляли по 200 мкл раствора европия комнатной температуры (Perkin Elmer C135-100). Планшет защищали от света и инкубировали на планшетном шейкере при 250 об/мин в течение 15 минут, затем считывали с помощью приборов SpectraMax i3X.

Спонтанное высвобождение вещества, которое может образовывать флуоресцентный хелат с европием, измеряли в клетках-мишенях, инкубированных в отсутствие NK-клеток. Максимальное высвобождение такого вещества измеряли в

клетках-мишенях, лизированных 1% Triton-X. % Специфический лизис рассчитывали следующим образом:

% Специфический лизис = ((Экспериментальное высвобождение – Спонтанное высвобождение) / (Максимальное высвобождение – спонтанное высвобождение)) * 100%.

На **ФИГ. 24A-24D** показана активность mAb F3'-1158 или 1158 в отношении усиления опосредованного первичными NK-клетками уничтожения клеточных линий AML или ALL человека EOL-1 (**ФИГ. 24A**), Reh (**ФИГ. 24B**), RS4-11 (**ФИГ. 24C**) и MV4-11 (**ФИГ. 24D**). F3'-1158 продемонстрировало более мощное уничтожение по сравнению с исходным mAb 1158 mAb.

Чтобы оценить, способствует ли антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, и эффекторная функция Fc цитотоксичности F3'-1158, были сконструированы два варианта TriNKET. Первый вариант содержит мутации в вариабельном домене легкой цепи антигенсвязывающего сайта A49, связывающего NKG2D. В результате этот вариант не связывает NKG2D человека. Аминокислотная последовательность мутантного вариабельного домена легкой цепи представляет собой DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASNSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASSTKSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDDLPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:305). Аминокислотные последовательности этого первого варианта в остальном идентичны последовательности F3'-1158. Второй вариант содержит мутации в Fc-домене. В частности, каждая полипептидная цепь Fc-домена содержит замены L234A/L235A/P329G (пронумерованные по системе нумерации EC), которые, как сообщалось, снижают связывание Fc с Fcγ-рецепторами. Аминокислотные последовательности этого второго варианта в остальном идентичны последовательности F3'-1158.

Способность этих вариантов индуцировать опосредованный NK-клетками лизис клеток-мишеней оценивали с использованием анализа цитотоксичности DELFIA, описанного выше. Как показано на **ФИГ. 25**, мутации в домене, нацеленном на NKG2D, и в Fc-домене существенно снижали цитотоксичность. Этот результат свидетельствует о том, что связывание с NKG2D и связывание с Fcγ-рецепторами способствовали цитотоксической активности F3'-1158.

Пример 9. Первичный анализ цитотоксичности Т-клеток человека

Лизис клеток-мишеней измеряли с помощью анализа цитотоксичности DELFIA, как описано в примере 8, за исключением того, что CD8+ Т-клетки использовали в

качестве иммунных эффекторных клеток. CD8+ Т-клетки получали следующим образом: PBMC человека выделяли из лейкоцитарных пленок периферической крови человека путем центрифугирования в градиенте плотности с Lymphoprep и SepMate 50 в соответствии с инструкциями производителя. Изолированные PBMC стимулировали 1 мкг/мл ConA (культуральная добавка IL-2) в культуральной среде при 37°C в течение 18 часов. Затем ConA удаляли и PBMC культивировали с 25 единиц/мл IL-2 при 37°C в течение 4 дней. CD8+ Т-клетки очищали с использованием метода отрицательной селекции с помощью магнитных шариков (набор EasySep™ Human CD8+ T Cell Isolation Kit) в соответствии с инструкциями производителя. CD8+ Т-клетки культивировали в среде, содержащей 10 нг/мл IL-15, при 37°C в течение 6-13 дней перед использованием в анализе цитолиза.

Как показано на **ФИГ. 26**, mAb F3'-1158, но не 1158, значительно повысило способность CD8 Т-клеток лизировать клетки-мишени RS4-11. F3'-1158 увеличило опосредованный CD8+ Т-клетками лизис клеток RS4-11 дозозависимым образом.

Пример 10. Оценка связывания TriNKET или mAb с цельной кровью человека

Оценивали способность mAb F3'-1158 и 1158 связывать различные типы клеток крови. Вкратце, цельную кровь человека инкубировали с mAb F3'-1158, 1158 или контрольным антителом изотипа IgG1 человека. Клетки крови анализировали с помощью проточной цитометрии и определяли связывание mAb F3'-1158, 1158 или изотипического контрольного антитела с использованием вторичного антитела против человеческого IgG, конъюгированного с флуорофором.

Как показано на **ФИГ. 27**, mAb F3'-1158 и 1158 не показали значительного связывания с гранулоцитами, моноцитами, В-клетками, NK-клетками, CD8+ Т-клетками и CD4+ Т-клетками в крови.

Пример 11. Активация передачи сигналов FLT3

Фосфорилирование FLT3, маркера передачи сигналов FLT3, измеряли с помощью pFLT3 ELISA (R&D Systems DYC368). Клетки EOL-1 высевали в 96-луночные планшеты с круглым дном. Добавляли mAb F3'-1158, 1158 и/или FLT3L. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут и сразу же осаждали центрифугированием при 300×g в течение 5 минут. Клетки дважды промывали PBS. Осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера № 9 и инкубировали на льду в течение 15 минут. Образцы осаждали центрифугированием

при 2000×g в течение 5 минут и супернатанты переносили в чистые пробирки. Концентрации белка определяли количественно, используя анализ общего белка BCA. Образцы разбавляли в IC Diluent #12 надлежащим образом. Лизаты измеряли в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию pFLT3 в каждом образце определяли путем интерполяции значений полученной стандартной кривой. Значения оптической плотности известных стандартов наносили на график против их соответствующих концентраций, и данные подгоняли к линейной модели регрессии.

Как показано на **ФИГ. 28A**, FLT3L привел к 3-кратному увеличению уровней pFLT3, тогда как mAb F3'-1158 и 1158 не вызывали значительного фосфорилирования FLT3. **ФИГ. 28B** показывает, что когда клетки инкубировали с mAb F3’-1158 или 1158 в комбинации с FLT3L, ни mAb F3’-1158, ни 1158 не ингибировали FLT3L-индуцированное фосфорилирование FLT3. Эти результаты согласуются с наблюдением, что mAb 1158 не конкурирует с FLT3L за связывание FLT3.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ССЫЛКИ

Если не указано иное, полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в данном документе, включено посредством ссылки для всех целей.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от его сущности или основных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты осуществления во всех отношениях следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное здесь. Объем изобретения, таким образом, определяется прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим описанием, и предполагается, что формула изобретения охватывает все изменения, которые попадают в значение и в диапазон соответствия формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO.	**Описание**	**ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**
1	12H10.G7-VH	EVQLQESGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTRYVMHWVKQRP GQGLEWIGFINPYNDDTKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMEL SSLTSEDSAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTLTVSS
2	12H10.G7-VL	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDTYGSSFVHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRSDFTLTIDPVEADDA ATYYCQQNNEEPWTFGGGTKLEIK
3	scFv гуманизированного	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYME

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
	12H10.G7 GB87(VH-VL)	LSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASES VDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS RTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
4	12H10.G7-VH CDR2	NPYNDD
5	12H10.G7-VH CDR3	WRQLGSLDS
6	12H10.G7-VL CDR1	RASESVDTYGSSFVH
7	12H10.G7-VL CDR2	LASNLES
8	12H10.G7-VL CDR3	QQNNEEPWT
9	Гуманизированное 12H10.G7-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
10	Гуманизированное 12H10.G7-VL	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAED AATYYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK
11	Гуманизированное 12H10.G7 GB87/GB95-VH CDR1	GYTFTRY
12	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB95(VL-VH)	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAED AATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
13	Гуманизированное 12H10.G7 GB88/GB96-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
14	Гуманизированное 11F4.B9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVRQGP GQGLEWMGEIIPSTGSTIYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCERWGDYYGRDYWGQGTLVTVSS
15	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB88(VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASES VDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS RTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
16	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB96(VL-VH)	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAED AATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
17	Гуманизированное 12H10.G7 GB89/GB97-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
18	Внеклеточная область hFLT3-ITD	NQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSESPEDLGCALRP QSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSL NCQPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTIL FTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLC DSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECT RLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTW ELENKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYY TCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSEDYEIDQYEEFCFSVRF KAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGEY IFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPL PSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSST LNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPFIQDNIS

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
19	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB89(VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASES VDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS RTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
20	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB97(VL-VH)	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAED AATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
21	последовательность Fc человеческого IgG1 дикого типа	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
22	Гуманизированное 12H10.G7 GB90/GB98-VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAED AATYYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK
23	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB90(VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASES VDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS RTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
24	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB98(VL-VH)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAED AATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
25	внеклеточная область hFLT3-T227M	NQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSESPEDLGCALRP QSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSL NCQPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTIL FTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLC DSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGMDIRCCARNELGREC TRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLT WELENKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGY YTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSEDYEIDQYEEFCFSVR FKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGE YIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYP LPSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSS TLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPFIQDNIS
26	scFv гуманизированного 12H10.G7-VL	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED AATYYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK
27	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB91(VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASES VDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
28	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB99(VL-VH)	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED AATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
29	Гуманизированное 14A5.E8 консенсус-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFX_1X_2YWINWVRQX$_3$PGKX$_4$LEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTX$_5$DTSX$_6$DTAY MELSSLRSEDTAVYYCARRX$_7$VYLX$_8$FDYWGQGTLVTVSS, where X_1 представляет собой P или T, X_2 представляет собой S или Y, X_3 представляет собой A или R, X_4 представляет собой C или G, X_5 представляет собой V или E, X_6 представляет собой S или T, X_7 представляет собой N или V, и X_8 представляет собой T или Y
30	Гуманизированное 12H10.G7 GB92/GB100-VL	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAED VATYYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK
31	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB92(VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASES VDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS RTDFTLTISSLQAEDVATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
32	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB100(VL-VH)	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAED VATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTV
33	4H2.E3-VH CDR2	NPYSDG
34	Гуманизированное 12H10.G7 GB93/GB101-VL	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAED AAVYYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK
35	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB93(VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASES VDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS RTDFTLTISSLQAEDAAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
36	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB101(VL-VH)	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAED AAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
37	Гуманизированное 12H10.G7 GB94/GB102-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
38	Гуманизированное 12H10.G7 GB94/GB102-VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK
39	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB94(VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASES VDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
40	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB102(VL-VH)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSAST

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		AYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
41	Гуманизированное 12H10.G7 GB102 D101E-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSS
42	Гуманизированное 12H10.G7 GB102 -VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
43	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB102 D101E (VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESV DTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
44	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB102 D101E (VL-VH)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSS
45	Гуманизированное 12H10.G7 GB102 M34I-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAP GQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
46	14H8.E7-VL CDR3	QQWSSKSPT
47	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB102 M34I (VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAP GQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESV DTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
48	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB102 M34I (VL-VH)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWV RQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTA YMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS
49	Гуманизированное 12H10.G7 GB102 M34I/D101E-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAP GQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSS
50	Гуманизированное 12H10.G7 GB102 M34I/D101E -CDR3	WRQLGSLES
51	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB102 M34I/D101E (VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWVRQAP GQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESV DTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIK
52	scFv гуманизированного 12H10.G7 GB102 M34I/D101E (VL-VH)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWV RQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTA YMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSS
53	Гуманизированное 12H10.G7 consensus 1-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVX_1HWVRQA PGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLX_2SWGQGTTVTVSS, где X_1 представляет собой M или I, и X_2 представляет собой E или D
54	Гуманизированное	RX_1VYLX_2FDY, где X_1 представляет собой N или V, и X_2

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
	14A5.E8 consensus VH CDR3	представляет собой T или Y
55	Гуманизированное 12H10.G7 consensus 1-VH CDR3	WRQLGSLXS, где X представляет собой E или D
56	Гуманизированное 12H10.G7 консенсус 2 -VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQRLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITX$_1$DTSASTAYM ELSSLRSEDTAVYX$_2$CARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSS, where X$_1$ is S or R, and X$_2$ is Y or H
57	Гуманизированное 12H10.G7 консенсус 2 -VL	DIVMTQSPX$_1$SLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSX$_2$TDFTLTISSLQAED X$_3$AX$_4$YYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIK, где X$_1$ представляет собой A или D, X$_2$ представляет собой R или G, и X$_3$ представляет собой A или V, и X$_4$ представляет собой T или V
58	Гуманизированное 12H10.G7 консенсус 3-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVX$_1$HWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLX$_2$SWGQGTTVTVSS, где X$_1$ представляет собой M или I, и X$_2$ представляет собой E или D
59	Гуманизированное 14A5.E8 консенсус VH CDR1	GYTFX$_1$X$_2$Y, где X1 представляет собой P или T, и X$_2$ представляет собой S или Y
60	14A5.E8-VH	EVQLQESGAELVQPGASVRLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPG QGLEWIGNIYPGSSIINYNENFKNRATLTVDTSSSTAYMQLSSL TSDDSAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTTLTVSS
61	14A5.E8-VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSP KRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CQQWTSKSPTFGGGTKLEIK
62	14A5.E8-VH CDR1	GYTFTSY
63	14A5.E8-VH или гуманизированное 14A5.E8 консенсус VH CDR2	YPGSSI
64	14A5.E8-VH CDR3	RVVYLYFDY
65	14A5.E8-VL CDR1	SASSSVSYMH
66	14A5.E8-VL или гуманизированное 14A5.E8 консенсус VL CDR2	DTSKLAS
67	14A5.E8-VL или гуманизированное 14A5.E8 консенсус VL CDR3	QQWTSKSPT
68	Гуманизированное 14A5.E8 1551/1552-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQRP GKGLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTVDTSSDTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSS
69	Гуманизированное 14A5.E8 1551/1552-VL	EIVLTQSPATLSLSPGEKATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAP RLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTSFTLTISSLEPEDAAVYYCQ QWTSKSPTFGGGTKVEIK
70	scFv гуманизированного 14A5.E8 1551(VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQRP GKCLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTVDTSSDTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGEKATLSCSASSSVS YMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTSFTLTI SSLEPEDAAVYYCQQWTSKSPTFGCGTKVEIK
71	scFv гуманизированного 14A5.E8 1552(VL-VH)	EIVLTQSPATLSLSPGEKATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAP RLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTSFTLTISSLEPEDAAVYYCQ QWTSKSPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQ

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		LVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQRPGKC LEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTVDTSSDTAYMELSSLR SEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSS
72	Гуманизированное 14A5.E8 1553/1554-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQAP GKGLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSS
73	Гуманизированное 14A5.E8 1553/1554-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAP RLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QWTSKSPTFGGGTKVEIK
74	scFv гуманизированного 14A5.E8 1553(VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQAP GKCLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVS YMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFGCGTKVEIK
75	scFv гуманизированного 14A5.E8 1554(VL-VH)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAP RLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QWTSKSPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQAPGKC LEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMELSSLR SEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSS
76	Гуманизированное 14A5.E8 1689-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFPYYWINWVRQAP GKGLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARRNVYLTFDYWGQGTLVTVSS
77	Гуманизированное 14A5.E8 1689-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYIHWYQQKPGQAPR LLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ WTSKSPTFGGGTKVEIK
78	Гуманизированное 14A5.E8 1689-VH CDR1	GYTFPYY
79	Гуманизированное 14A5.E8 1689-VH CDR3	RNVYLTFDY
80	Гуманизированное 14A5.E8 1689-VL CDR1	SASSSVSYIH
81	scFv гуманизированного 14A5.E8 1689 (VH-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFPYYWINWVRQAP GKCLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARRNVYLTFDYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGS EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYIHWYQQKPGQAPR LLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ WTSKSPTFGCGTKVEIK
82	scFv гуманизированного 14A5.E8 1689 (VL-VH)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYIHWYQQKPGQAPR LLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ WTSKSPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFPYYWINWVRQAPGKCL EWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRS EDTAVYYCARRNVYLTFDYWGQGTLVTVSS
83	14H8.E7-VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSP KRWIFDTSKLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTITNMETEDAATYY CQQWSSKSPTFGGGTKLEIK
84	Гуманизированное 14A5.E8 консенсус VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYXHWYQQKPGQAP RLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QWTSKSPTFGGGTKVEIK, where X is M or I
85	11F4.B9-VH	EVQLQESGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYYIHWVKQGPEK SLEWIGEIIPSTGSTIYNQKFKAKATLTVDKSSSTAYLQLKSLTS EDSAVYYCERWGDYYGRDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
86	Гуманизированное 14A5.E8 консенсус VL CDR1	SASSSVSYXH, где X представляет собой M или I
87	11F4.B9-VH CDR1	GYSFTGY
88	11F4.B9-VH CDR2	IPSTGS
89	11F4.B9-VH CDR3	WGDYYGRDY
90	11F4.B9-VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDIYGNSFMHWYQQK PGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVA TYYCQQSNEDPRTFGGGTKLEIK
91	11F4.B9-VL CDR1	RASESVDIYGNSFMH
92	11F4.B9-VL CDR2	RASNLES
93	11F4.B9-VL CDR3	QQSNEDPRT
94	Гуманизированное 11F4.B9-VL	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDIYGNSFMHWYQQ KPGQPPKLLIYRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTINSLQAED VATYYCQQSNEDPRTFGGGTKVEIK
95	4A4.A3-VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLTTYGMGVGWIRQPSG KGLEWLANIWFNDNKYYNSTLKSRLTISKDTSNNQVFLKISSV DTTDTATYYCAQITTVVGTFDYWGQGSPLTVSP
96	4A4.A3-VL	RIVMTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISSIYLHWYQQKPGFSP KLLIFRTSDLASGVPPRFGGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYC QQGSSFPRTFGGGTKLEIK
97	4A4.A3-VH CDR1	GFSLTTYGM
98	4A4.H7-VH CDR2	YPNTGI
99	4A4.A3-VH CDR2	WFNDN
100	4A4.A3-VH CDR3	ITTVVGTFDY
101	4A4.A3-VL CDR1	SASSSISSIYLH
102	4A4.A3-VL CDR2	RTSDLAS
103	4A4.A3-VL CDR3	QQGSSFPRT
104	4A4.H7-VH	EVQLQESGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYYIHWVKQSPEE SLEWIGEIYPNTGITTYNQKFTAKATLTVDKSSNTAYMQLKSL TSEDSAVYYCTRWGDYYGRDYWGQGTSVTVSS
105	4A4.H7-VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVDTHGNSFMHWYQQ KPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDV ATYYCQQSNEDPRTFGGGTKLEIK
106	4A4.H7-VL CDR1	RASETVDTHGNSFMH
107	15A11.C8-VH	EVQLQESGGGLVKTGGSRKLSCAASGFTFSDYGMHWVRHTP EKGLEWVVYISSGGNTIFYTDTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMT SLRSEDTAVYFCVRQGYYYAMDYWGQGASVTVSS
108	15A11.C8-VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIRCRASQDITNYLNWYQQKPDGA VKLLISYTSILQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQGDVATYFC QQGSSLPWTFGGGTKLEIK
109	15A11.C8-VH CDR1	GFTFSDY
110	15A11.C8-VH CDR2	SSGGNT
111	15A11.C8-VH CDR3	QGYYYAMDY
112	15A11.C8-VL CDR1	RASQDITNYLN
113	15A11.C8-VL CDR2	YTSILQS
114	15A11.C8-VL CDR3	QQGSSLPWT
115	12C9.E5-VH	EVQLQESGAELVRPGASVKLSCKASGYIFTDYEIHWVKQTPV HGLEWIGAIDPETGITAYSQKFKGKATLTTDTSSSTAYMEFRSL TSEDSAVYYCTRGGLLYWGQGTSVTVSS
116	12C9.E5-VL	DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSDGETYLNWLQQ RPGQSPKRLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTLKISRVEAED LGIYYCLQGTFYPHTFGGGTKLEIK
117	12C9.E5-VH CDR1	GYIFTDY
118	12C9.E5-VH CDR2	DPETGI
119	12C9.E5-VH CDR3	GGLLY
120	12C9.E5-VL CDR1	KSSQSLLYSDGETYLN

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
121	12C9.E5-VL CDR2	QVSKLDP
122	12C9.E5-VL CDR3	LQGTFYPHT
123	1A2.A3 VH	EVQLQESGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYYIHWVKQSPEE SLEWIGEIYPNTGITTYNQKFTAKATLTVDKSSNTAYMQLKSL TSEDSAVYYCTRWGDYYGRDYWGQGTSVTVSS
124	1A2.A3-VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVDTHGNSFMHWYQQ KPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDV ATYYCQQSNEDPRTFGGGTKLEIK
125	4H2.E3-VH	EVQLQESGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYLMHWMKQKP GQGLEWIGYINPYSDGIKYNEKFRDKATLTSDKSSNTAYMELS SLTSEDSAVYYCAHSSGYVGYAMDYWGQGTSVTVSS
126	4H2.E3-VL	GIVMTQTTPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYWFLQR PGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTTFTLRISRVEAEDV GVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIK
127	4H2.E3-VH CDR3	SSGYVGYAMDY
128	4H2.E3-VL CDR1	RSSKSLLHSNGNTYLY
129	4H2.E3-VL CDR2	RMSNLAS
130	4H2.E3-VL CDR3	MQHLEYPFT
131	14H8.E7-VH	EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWLKQRPG QGLEWIGNIYPGSTIINYNEKFKNKATLTVDTSSSTAYMQLSSL TSDDSAVYYCARRVVYLYFDSWGQGTTLTVSS
132	14H8.E7-VH CDR1	GYTFTNY
133	14H8.E7-VH CDR2	YPGSTI
134	14H8.E7-VH CDR3	RVVYLYFDS
135	Внеклеточный домен зрелого человеческого FLT3	NQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSESPEDLGCALRP QSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSL NCQPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTIL FTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLC DSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECT RLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTW ELENKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYY TCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSEDYEIDQYEEFCFSVRF KAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGEY IFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPL PSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSST LNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPFIQDNIS
136	Последовательность Fc человеческого IgG1 дикого типа	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
137	Линкер ((G4S)4)	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
138	ADI-27705-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
139	ADI-27705-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYNSYPITFGGGTKVEIK
140	ADI-27705-VH CDR1	GSFSGYYWS
141	ADI-27705-VH CDR2	EIDHSGSTNYNPSLKS
142	ADI-27705-VH CDR3	ARARGPWSFDP
143	ADI-27724-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
144	ADI-27724-VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPITFGGGTKVEIK
145	ADI-27740(A40)-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
146	ADI-27740(A40)-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYHSFYTFGGGTKVEIK
147	ADI-27741-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
148	ADI-27741-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQSNSYYTFGGGTKVEIK
149	ADI-27743-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
150	ADI-27743-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYNSYPTFGGGTKVEIK
151	ADI-28153-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWGFDPWGQGTLVTVSS
152	ADI-28153-VL	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISSYLNWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYC QQSYDIPYTFGQGTKLEIK
153	ADI-28226(C26)-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
154	ADI-28226(C26)-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYGSFPITFGGGTKVEIK
155	ADI-28154-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
156	ADI-28154-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYC QQSKEVPWTFGQGTKVEIK
157	ADI-29399-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
158	ADI-29399-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYNSFPTFGGGTKVEIK
159	ADI-29401-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
160	ADI-29401-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYDIYPTFGGGTKVEIK
161	ADI-29443(F43)-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		QQFDTWPPTFGGGTKVEIK
162	ADI-29403-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
163	ADI-29403-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYDSYPTFGGGTKVEIK
164	ADI-29405-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
165	ADI-29405-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYGSFPTFGGGTKVEIK
166	ADI-29407-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
167	ADI-29407-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYQSFPTFGGGTKVEIK
168	ADI-29419-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
169	ADI-29419-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYSSFSTFGGGTKVEIK
170	ADI-29421-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
171	ADI-29421-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYESYSTFGGGTKVEIK
172	ADI-29424-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
173	ADI-29424-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYDSFITFGGGTKVEIK
174	ADI-29425-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
175	ADI-29425-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYQSYPTFGGGTKVEIK
176	ADI-29426-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
177	ADI-29426-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYHSFPTFGGGTKVEIK
178	ADI-29429-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
179	ADI-29429-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKA

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYELYSYTFGGGTKVEIK
180	ADI-29447(F47)-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
181	ADI-29447(F47)-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYDTFITFGGGTKVEIK
182	ADI-27727-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARGDSSIRHAYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
183	ADI-27727-VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQQYYSTPITFGGGTKVEIK
184	ADI-27727-VH CDR1(не-Кэбат)	GTFSSYAIS
185	ADI-27727-VH CDR1(не-Кэбат)	SYAIS
186	ADI-27727-VH CDR2	GIIPIFGTANYAQKFQG
187	ADI-27727-VL CDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA
188	ADI-27727-VL CDR2	WASTRES
189	ADI-27727-VH CDR3 (не-Кэбат)	ARGDSSIRHAYYYYGMDV
190	ADI-27727-VH CDR3 (не-Кэбат)	GDSSIRHAYYYYGMDV
191	ADI-27727-VL CDR3	QQYYSTPIT
192	ADI-29443(F43)-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPG KGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGSDRFHPYFDYWGQGTLVTVSS
193	ADI-29443(F43)-VH CDR1(не-Кэбат)	GSISSSSYYWG
194	ADI-29443(F43)-VH CDR1(не-Кэбат)	SSSYYWG
195	ADI-29443(F43)-VH CDR2	SIYYSGSTYYNPSLKS
196	ADI-29443(F43)-VH CDR3 (не-Кэбат)	ARGSDRFHPYFDY
197	ADI-29443(F43)-VH CDR3 (не-Кэбат)	GSDRFHPYFDY
198	ADI-29443(F43)-VL CDR1	RASQSVSRYLA
199	ADI-29443(F43)-VL CDR2	DASNRAT
200	ADI-29443(F43)-VL CDR3	QQFDTWPPT
201	ADI-29404(F04)-VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS
202	ADI-29404(F04)-VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC EQYDSYPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
203	ADI-28200-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARRGRKASGSFYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
204	ADI-28200-VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKPLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK
205	ADI-28200-VH CDR2	GIIPIFGTANYAQKFQG
206	ADI-28200-VH CDR3	ARRGRKASGSFYYYYGMDV
207	ADI-28200-VH CDR1	ESSQSLLNSGNQKNYLT
208	ADI-28200-VH CDR3	QNDYSYPYT
209	ADI-29379(E79)-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCARGAPNYGDTTHDYYYMDVWGKGTTVT VSS
210	ADI-29379(E79)-VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYDDWPFTFGGGTKVEIK
211	ADI-29379(E79)-VH CDR1(не-Кэбат)	YTFTSYYMH
212	ADI-29379(E79)-VH CDR1(не-Кэбат)	SYYMH
213	ADI-29379(E79)-VH CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG
214	ADI-29379(E79)-VH CDR3(не-Кэбат)	ARGAPNYGDTTHDYYYMDV
215	ADI-29379(E79)-VH CDR3(не-Кэбат)	GAPNYGDTTHDYYYMDV
216	ADI-29379(E79)-VH CDR1	RASQSVSSNLA
217	ADI-29379(E79)-VH CDR2	GASTRAT
218	ADI-29379(E79)-VH CDR3	QQYDDWPFT
219	ADI-29463(F63)-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQA PGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARDTGEYYDTDDHGMDVWGQGTTVT VSS
220	ADI-29463(F63)-VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQDDYWPPTFGGGTKVEIK
221	ADI-29463(F63)-VH CDR1(не-Кэбат)	YTFTGYYMH
222	ADI-29463(F63)-VH CDR1(не-Кэбат)	GYYMH
223	ADI-29463(F63)-VH CDR2	WINPNSGGTNYAQKFQG
224	ADI-29463(F63)-VH CDR3(не-Кэбат)	ARDTGEYYDTDDHGMDV
225	ADI-29463(F63)-VH CDR3(не-Кэбат)	DTGEYYDTDDHGMDV
226	ADI-29463(F63)-VL	RASQSVSSNLA

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
	CDR1	
227	ADI-29463(F63)-VL CDR3	QQDDYWPPT
228	ADI-27744(A44)-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYWGQGTLVTVSS
229	ADI-27744(A44)-VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGVSYPRTFGGGTKVEIK
230	ADI-27744(A44)-VH CDR1(не-Кэбат)	FTFSSYAMS
231	ADI-27744(A44)-VH CDR1(не-Кэбат)	SYAMS
232	ADI-27744(A44)-VH CDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
233	ADI-27744(A44)-VH CDR3(не-Кэбат)	AKDGGYYDSGAGDY
234	ADI-27744(A44)-VH CDR3(не-Кэбат)	DGGYYDSGAGDY
235	ADI-27744(A44)-VL CDR1	RASQGIDSWLA
236	ADI-27744(A44)-VL CDR2	AASSLQS
237	ADI-27744(A44)-VL CDR3	QQGVSYPRT
238	ADI-27749(A49)-VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS
239	ADI-27749(A49)-VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGVSFPRTFGGGTKVEIK
240	ADI-27749(A49)-VH CDR1(не-Кэбат)	FTFSSYSMN
241	ADI-27749(A49)-VH CDR1(не-Кэбат)	SYSMN
242	ADI-27749(A49)-VH CDR2	SISSSSSYIYYADSVKG
243	ADI-27749(A49)-VH CDR3(не-Кэбат)	ARGAPMGAAAGWFDP
244	ADI-27749(A49)-VH CDR3(не-Кэбат)	GAPMGAAAGWFDP
245	ADI-27749(A49)-VL CDR3	QQGVSFPRT
246	scFv (VL-VH) с Q44C в VH и G100C в VL ADI-27749(A49)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGVSFPRTFG*C*GTKVEIK<u>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</u>EV QLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGK*C* LEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS
247	ADI-29378(E78)-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCAREGAGFAYGMDYYYMDVWGKGTTVTV

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		SS
248	ADI-29378(E78)-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQSDNWPFTFGGGTKVEIK
249	ADI-29378(E78)-VH CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG
250	ADI-29378(E78)-VH CDR3(не-Кэбат)	AREGAGFAYGMDYYYMDV
251	ADI-29378(E78)-VH CDR3(не-Кэбат)	EGAGFAYGMDYYYMDV
252	ADI-29378(E78)-VL CDR1	RASQSVSSYLA
253	ADI-29378(E78)-VL CDR3	QQSDNWPFT
254	A49MI-VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGAP**I**GAAAGWFDPWGQGTLVTVSS
255	A49MI-VH CDR3(не-Кэбат)	ARGAP**I**GAAAGWFDP
256	A49MI-VH CDR3(не-Кэбат)	GAP**I**GAAAGWFDP
257	A49MQ-VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGAP**Q**GAAAGWFDPWGQGTLVTVSS
258	A49MQ-VH CDR3 (не-Кэбат)	ARGAP**Q**GAAAGWFDP
259	A49MQ-VH CDR3	GAP**Q**GAAAGWFD
260	A49ML-VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGAP**L**GAAAGWFDPWGQGTLVTVSS
261	A49ML-VH CDR3 (не-Кэбат)	ARGAP**L**GAAAGWFDP
262	A49ML-VH CDR3	GAP**L**GAAAGWFDP
263	A49MF-VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGAP**F**GAAAGWFDPWGQGTLVTVSS
264	A49MF-VH CDR3 (не-Кэбат)	ARGAP**F**GAAAGWFDP
265	A49MF-VH CDR3	GAP**F**GAAAGWFDP
266	A49MV-VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGAP**V**GAAAGWFDPWGQGTLVTVSS
267	A49MV-VH CDR3 (не-Кэбат)	ARGAP**V**GAAAGWFDP
268	A49MV-VH CDR3	GAP**V**GAAAGWFDP
269	A49-консунсус-VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGAP**X**GAAAGWFDPWGQGTLVTVSS, where X is M, L, I, V, Q или F,
270	A49-консенсус-VH CDR3 (не-Кэбат)	ARGAP**X**GAAAGWFDP, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
271	A49-консенсус-VH CDR3	GAP**X**GAAAGWFDP, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F
272	NKG2D связующее в US9,273,136-VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAP GKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYWGQGTTVTVSS
273	NKG2D связующее в US9,273,136-VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKA PKLLIYYDDLLPSGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYY CAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL
274	NKG2D связующее в US7,879,985-VH	QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGK GLEWIGHISYSGSANYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMVTVSS
275	NKG2D связующее в US7,879,985-VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
276	A49MI-VL CDR1	RASQGISSWLA
277	GB102-VL-VH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSG SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP **R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
278	A49MI-VH-CH1-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
279	A49MI-VL-CL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGVSFPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
280	A49-VL-VH-Fc	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGVSFPRTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKC LEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSSASDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**VYTL PP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
281	GB102-VH-CH1-Fc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQGLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
282	GB102-VL-CL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
283	1553-VH-VL-Fc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTSYWINWVRQAP GKCLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARRVVYLYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVS YMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFGCGTKVEIKGSDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V** SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
284	1689-VH-VL-Fc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFPYYWINWVRQAP GKCLEWMGNIYPGSSIINYNENFKNRVTMTEDTSTDTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARRNVYLTFDYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVS YIHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQWTSKSPTFGCGTKVEIKGSDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V** SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
285	GB102_M34I-VL-VH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWV RQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTA YMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
286	GB102_D101E-VL-VH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSSGS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
287	GB102_M34I_D101E-VL-VH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVIHWV RQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTA YMELSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLESWGQGTTVTVSSGSD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**V YTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
288	GB99-VL-VH-Fc	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDTYGSSFVHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED AATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHW VRQAPGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYHCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSG SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP **R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
289	GB89-VH-VL-Fc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYVMHWVRQA PGQCLEWMGFINPYNDDTKYNEKFKGRVTITSDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWRQLGSLDSWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASES VDTYGSSFVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS RTDFTLTISSLQAEDAATYYCQQNNEEPWTFGCGTKVEIKGSD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**V YTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
290	Последовательность линкера	(GS)n, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20
291	Последовательность линкера	(GGS)n, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20
292	Последовательность линкера	(GGGS)n, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20
293	Последовательность линкера	(GGSG)n, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20
294	Последовательность линкера	(GGSGG)n, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
295	Последовательность линкера	(GGGGS)n, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20
296	Последовательность линкера	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS
297	Последовательность линкера	GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
298	Последовательность линкера	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
299	Последовательность линкера	GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG
300	Последовательность линкера	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGG
301	Последовательность линкера	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGS
302	Последовательность линкера	GGGGSGGGGSGGGGS
303	Последовательность линкера	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
304	Последовательность линкера	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
305	Вариант TriNKET с мутантным вариабельным доменом легкой цепи	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASNSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYEASSTKSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYDDLPTFGGGTKVEIK
306	Альфа- FLT3 mAb - 4G8(Synimmune) VH	QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRP GHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQKFKDKATLTVDRSSNTAYMHL SSLTSDDSAVYYCARAITTTPFDFWGQGTTLTVSS
307	Альфа- FLT3 mAb - 4G8(Synimmune) VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESP RLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQ QSNTWPYTFGGGTKLEIK
308	Альфа- FLT3 mAb - EB10 (ImClone/Lilly) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCARGVGAHDAFDIWGQGTTVTVSS
309	Альфа- FLT3 mAb - EB10 (ImClone/Lilly) VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNNYLDWYLQ KPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSDTDFTLQISRVEAED VGVYYCMQGTHPAISFGQGTRLEIK
310	Альфа- FLT3 mAb - NC7 (ImClone/Lilly) VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCATFALFGFREQAFDIWGQGTTVTVSS
311	Альфа- FLT3 mAb - NC7 (ImClone/Lilly) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLATYYC QQSYSTPFTFGPGTKVDIK
312	Альфа- FLT3 mAb - FL23 (Amgen) VH	QVTLKESGPALVKPTETLTLTCTVSGFSFRNARMGVSWIRQPP GKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTLTN MDPVDTATYFCARMPEYSSGWSGAFDIWGQGTMVTVSS
313	Alpha- FLT3 mAb - FL23 (Amgen) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGYDLGWYQQKPGK APKRLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLIISSLQPEDFATYY CLQHNSFPWTFGQGTKVEIK
314	Альфа- FLT3 mAb – FL39 (Amgen) VH	QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMGVSWIRQPP GKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVVLTMTN

SEQ ID NO.	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		VDPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFFDYWGQGTLVTVSS
315	Альфа- FLT3 mAb – FL39 (Amgen) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKA PKRLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC LQHNSYPLTFGCGTKVEIK
316	Альфа- FLT3 mAb – FL61 (Amgen) VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAP GKGLEWVAVISYDGSNEFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGEITMVRGVIGYYYYGMDVWGQGT TVTVSS
317	Альфа- FLT3 mAb – FL61 (Amgen) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC LQHNSYPLTFGGGTKVEIK
318	внеклеточная область hFLT3-T227M	NQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSESPEDLGCALRP QSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSL NCQPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTIL FTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLC DSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGMDIRCCARNELGREC TRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLT WELENKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGY YTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSEDYEIDQYEEFCFSVR FKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGE YIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYP LPSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSS TLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPFIQDNIS
319	внеклеточная область hFLT3-ITD	NQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSESPEDLGCALRP QSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSL NCQPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTIL FTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLC DSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECT RLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTW ELENKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYY TCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSEDYEIDQYEEFCFSVRF KAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGEY IFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPL PSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSST LNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPFIQDNIS

Формула изобретения

1. Белок, содержащий:

(a) первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16,

при этом второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область 1 (CDR1), определяющую комплементарность область 2 (CDR2) и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 55, соответственно; и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно;

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 59, 63 и 54, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 86, 66 и 67, соответственно;

(iii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 88 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 91, 92 и 93, соответственно;

(iv) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 97, 99 и 100, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 101, 102 и 103, соответственно;

(v) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92 и 93, соответственно;

(vi) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 109, 110 и 111, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114, соответственно;

(vii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 117, 118 и 119, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 120, 121 и 122 соответственно;

(viii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92 и 93, соответственно;

(ix) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 33 и 127, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 128, 129 и 130, соответственно; или

(x) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 132, 133 и 134, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 46, соответственно.

2. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 55, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно.

3. Белок по п. 2, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 5, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно.

4. Белок по п. 2, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 4 и 50, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно.

5. Белок по любому из пп. 2-4, где VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 37, и VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 38.

6. Белок по любому из пп. 2-5, где VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

7. Белок по п. 6, где VH и VL содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 10; 13 и 10; 17 и 10; 9 и 22; 9 и 26; 9 и 30; 9 и 34; 37 и 38; 41 и 42; 45 и 42; или 49 и 42, соответственно.

8. Белок по любому из пп. 2-7, где второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), и где scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 31, 32, 35, 36, 39, 40, 43, 44, 47, 48, 51 и 52.

9. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 59, 63 и 54, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 86, 66 и 67, соответственно.

10. Белок по п. 9, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 78, 63, 79, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 80, 66, 67, соответственно.

11. Белок по п. 9, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 63, 64, соответственно; и VL, содержащий CDR1,

CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66, 67, соответственно.

12. Белок по любому из пп. 9-11, где VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:76, и VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 77.

13. Белок по любому из пп. 9-12, где VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

14. Белок по п. 13, где VH и VL содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68 и 69; 72 и 73; или 76 и 77, соответственно.

15. Белок по любому из пп. 9-14, где второй антигенсвязывающий сайт представлен в виде scFv, и где scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 70, 71, 74, 75, 81 и 82.

16. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 88 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 91, 92 и 93, соответственно.

17. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 97, 99 и 100, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 101, 102 и 103, соответственно.

18. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1,

CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92 и 93, соответственно.

19. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 109, 110 и 111, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114, соответственно.

20. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 117, 118 и 119, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 120, 121 и 122, соответственно.

21. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87, 98 и 89, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 106, 92 и 93, соответственно.

22. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 33 и 127, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 128, 129 и 130, соответственно.

23. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 132, 133 и 134, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 46, соответственно.

24. Белок по любому из предыдущих пунктов, где второй антигенсвязывающий сайт связывает FLT3 человека с константой диссоциации (K_D), меньшей или равной 20 нМ по данным измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

25. Белок по любому из пп. 2-8, 16, 17 и 21, где второй антигенсвязывающий сайт связывает FLT3 человека с K_D, меньшей или равной 10 нМ по данным измерения с помощью SPR.

26. Антигенсвязывающий сайт по любому из пп. 2-8, где антигенсвязывающий сайт связывает вариант FLT3 человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:318.

27. Антигенсвязывающий сайт по любому из пп. 2-8, где антигенсвязывающий сайт связывает вариант FLT3 человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:319.

28. Белок по любому из пп. 2-21 и 23-27, где антигенсвязывающий сайт связывает FLT3 яванского макака.

29. Белок по любому из пп. 2-20 и 22-28, где антигенсвязывающий сайт не конкурирует с FLT3L за связывание FLT3.

30. Белок по любому из предшествующих пунктов, где белок содержит Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16.

31. Белок по любому из пп. 1-30, где первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой Fab-фрагмент, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, представляет собой scFv.

32. Белок по любому из пп. 1-30, где первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3, представляет собой Fab-фрагмент.

33. Белок по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащий дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3.

34. Белок по любому из пп. 1-30 и 32-33, где первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, и второй и дополнительный антигенсвязывающие сайты, которые связывают FLT3, представляют собой Fab-фрагмент.

35. Белок по любому из пп. 1-30 и 33, где первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, и второй и дополнительный антигенсвязывающие сайты, которые связывают FLT3, каждый, представляют собой scFv.

36. Белок по пп. 31, 32, 34 или 35, где scFv, который связывает FLT3, и/или scFv, который связывает NKG2D, содержат вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи.

37. Белок по п. 36, где scFv связан с константным доменом антитела или его частью, достаточной для связывания CD16, посредством шарнира, содержащего Ala-Ser или Gly-Ser.

38. Белок по п. 37, где шарнир дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly.

39. Белок по любому из пп. 36-38, где вариабельный домен тяжелой цепи scFv образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи scFv.

40. Белок по п. 39, где дисульфидный мостик образован между C44 вариабельного домена тяжелой цепи и C100 вариабельного домена легкой цепи, пронумерованных согласно нумерации Кэбата.

41. Белок по любому из пп. 36-40, где вариабельный домен тяжелой цепи scFv связан с вариабельным доменом легкой цепи scFv посредством гибкого линкера.

42. Белок по п. 41, где гибкий линкер содержит $(G_4S)_4$.

43. Белок по любому из пп. 36-42, где в пределах scFv вариабельный домен тяжелой цепи расположен на C-конце вариабельного домена легкой цепи.

44. Белок по любому из пп. 36-42, где в пределах scFv вариабельный домен тяжелой цепи расположен на N-конце вариабельного домена легкой цепи.

45. Белок по любому из пп. 31-34 и 36-44, где Fab не расположен между антигенсвязывающим сайтом и Fc или его частью.

46. Белок по любому из предшествующих пунктов, где первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 270 или 271, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

47. Белок по п. 46, где первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, содержит:

(i) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 255 или 256, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно; или

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 или 241, 242 и 243 или 244, соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276, 236 и 245, соответственно.

48. Белок по п. 46 или 47, где VH первого антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:254, и VL первого антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:239.

49. Белок по любому из пп. 46-48, где VH первого антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 254, и VL первого антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:239.

50. Белок по любому из предыдущих пунктов, где Fc-домен антитела представляет собой Fc-домен антитела IgG1 человека.

51. Белок по п. 50, где Fc-домен антитела или его часть содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:136.

52. Белок по п. 50 или 51, где по меньшей мере одна полипептидная цепь Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций относительно SEQ ID NO:136 в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EC.

53. Белок по любому из пп. 50-52, где по меньшей мере одна полипептидная цепь Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций относительно SEQ ID NO:136, выбранных из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EC.

54. Белок по любому из пп. 50-53, где одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций относительно SEQ ID NO:136 в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, L351. , S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций относительно SEQ ID

NO:136 в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, S364, T366, L368. , K370, N390, K392, T394, D399, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EC.

55. Белок по п. 54, где одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены K360E и K409W относительно SEQ ID NO:136; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены Q347R, D399V и F405T относительно SEQ ID NO:136, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EC.

56. Белок по п. 54 или 55, где одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену Y349C относительно SEQ ID NO:136; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену S354C относительно SEQ ID NO:136, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EC.

57. Белок, содержащий:

(a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:278;

(b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:279; и

(c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 277, 283, 284, 285, 286, 287, 288 и 289.

58. Белок, содержащий:

(a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:280;

(b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:281; и

(c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:282.

59. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

60. Клетка, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих белок по любому из пп. 1-58.

61. Способ усиления гибели опухолевых клеток, включающий подвергание опухолевых клеток и естественных клеток-киллеров воздействию эффективного количества белка по любому из пп. 1-58 или фармацевтической композиции по п. 59.

62. Способ лечения рака, включающий введение эффективного количества белка по любому из пп. 1-58 или фармацевтической композиции по п. 59 нуждающемуся в этом пациенту.

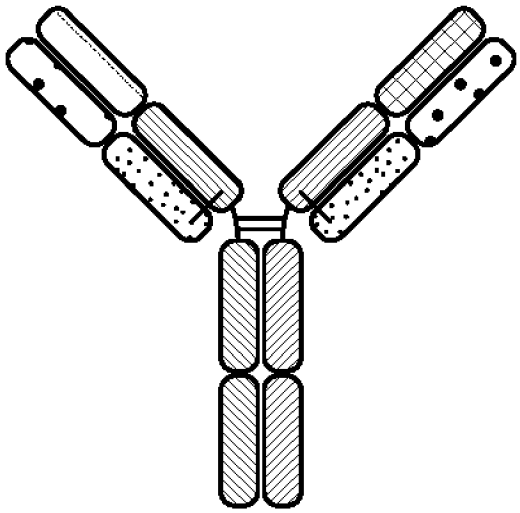
63. Способ по п. 62, где рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование.

64. Способ по п. 63, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз.

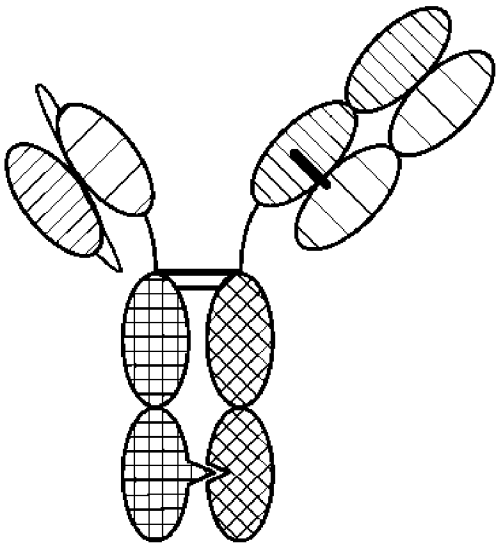
65. Способ по п. 63 или 64, выбранный из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), острого лимфобластного лейкоза (ALL), миелодисплазии, острого Т-лимфобластного лейкоза и острого промиелоцитарного лейкоза.

66. Способ по любому из пп. 62-65, где рак экспрессирует FLT3.

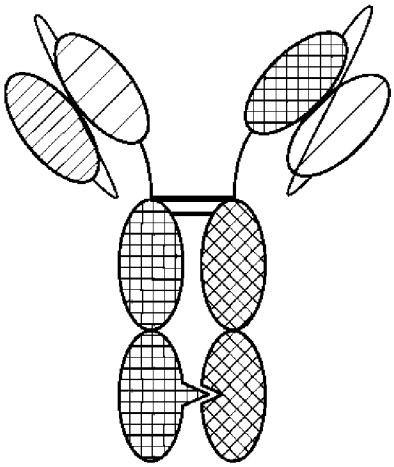
ФИГ. 1



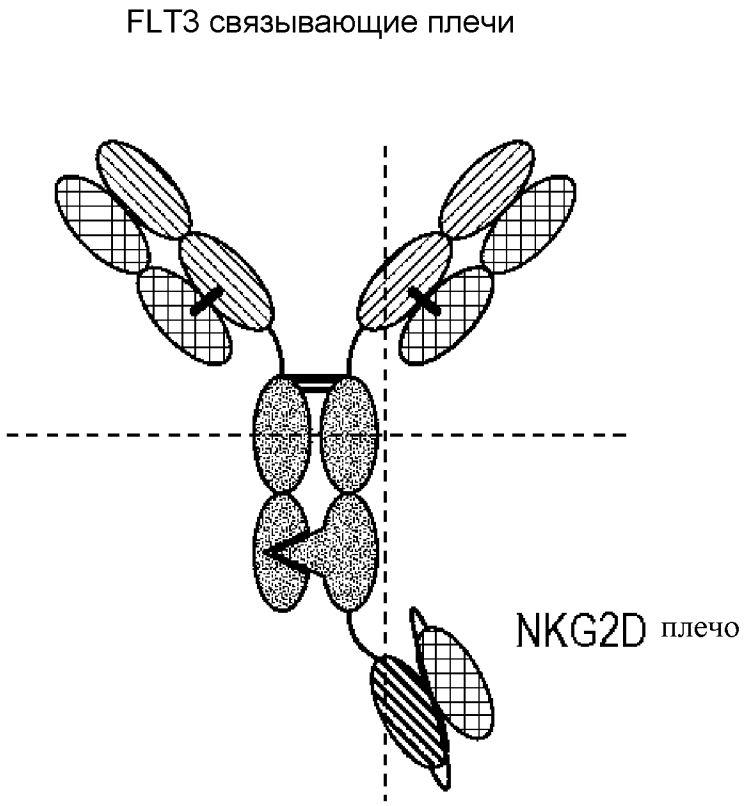
ФИГ. 2А



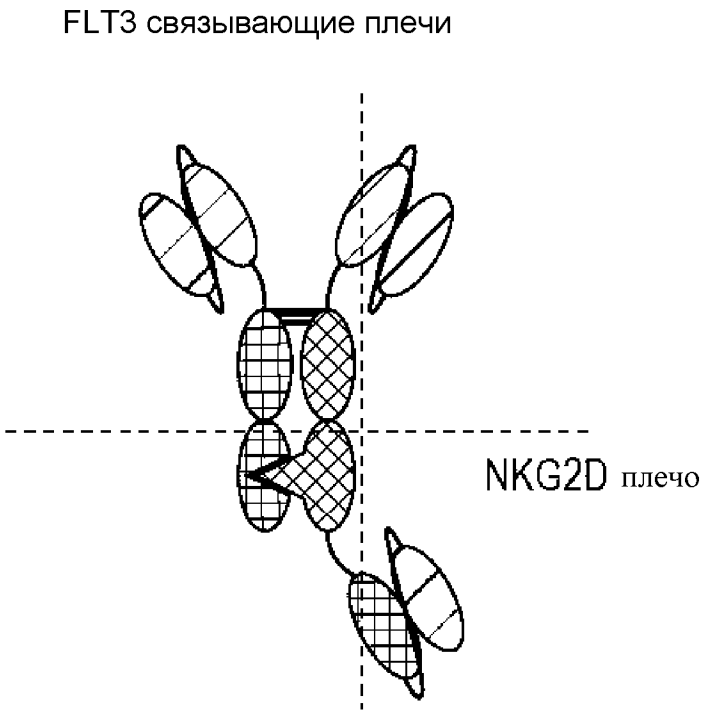
ФИГ. 2В



ФИГ. 2C


FLT3 связывающие плечи
NKG2D плечо

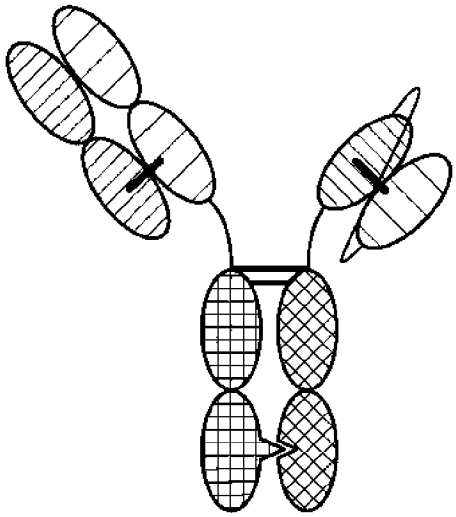
ФИГ. 2D


FLT3 связывающие плечи
NKG2D плечо

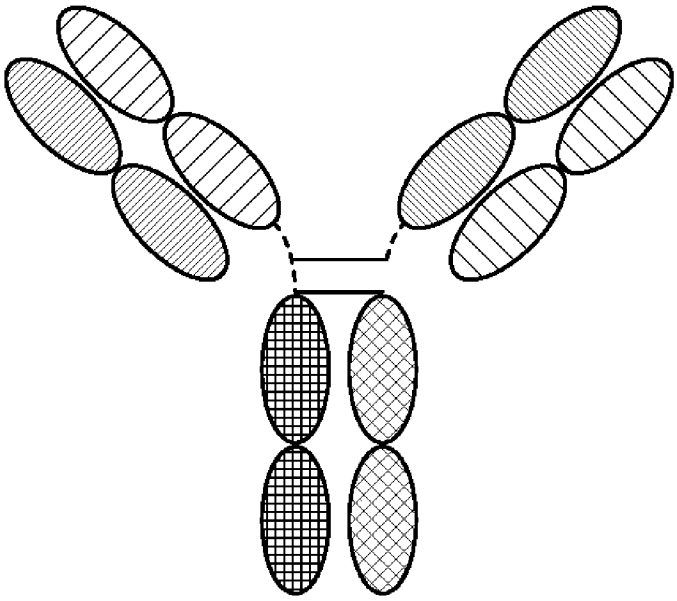
ФИГ. 2E

нацеленный на NK-клетки
Fab-фрагмент

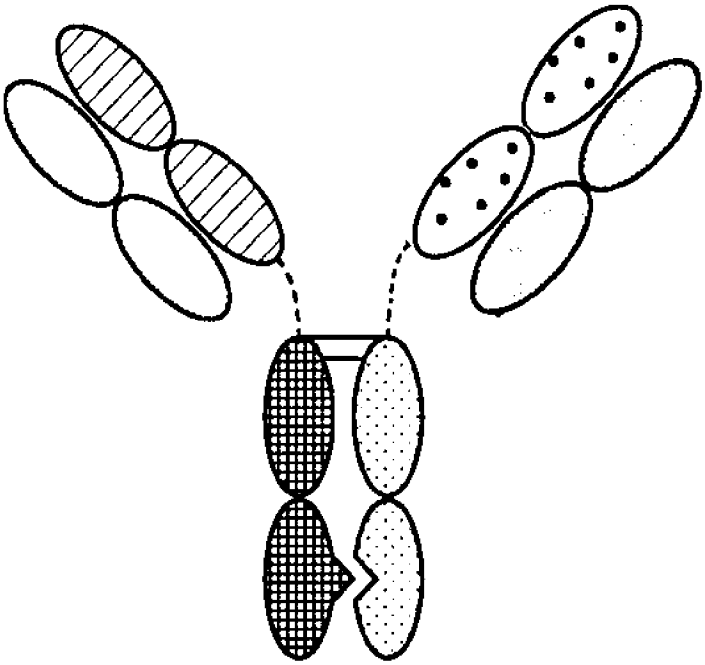
нацеленный на
опухолевые клетки
scFv



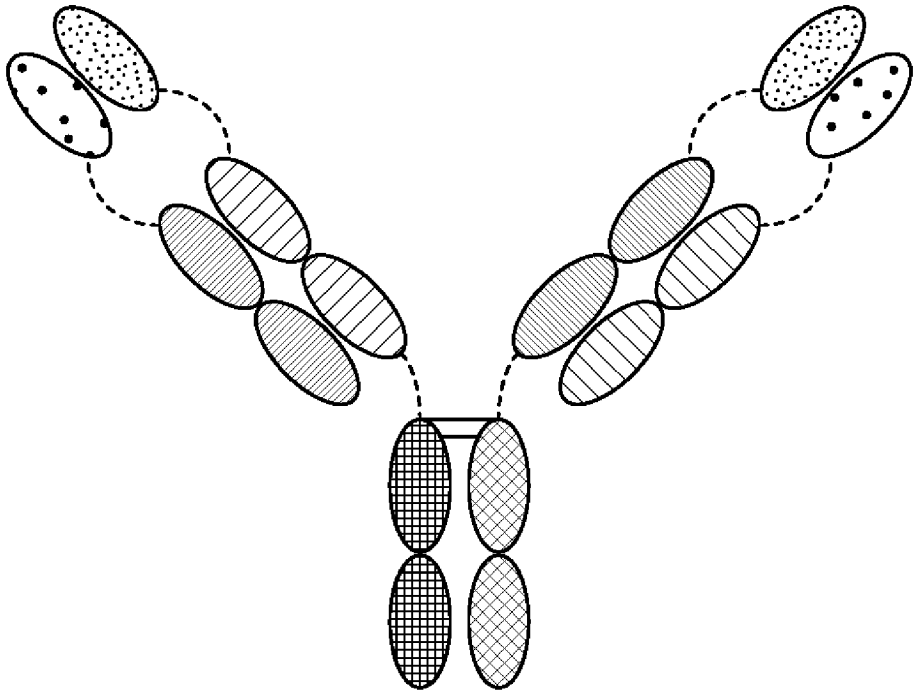
ФИГ. 3



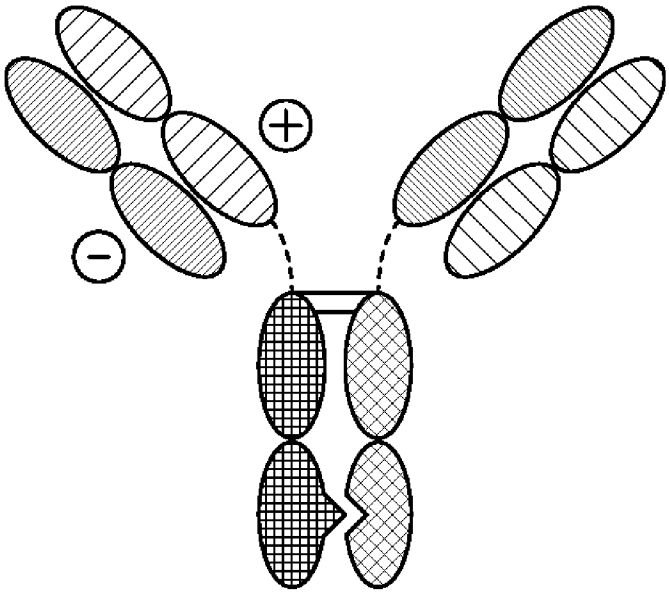
ФИГ. 4



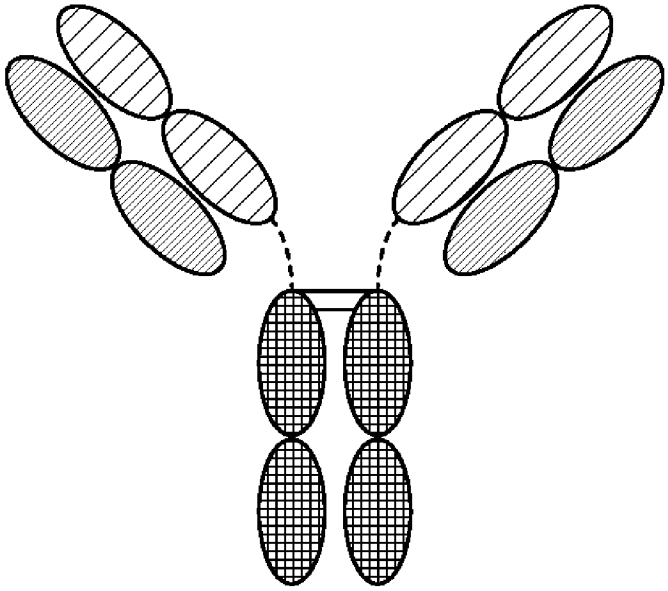
ФИГ. 5



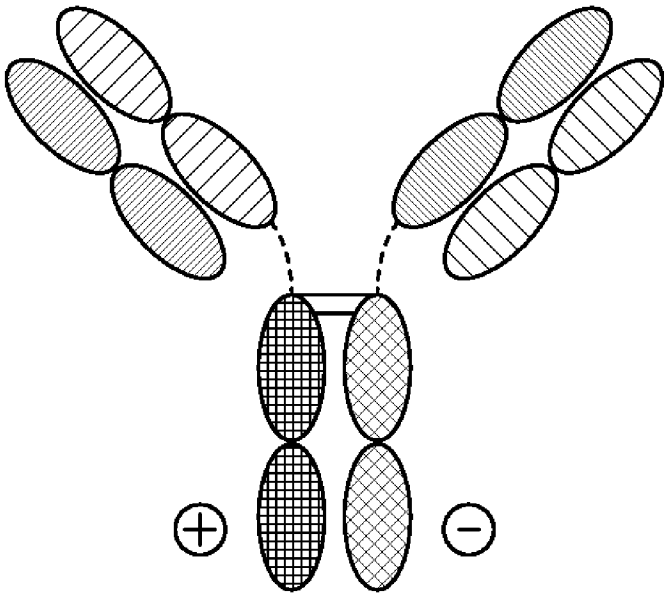
ФИГ. 6



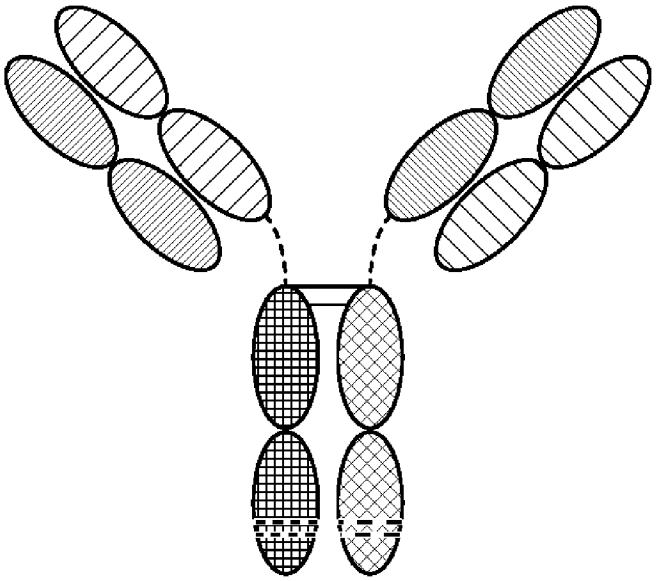
ФИГ. 7



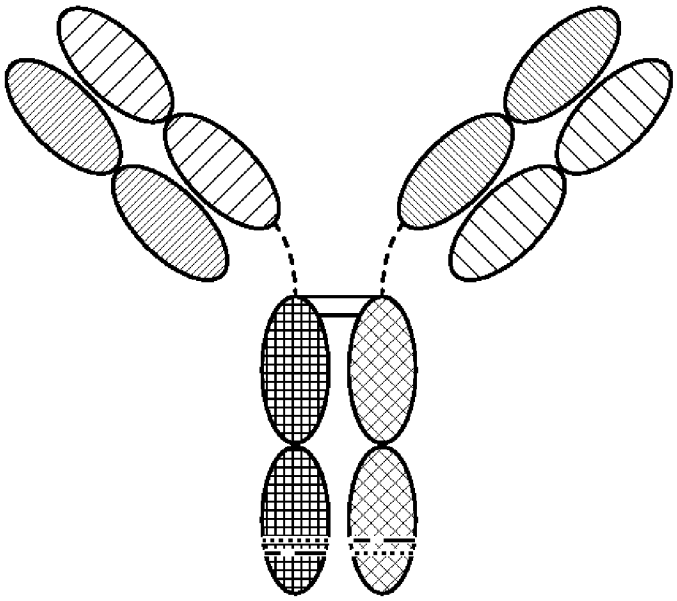
ФИГ. 8



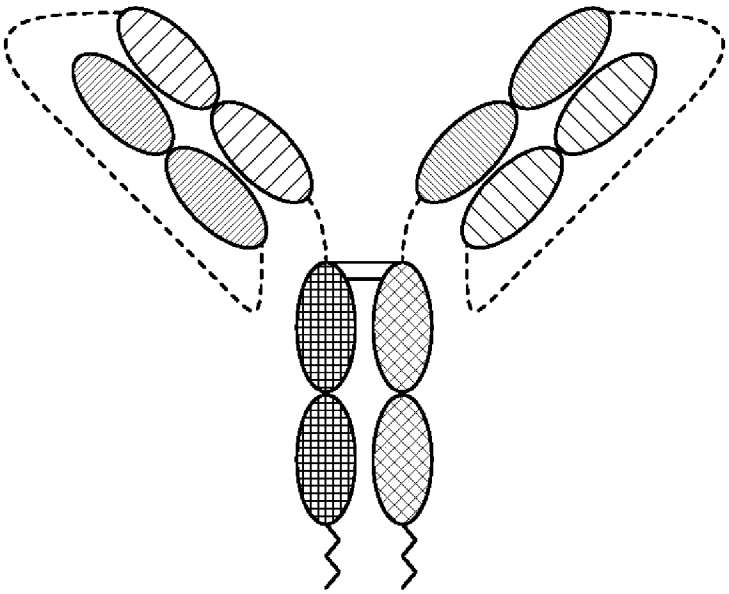
ФИГ. 9



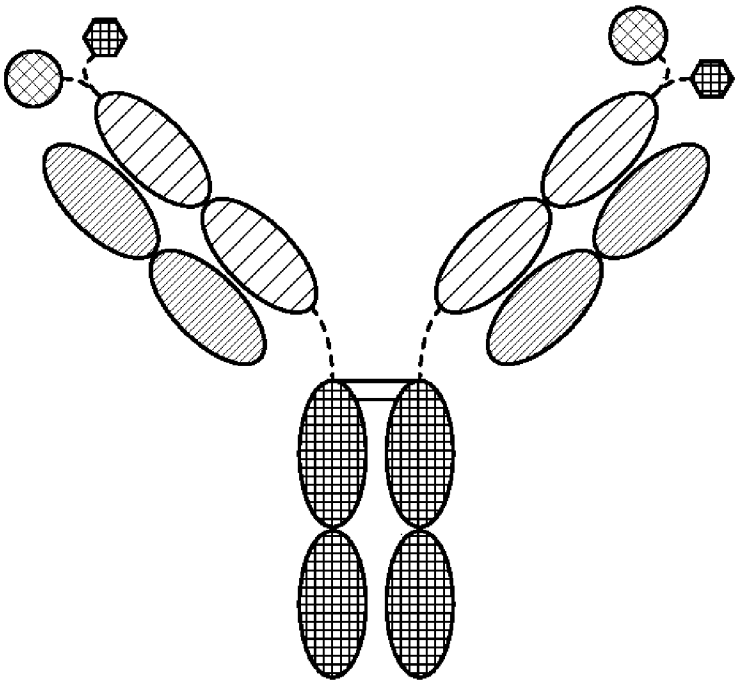
ФИГ. 10



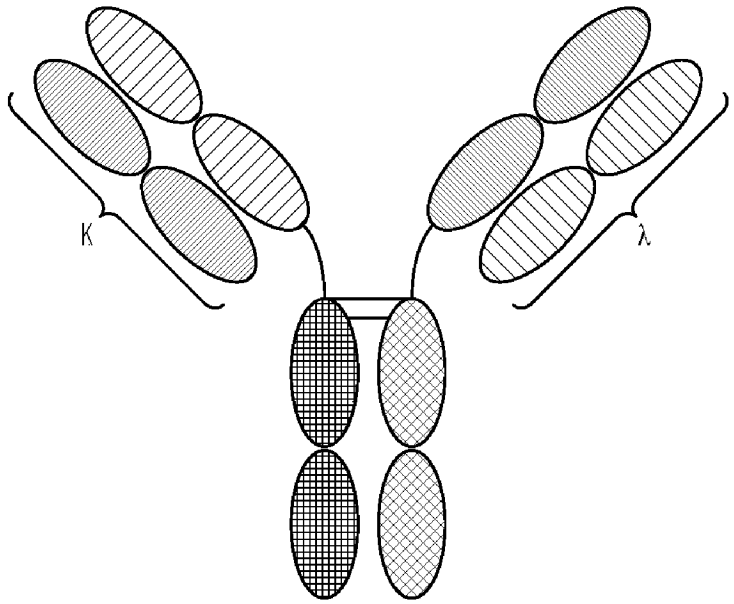
ФИГ. 11



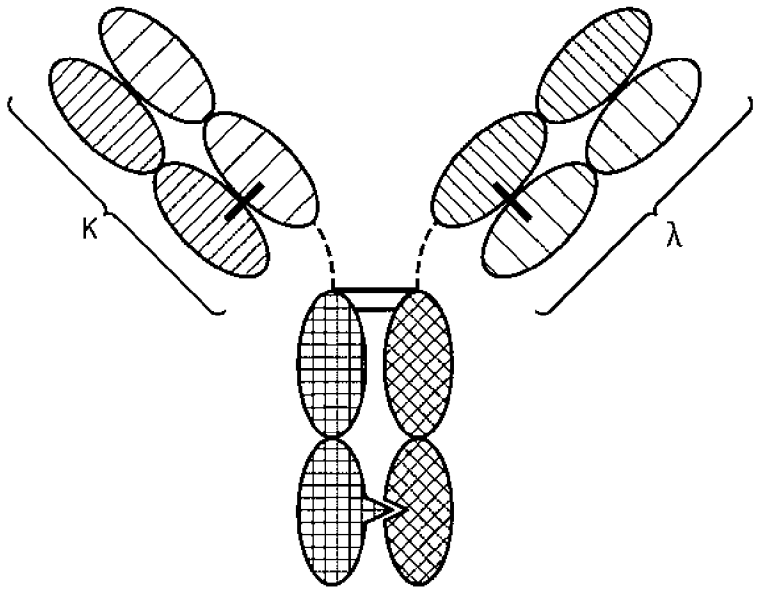
ФИГ. 12



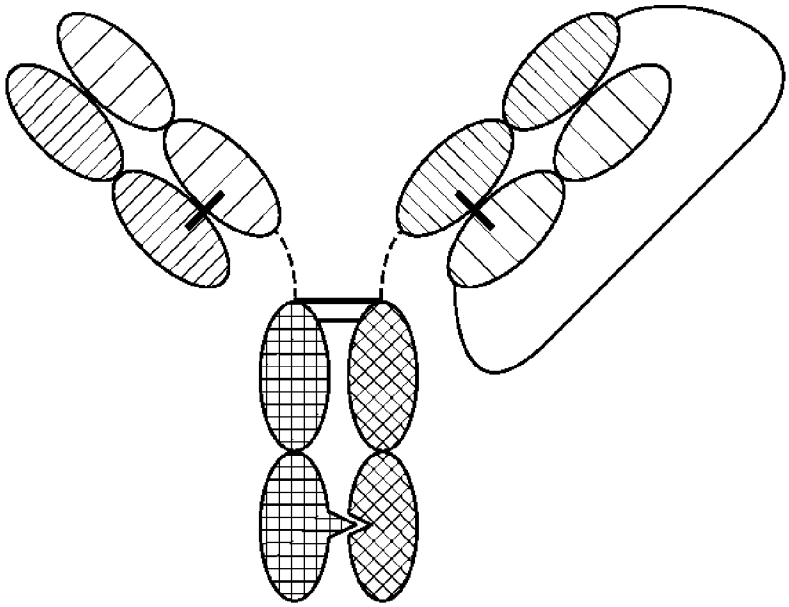
ФИГ. 13A



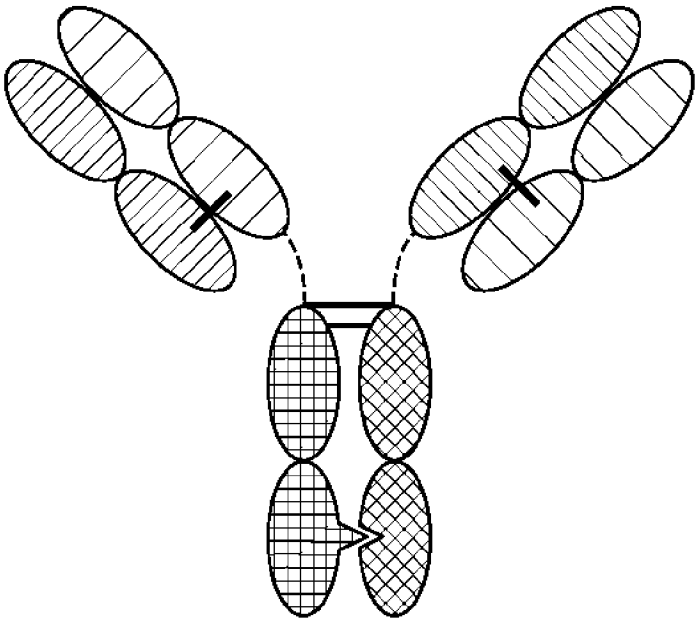
ФИГ. 13B



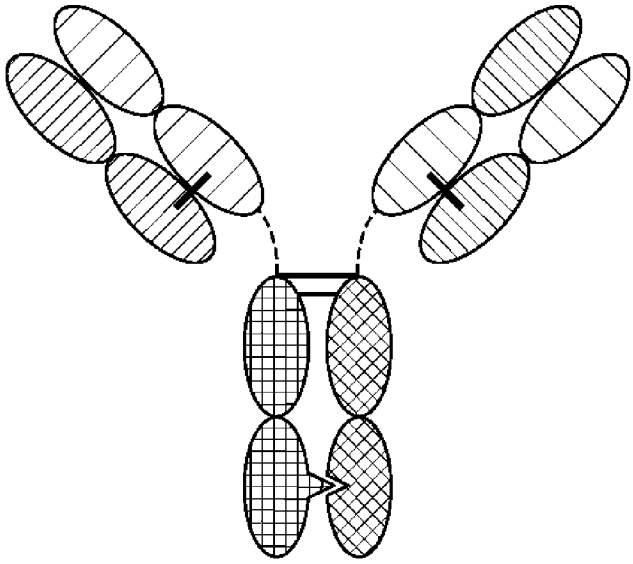
ФИГ. 14



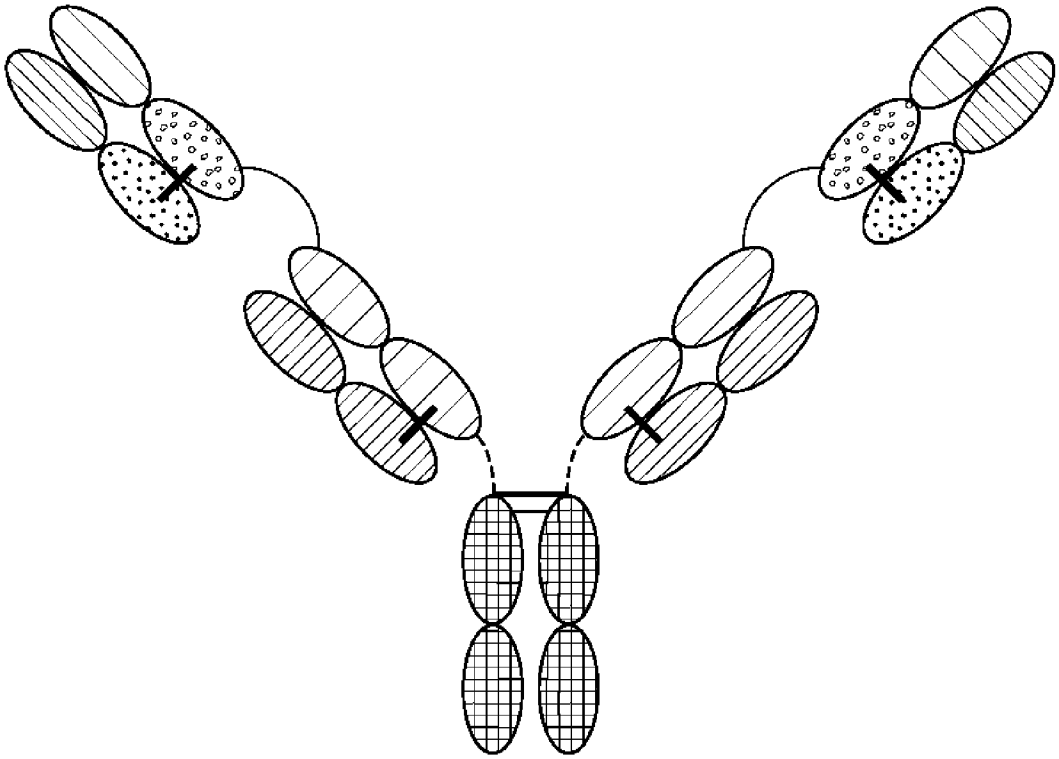
ФИГ. 15



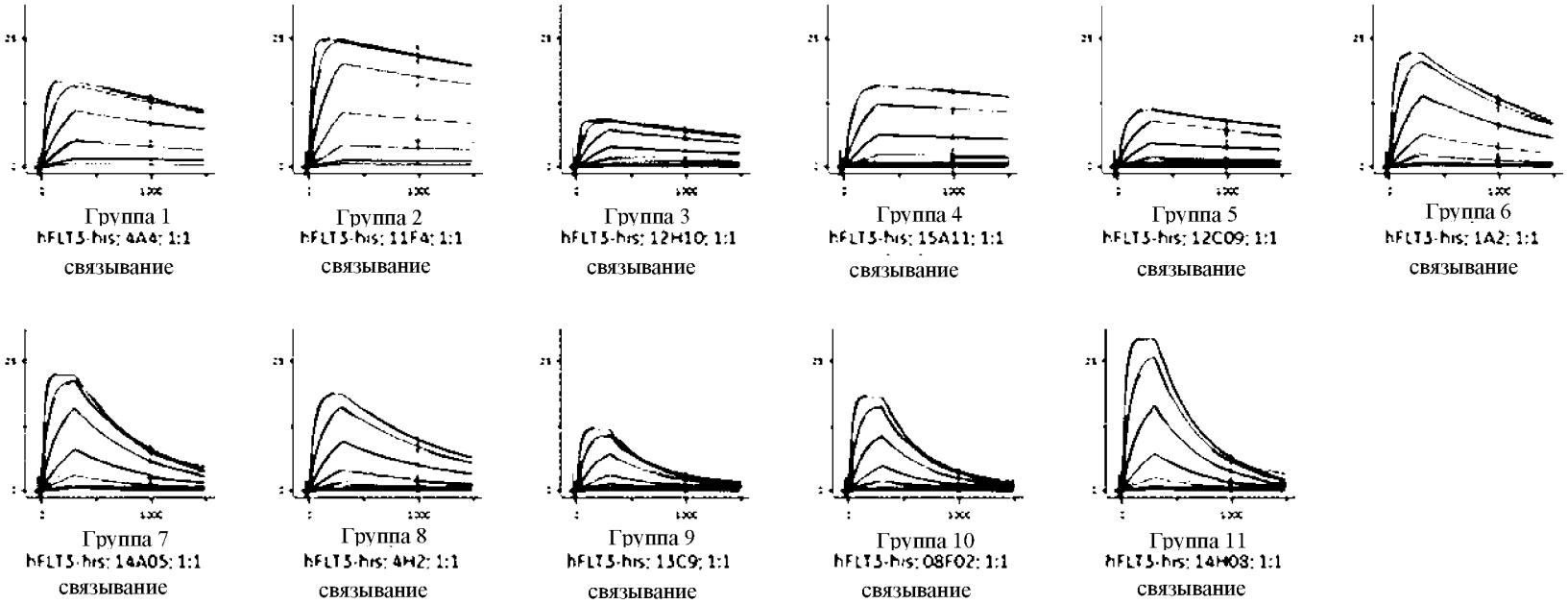
ФИГ. 16



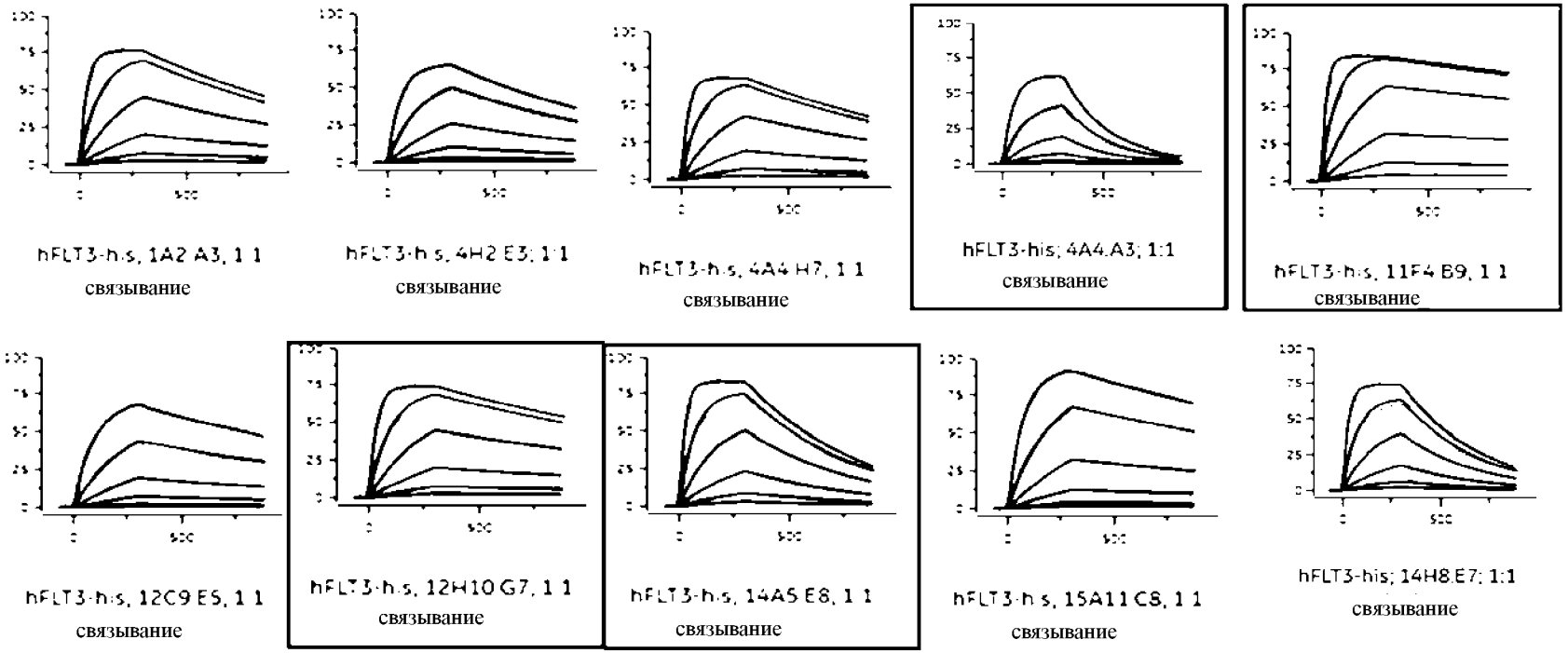
ФИГ. 17



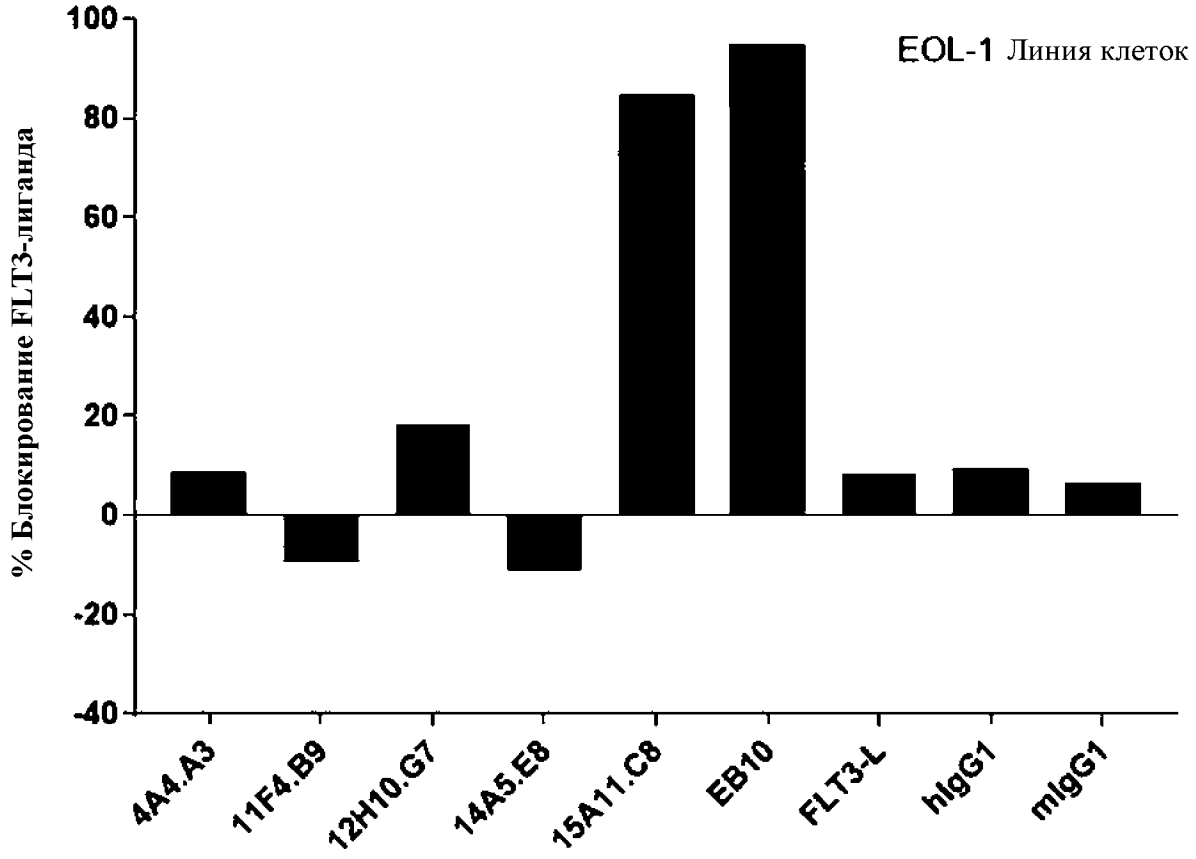
ФИГ. 18


Группа 1
hFLT3-his; 4A4; 1:1
связывание
Группа 2
hFLT3-his; 11F4; 1:1
связывание
Группа 3
hFLT3-his; 12H10; 1:1
связывание
Группа 4
hFLT3-his; 15A11; 1:1
связывание
Группа 5
hFLT3-his; 12C09; 1:1
связывание
Группа 6
hFLT3-his; 1A2; 1:1
связывание
Группа 7
hFLT3-his; 14A05; 1:1
связывание
Группа 8
hFLT3-his; 4H2; 1:1
связывание
Группа 9
hFLT3-his; 13C9; 1:1
связывание
Группа 10
hFLT3-his; 08F02; 1:1
связывание
Группа 11
hFLT3-his; 14H08; 1:1
связывание

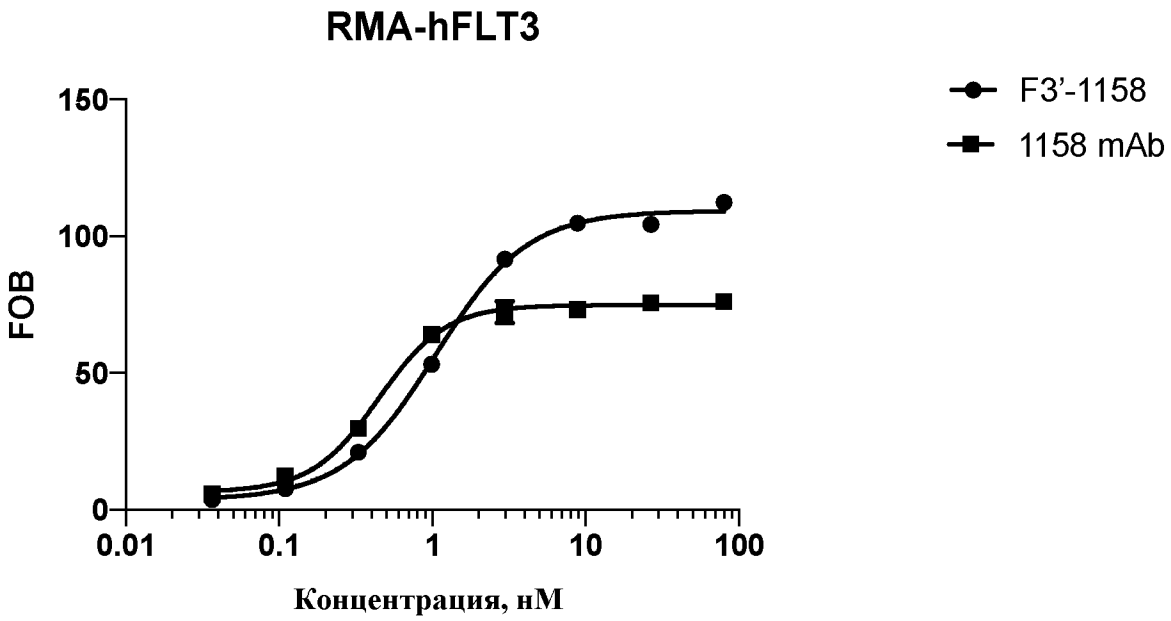
ФИГ. 19


hFLT3-his, 1A2 A3, 1 1
связывание
hFLT3-his, 4H2 E3; 1:1
связывание
hFLT3-his, 4A4 H7, 1 1
связывание
hFLT3-his; 4A4.A3; 1:1
связывание
hFLT3-his, 11F4 B9, 1 1
связывание
hFLT3-his, 12C9 E5, 1 1
связывание
hFLT3-his, 12H10 G7, 1 1
связывание
hFLT3-his, 14A5 E8, 1 1
связывание
hFLT3-his, 15A11 C8, 1 1
связывание
hFLT3-his; 14H8.E7; 1:1
связывание

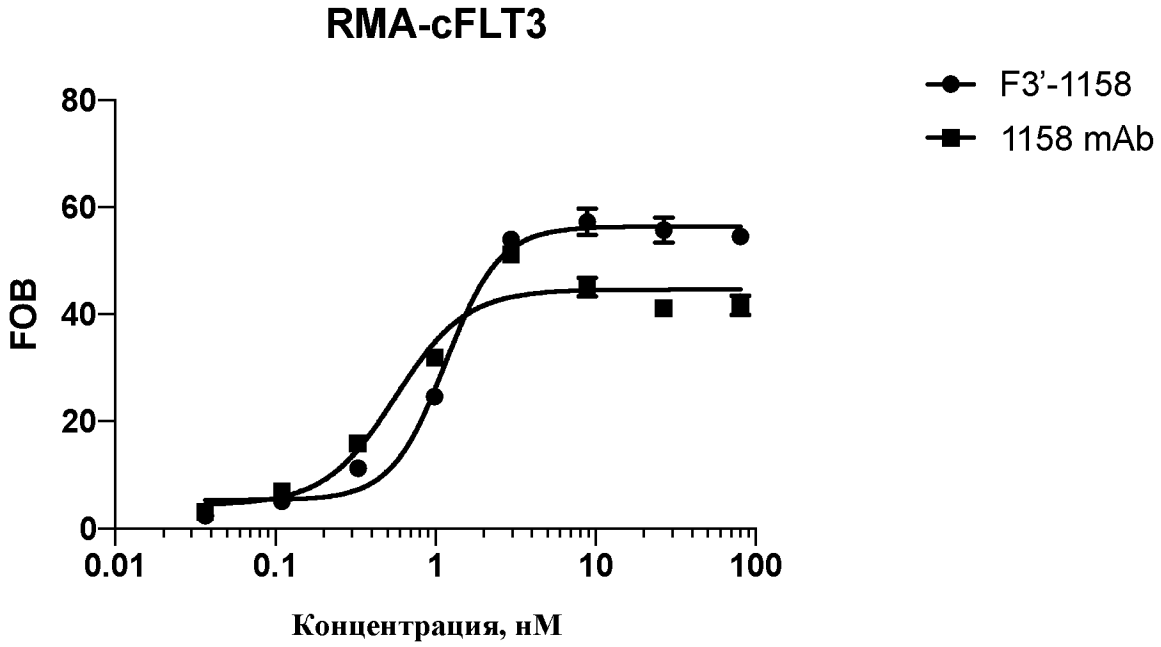
ФИГ. 20


EOL-1 Линия клеток
% Блокирование FLT3-лиганда
100
80
60
40
20
0
-20
-40
4A4.A3
11F4.B9
12H10.G7
14A5.E8
15A11.C8
EB10
FLT3-L
hIgG1
mIgG1

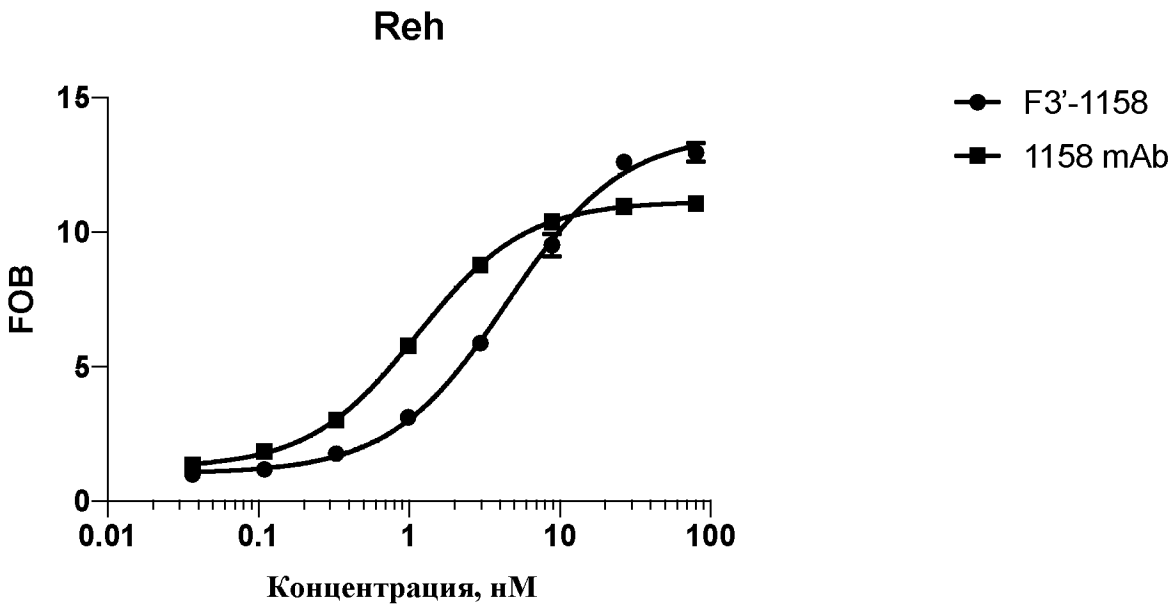
ФИГ. 21A



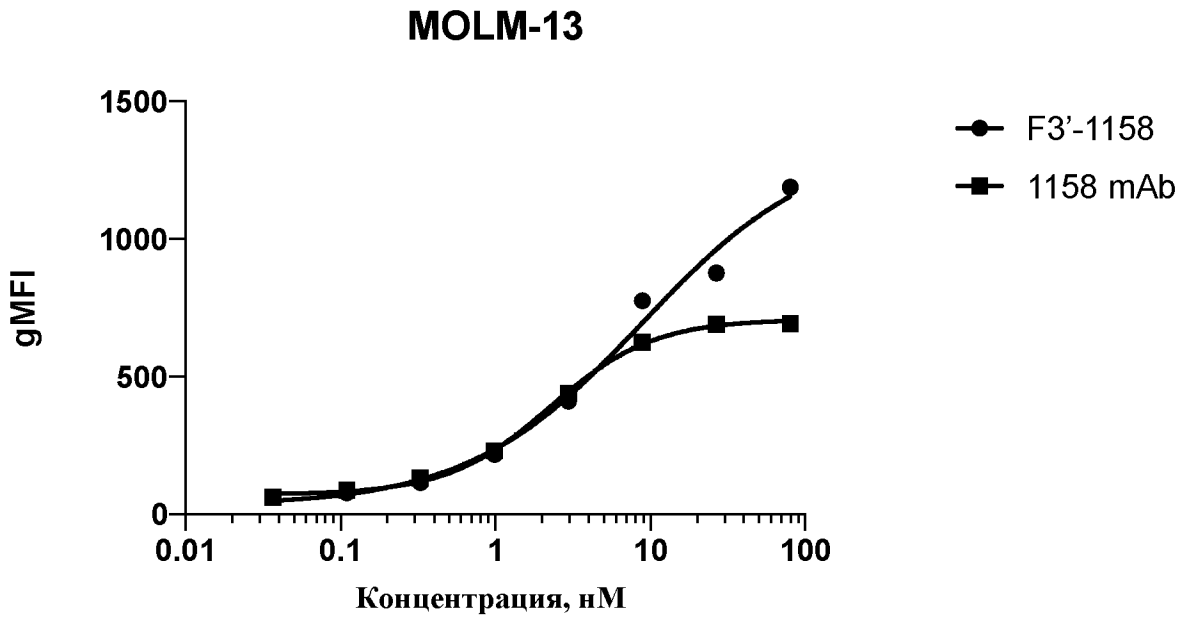
ФИГ. 21B



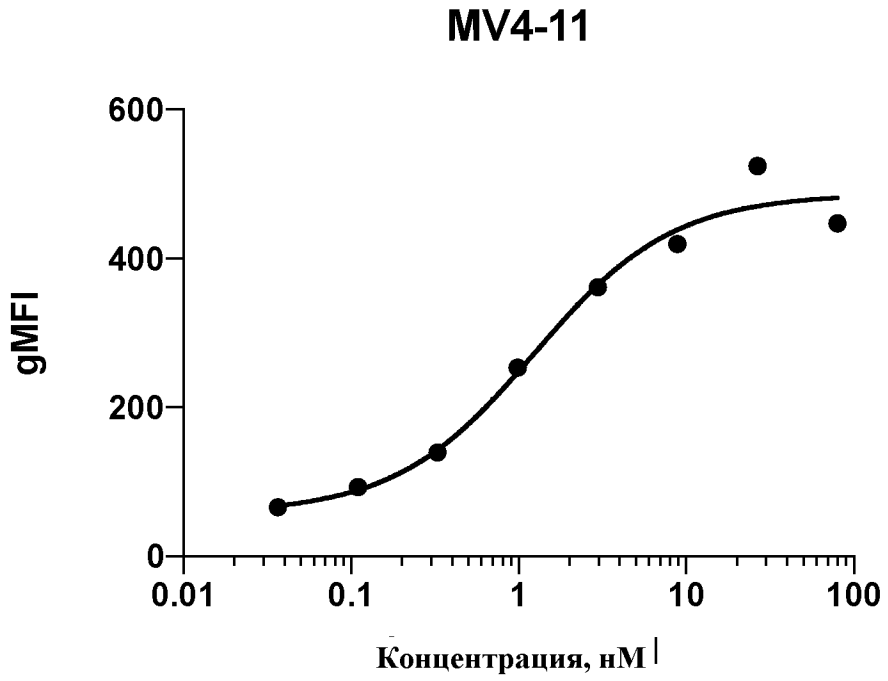
ФИГ. 21C


Reh
15
10
5
0
FOB
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация, нМ
F3'-1158
1158 mAb

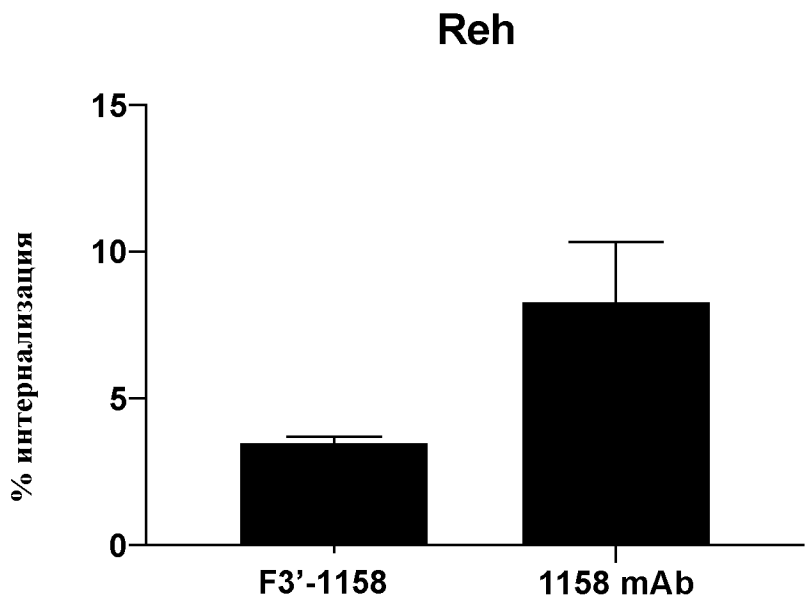
ФИГ. 22A



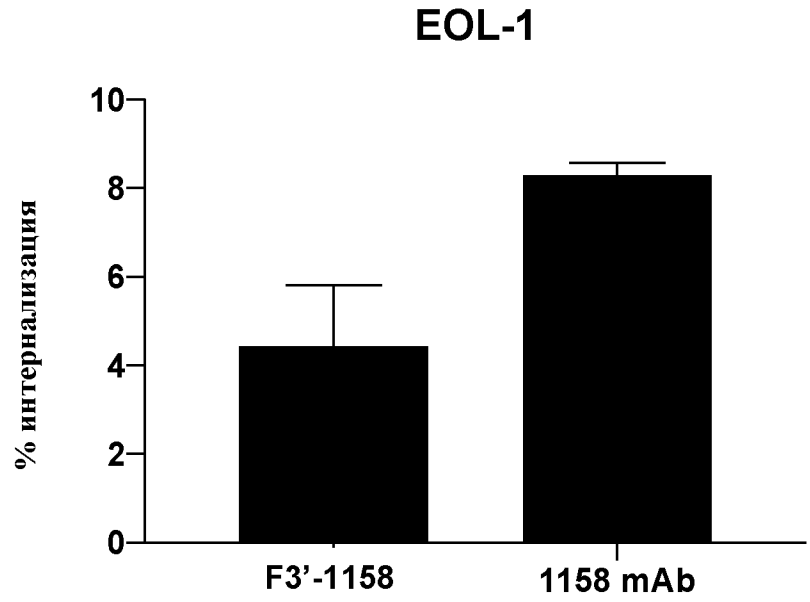
ФИГ. 22B



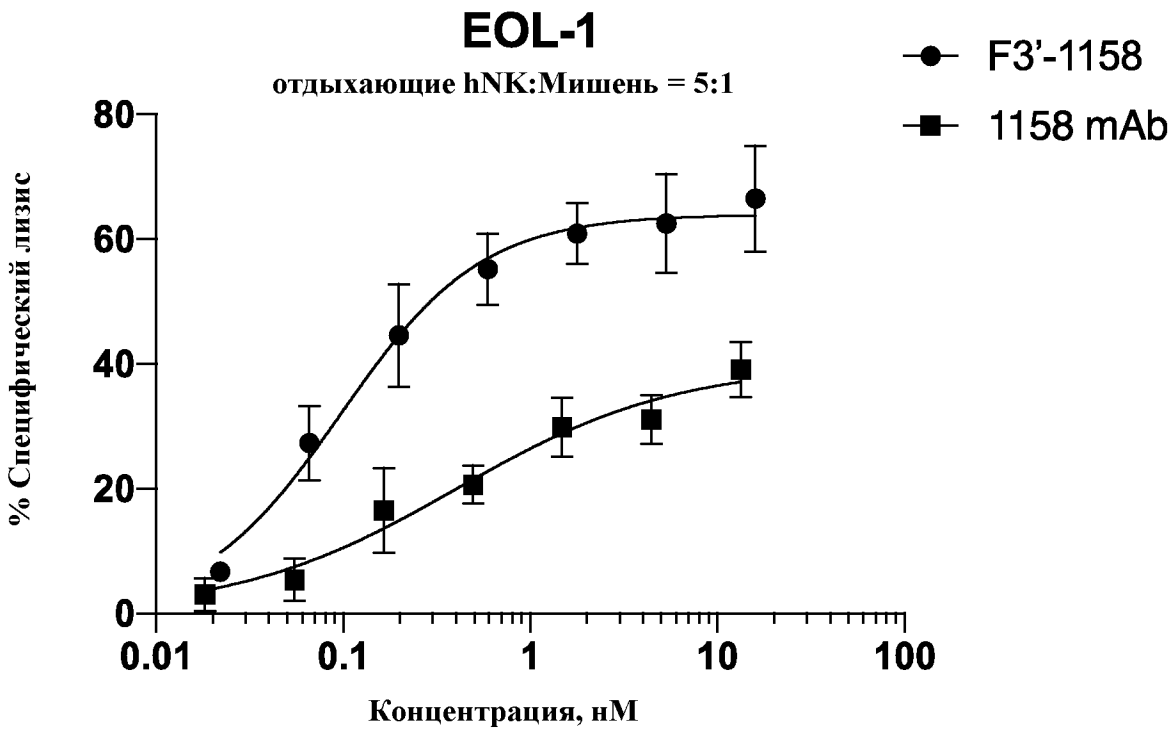
ФИГ. 23A



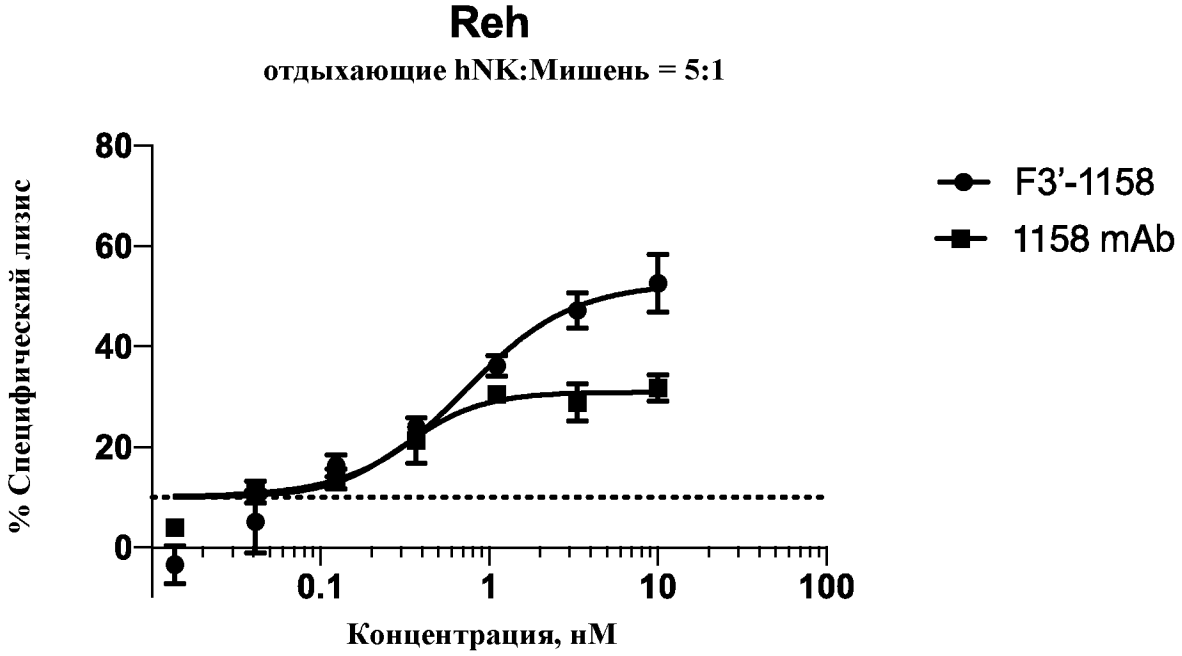
ФИГ. 23B



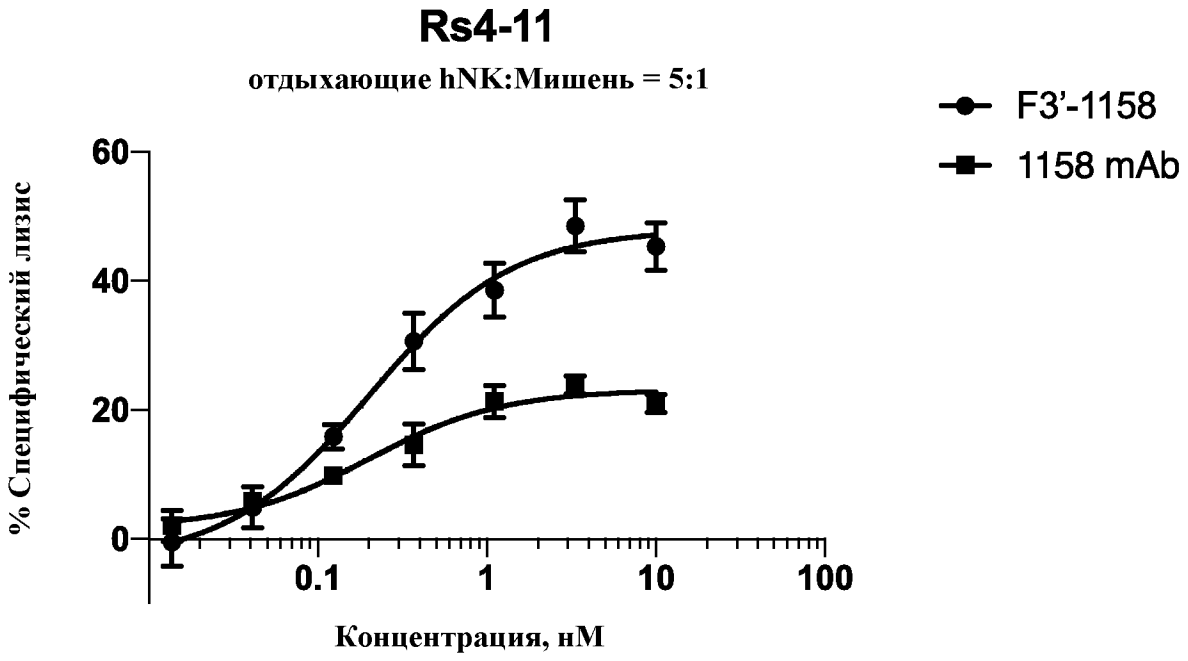
ФИГ. 24A



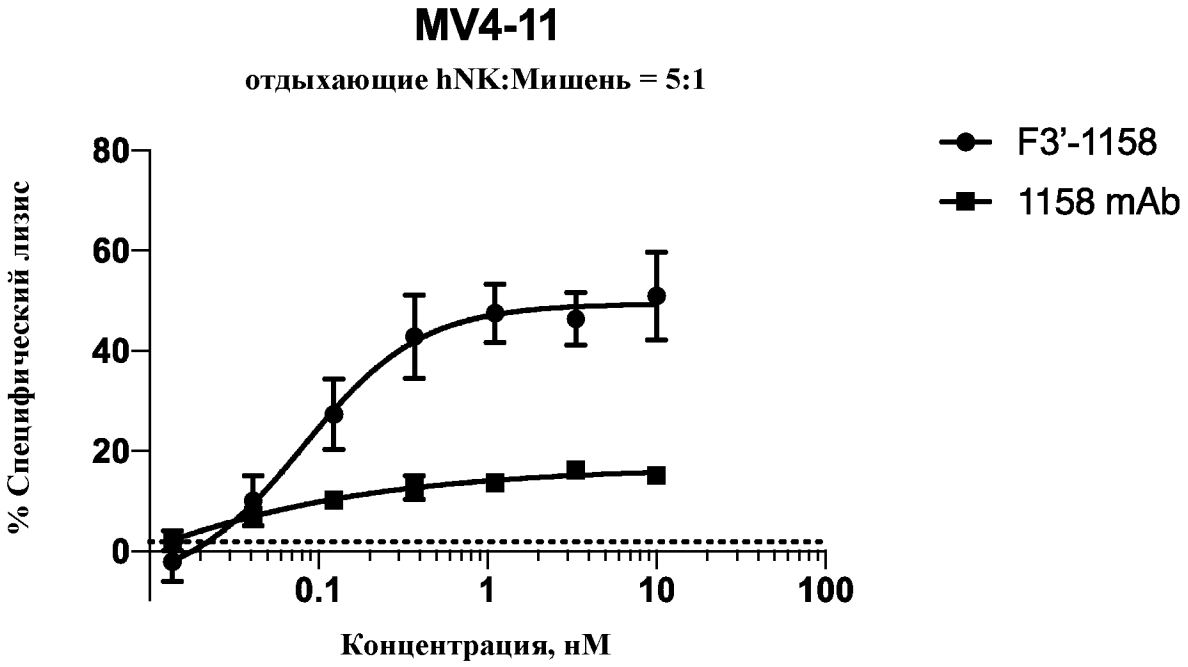
ФИГ. 24B



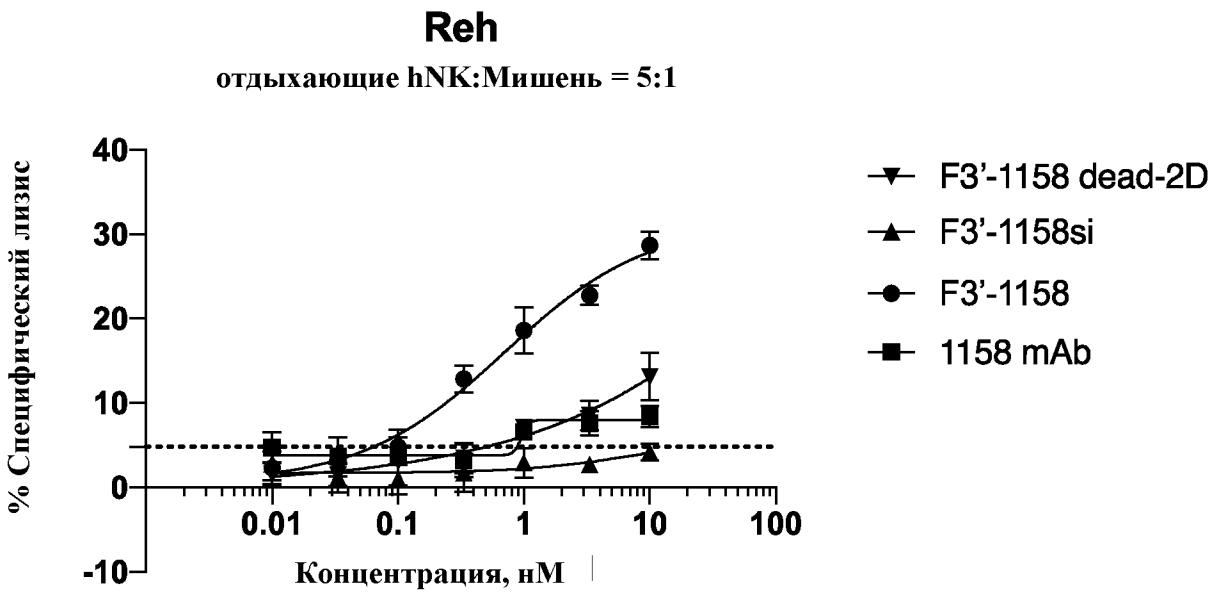
ФИГ. 24C



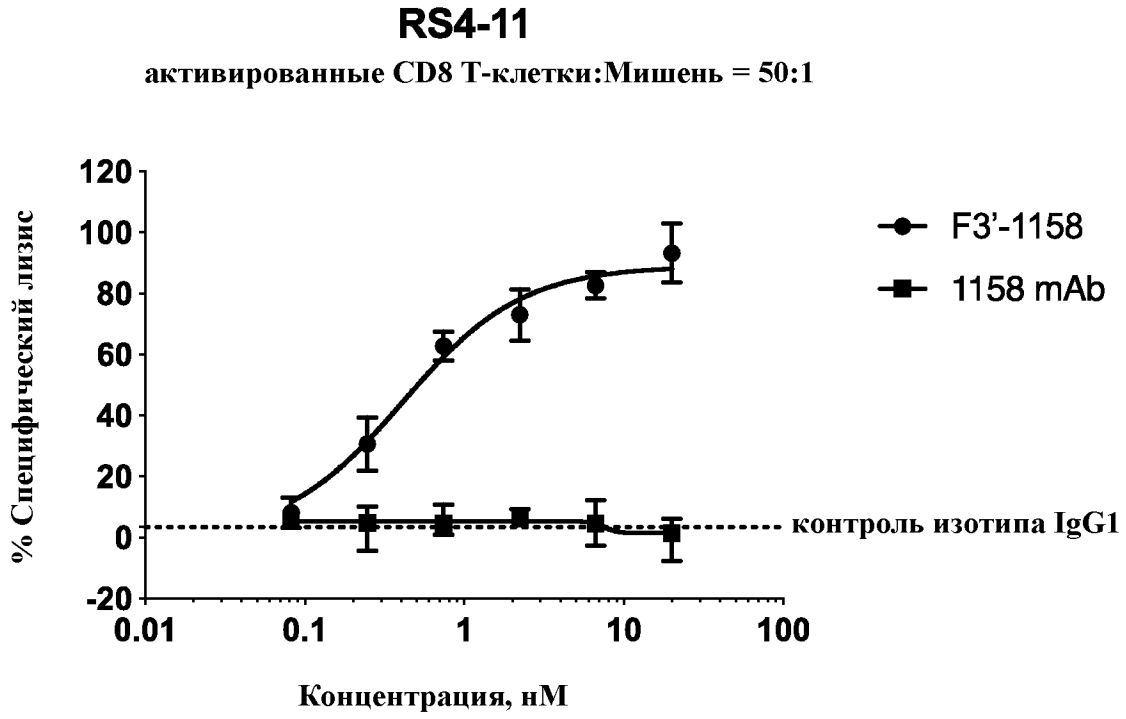
ФИГ. 24D



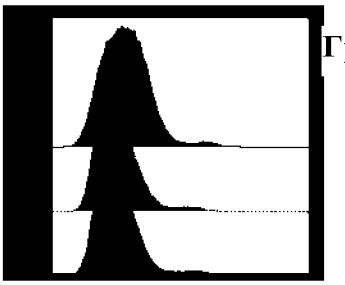
ФИГ. 25


Reh
отдыхающие hNK:Мишень = 5:1
% Специфический лизис
40
30
20
10
0
-10
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация, нМ
F3'-1158 dead-2D
F3'-1158si
F3'-1158
1158 mAb

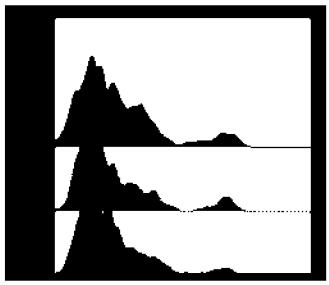
ФИГ. 26


RS4-11
активированные CD8 Т-клетки:Мишень = 50:1
% Специфический лизис
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация, нМ
F3'-1158
1158 mAb
контроль изотипа IgG1

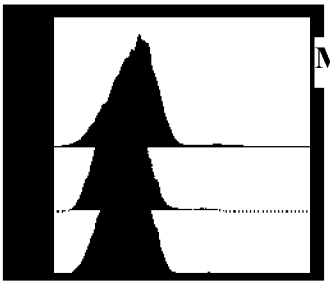
ФИГ. 27



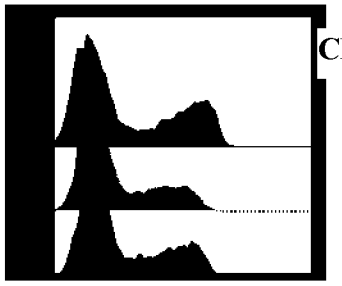
Гранулоциты



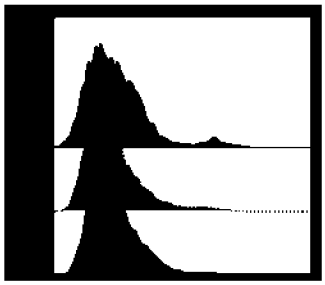
NK- клетки



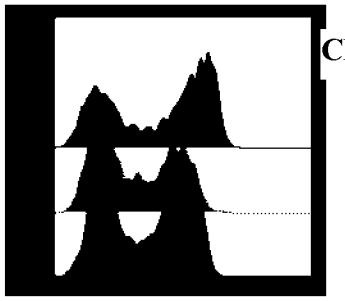
Моноциты



CD8 Т-клетки

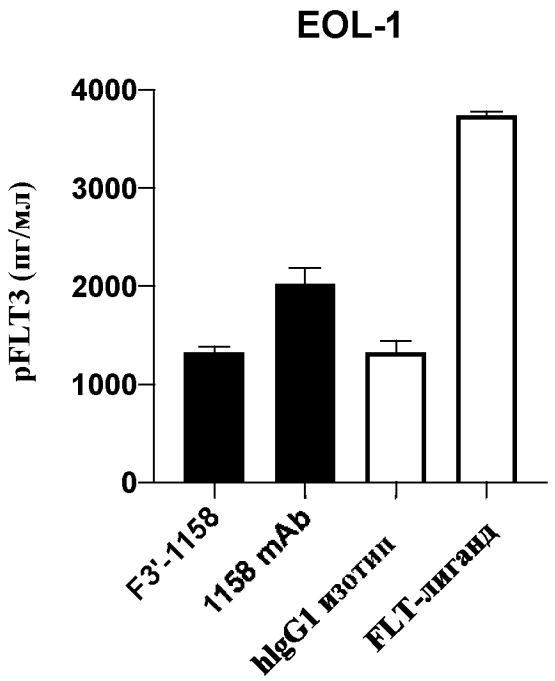
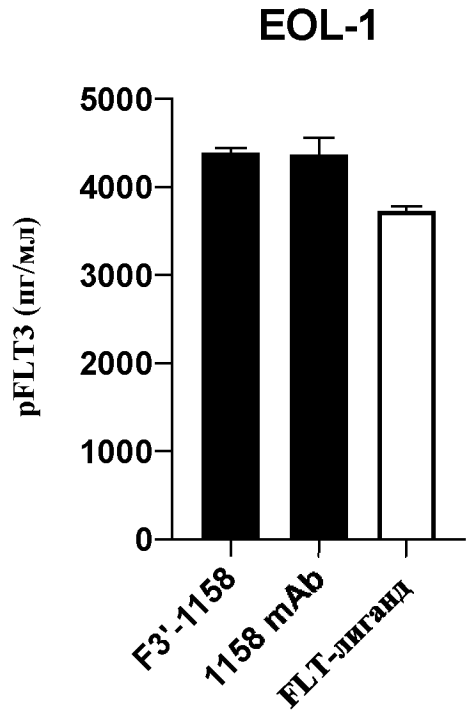


В-клетки



CD4 Т-клетки

ФИГ. 28A



ФИГ. 28B