(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292773 (13) A1

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
**2023.01.13**

(22) Дата подачи заявки
**2021.05.05**

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
***C07K 16/28*** (2006.01)

## (54) БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ NKG2D, CD16 И CLEC12A

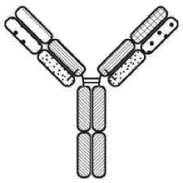
(31) **63/020,798**
(32) **2020.05.06**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/030821**
(87) **WO 2021/226193 2021.11.11**

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

(72) Изобретатель:
**Баруах Хеманта, Чанг Грегори П., Чеунг Энн Ф., Фэллон Дэниел, Гринберг Ася, Цзюйо Цзун Шон, Морган Кристофер Райан (US)**

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

(57) В изобретении описаны мультиспецифические связывающие белки, которые связывают рецептор NKG2D, CD16 и CLEC12A, фармацевтические композиции, содержащие мультиспецифические связывающие белки, и терапевтические способы, применимые для лечения рака.



202292773 A1

202292773 A1

# БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ NKG2D, CD16 И CLEC12A

**[0001]** Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/020798, поданной 6 мая 2020 г., которая во всей своей полноте включена в данный документ посредством ссылки.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0002]** В настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте включена машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей в текстовом формате ASCII. Текстовый файл перечня последовательностей имеет название "14247-540-228_SEQ_LISTING", при этом он был создан 3 мая 2021 г. и имеет размер 291375 байт.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

**[0003]** Настоящая заявка относится к мультиспецифическим связывающим белкам, которые связывают NKG2D, CD16 и CLEC12A на клетке, фармацевтическим композициям, содержащим такие белки, и терапевтическим способам с применением таких белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака.

## ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0004]** Несмотря на значительные исследовательские усилия, рак продолжает оставаться значительным клиническим и финансовым бременем в странах по всему миру. В соответствии с данными Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) он является второй по значимости причиной смертности. В число существующих способов лечения входят хирургия, лучевая терапия, химиотерапия, терапия биологическими препаратами, иммунотерапия, гормональная терапия, трансплантация стволовых клеток и прецизионная медицина. Несмотря на обширные исследования в этих областях, до сих пор не найдено высокоэффективное приводящее к излечению решение, особенно для наиболее агрессивных видов рака. Кроме того, многие из существующих способов лечения рака характеризуются значительными нежелательными побочными эффектами.

**[0005]** Средства иммунотерапии рака являются необходимыми ввиду того, что они высокоспецифичны и могут способствовать разрушению раковых клеток с задействованием собственной иммунной системы пациента. Слитые белки, такие как привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы, представляют собой описанные в литературе средства иммунотерапии рака, которые связываются с опухолевыми клетками и Т-клетками для облегчения разрушения опухолевых клеток. В литературе описаны антитела, которые связываются с некоторыми опухолеассоциированными антигенами. См., например, WO 2016/134371 и WO 2015/095412.

**[0006]** Естественные киллерные клетки (NK) являются компонентом врожденной иммунной системы и составляют примерно 15% циркулирующих лимфоцитов. NK-клетки

инфильтрируют почти все ткани и изначально характеризовались своей способностью эффективно уничтожать опухолевые клетки без необходимости предварительной сенсибилизации. Активированные NK-клетки уничтожают клетки-мишени с помощью средств, сходных с теми, которые используются цитотоксическими Т-клетками, т. е. посредством цитолитических гранул, содержащих перфорин и гранзимы, а также посредством сигнальных путей рецептора гибели клеток. Активированные NK-клетки также секретируют воспалительные цитокины, такие как IFN-γ и хемокины, которые способствуют рекрутированию других лейкоцитов в ткань-мишень.

**[0007]** NK-клетки отвечают на сигналы посредством ряда различных активирующих и ингибирующих рецепторов на их поверхности. Например, в случае если NK-клетки сталкиваются со здоровыми аутологичными клетками, их активность подавляется за счет активации иммуноглобулиноподобных рецепторов киллерных клеток (KIR). В качестве альтернативы, в случае если NK-клетки сталкиваются с чужеродными клетками или раковыми клетками, они активируются посредством своих активирующих рецепторов (например, NKG2D, NCR, DNAM1). NK-клетки также активируются константной областью некоторых иммуноглобулинов посредством рецепторов CD16 на их поверхности. Общая чувствительность NK-клеток по отношению к активации зависит от суммы стимулирующих и ингибирующих сигналов. NKG2D представляет собой трансмембранный белок II типа, который экспрессируется по существу всеми естественными киллерными клетками, 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 применимой в различных терапевтических контекстах, включая злокачественное образование.

**[0008]** Член А семейства 12 лектиновых доменов С-типа (CLEC12A), также известный как молекула-1, подобная лектину С-типа (CLL-1), или миелоидный ингибирующий рецептор, подобный лектину С-типа (MICL), является представителем суперсемейства лектинов С-типа/доменов, подобных лектину С-типа (CTL/CTLD). Члены данного семейства имеют общую укладку белков и выполняют разнообразные функции, такие как адгезия клеток, межклеточная передача сигналов, гликопротеиновый обмен и роли в воспалении и иммунном ответе. CLEC12A, трансмембранный гликопротеин II типа, сверхэкспрессируется у более чем 90% пациентов с острым миелоидным лейкозом на лейкозных стволовых клетках, но не на нормальных гемопоэтических клетках.

**[0009]** Несмотря на многочисленные усилия, предпринятые несколькими биотехнологическими и фармацевтическими компаниями, разработка специфических

биологических препаратов, нацеленных на CLEC12A, затруднена ввиду отсутствия антител с хорошими характеристиками реализуемости. Трудности с обнаружением антител к CLEC12A могут быть связаны со сложностью антигена. CLEC12A представляет собой мономерный в высокой степени гликозилированный белок с шестью потенциальными сайтами N-гликозилирования в пределах внеклеточного домена, содержащего 201 аминокислоту. Четыре из шести сайтов N-гликозилирования сгруппированы в проксимальном мембранном домене молекулы и, вероятно, участвуют в презентации мишени на клеточной поверхности. Сообщалось о вариациях статуса гликозилирования CLEC12A на поверхности различных типов клеток (Marshall *et al.*, (2006) *Eur J Immunol.* 36(8):2159-69).

**[0010]** Следовательно, в данной области техники сохраняется потребность в новых и применимых белках, которые связывают CLEC12A, для применения в лечении рака.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0011]** В настоящей заявке предусмотрены мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных киллерных клетках, а также с CLEC12A. Такие белки могут активировать более чем один вид NK-активирующего рецептора и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В определенных вариантах осуществления белки могут оказывать агонистическое действие на NK-клетки у людей. В некоторых вариантах осуществления белки могут оказывать агонистическое действие на NK-клетки у людей и у других видов, таких как грызуны и яванские макаки. Также предусмотрены составы, содержащие любой из белков, раскрытых в данном документе; клетки, содержащие одну или несколько нуклеиновых кислот, обеспечивающих экспрессию белков, и способы усиления гибели опухолевых клеток с использованием белков.

**[0012]** Соответственно, в одном аспекте в настоящей заявке предусмотрен белок, содержащий

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16;

где второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, 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 под SEQ ID NO: 137, 272 и 273 соответственно; и

вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно;

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно;

(iii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 251, 196 и 246 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно;

(v) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 221, 166 и 223 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 240, 226 и 179 соответственно;

(v) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 206, 166 и 241 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 245, 239 и 179 соответственно;

(vi) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 221, 236 и 223 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 152, 226 и 179 соответственно;

(vii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 159, 170 и 183 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 186, 188 и 189 соответственно;

(viii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 197, 202 и 207 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 211, 212 и 214 соответственно;

(ix) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 220, 222 и 257 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 224, 225 и 227 соответственно; или

(x) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные

последовательности под SEQ ID NO: 230, 231 и 232 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 233, 234 и 235 соответственно.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 272 и 273 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно.

**[0014]** В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:335, и VL содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:336. В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:270, и VL содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:271. В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:178, и VL содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:289. В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:335, и VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:336. В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:270, и VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:271. В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:178, и VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:289. В определенных вариантах осуществления VH и VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 143 и 144; 147 и 144; 244 и 144; 178 и 144; 256 и 144; 143 и 163; 143 и 167; 143 и 171 или 174 и 175 соответственно.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), и при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 274, 145, 146,

149, 150, 153, 154, 156, 157, 160, 161, 164, 165, 168, 169, 172, 173, 176, 177, 180 и 181. В определенных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:274. В определенных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:180.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 251, 196 и 246 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно.

**[0017]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, содержит

(i) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 195, 196, 187 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199, 201 соответственно;

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 187 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно; или

(iii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 213 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно.

**[0018]** В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:148, и VL содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:203.

**[0019]** В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:148, и VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:203. В определенных вариантах осуществления VH и VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 162 и 203; 210 и 203; 162 и 218; 148 и 218 или 210 и 218 соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, и при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 184, 185, 204, 205, 208,

209, 215, 216, 252, 253, 254 и 255. В определенных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:204.

**[0020]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок из предыдущего варианта осуществления связывает CLEC12A независимым от гликозилирования образом.

**[0021]** В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрен белок, содержащий

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16;

где второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A независимым от гликозилирования образом.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A человека с константой диссоциации ($K_D$), равной 20 нМ или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A человека с $K_D$, равной 1 нМ или меньше, как измерено посредством SPR. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A человека, содержащий замену K244Q.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, белок содержит Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16.

**[0024]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой Fab-фрагмент, и второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, представляет собой scFv.

**[0025]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, и второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, представляет собой Fab-фрагмент.

**[0026]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, белок дополнительно содержит дополнительный антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, а каждый из второго и дополнительного антигенсвязывающих участков, которые связывают

CLEC12A, представляет собой Fab-фрагмент. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, а каждый из второго и дополнительного антигенсвязывающих участков, которые связывают CLEC12A, представляет собой scFv. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности второго и дополнительного антигенсвязывающих участков являются идентичными. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности второго и дополнительного антигенсвязывающих участков различаются.

**[0027]** В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрен белок, содержащий

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16;

где первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой Fab-фрагмент, и второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, представляет собой scFv.

**[0028]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, scFv, который связывает NKG2D, связан с константным доменом антитела или его частью, достаточными для связывания CD16, посредством шарнирного участка, содержащего Ala-Ser или Gly-Ser. В определенных вариантах осуществления шарнирный участок дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly.

**[0029]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, каждый scFv, который связывает CLEC12A, связан с константным доменом антитела или его частью, достаточными для связывания CD16, посредством шарнирного участка, содержащего Ala-Ser или Gly-Ser. В определенных вариантах осуществления шарнирный участок дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly.

**[0030]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, в scFv, который связывает NKG2D, вариабельный домен тяжелой цепи scFv образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи scFv. В определенных вариантах осуществления дисульфидный мостик образован между C44 вариабельного домена тяжелой цепи и C100 вариабельного домена легкой цепи, пронумерованными по системе нумерации согласно Kabat.

**[0031]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, в каждом scFv, который связывает CLEC12A, вариабельный домен тяжелой цепи scFv образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи scFv. В

определенных вариантах осуществления дисульфидный мостик образован между C44 вариабельного домена тяжелой цепи и C100 вариабельного домена легкой цепи, пронумерованными по системе нумерации согласно Kabat.

**[0032]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, в scFv, который связывает NKG2D, вариабельный домен тяжелой цепи связан с вариабельным доменом легкой цепи посредством гибкого линкера. В определенных вариантах осуществления гибкий линкер содержит $(G_4S)_4$.

**[0033]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, в каждом scFv, который связывает CLEC12A, вариабельный домен тяжелой цепи связан с вариабельным доменом легкой цепи посредством гибкого линкера. В определенных вариантах осуществления гибкий линкер содержит $(G_4S)_4$.

**[0034]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, в scFv, который связывает NKG2D, вариабельный домен тяжелой цепи расположен на C-конце вариабельного домена легкой цепи.

**[0035]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, в каждом scFv, который связывает CLEC12A, вариабельный домен тяжелой цепи расположен на C-конце вариабельного домена легкой цепи.

**[0036]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, в scFv, который связывает NKG2D, вариабельный домен тяжелой цепи расположен на N-конце вариабельного домена легкой цепи.

**[0037]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, в каждом scFv, который связывает CLEC12A, вариабельный домен тяжелой цепи расположен на N-конце вариабельного домена легкой цепи.

**[0038]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, Fab-фрагмент, который связывает NKG2D, не расположен между антигенсвязывающим участком и Fc или его частью.

**[0039]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, Fab-фрагмент, который связывает CLEC12A, не расположен между антигенсвязывающим участком и Fc или его частью.

**[0040]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 81, 82 и 112 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит

(i) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 81, 82 и 97 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно; или

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 81, 82 и 84 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

**[0041]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, VH первого антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:95, и VL первого антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:85. В определенных вариантах осуществления VH первого антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:95, и VL первого антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:85.

**[0042]** В некоторых вариантах осуществления белка, раскрытого в данном документе, Fc-домен антитела представляет собой Fc-домен человеческого антитела изотипа IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела или его часть содержат аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:118. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна полипептидная цепь Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с SEQ ID NO:118 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 EU. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна полипептидная цепь Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с SEQ ID NO:118, 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 EU. В определенных вариантах осуществления одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с SEQ ID NO:118 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 по сравнению с 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 EU. В определенных вариантах осуществления одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены K360E и K409W по сравнению с SEQ ID NO:118; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены Q347R, D399V и F405T по сравнению с SEQ ID NO:136, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену Y349C по сравнению с SEQ ID NO:118; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену S354C по сравнению с SEQ ID NO:136, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

**[0043]** В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрен белок, содержащий

(a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:259;

(b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:260; и

(c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:261.

**[0044]** В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрен белок, содержащий

(a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:276;

(b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:260; и

(c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:261.

**[0045]** В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая белок, раскрытый в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

**[0046]** В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрен фармацевтический состав, содержащий белок, раскрытый в данном документе, и буфер с pH 7,0 или выше. В некоторых вариантах осуществления pH состава составляет от 7,0 до 8,0. В некоторых вариантах осуществления буфер предусматривает цитрат. В определенных вариантах осуществления концентрация цитрата составляет 10-20 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер дополнительно содержит фосфат. В некоторых вариантах осуществления буфер дополнительно содержит сахар или сахарный спирт. В определенных вариантах осуществления сахар или сахарный спирт представлены дисахаридом. В определенных вариантах осуществления дисахарид представляет собой сахарозу. В некоторых вариантах осуществления концентрация сахара или сахарного спирта в фармацевтическом составе составляет 200-300 мМ. В определенных вариантах осуществления концентрация сахара или сахарного спирта в фармацевтическом составе составляет приблизительно 250 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер дополнительно содержит неионогенное поверхностно-активное вещество. В определенных вариантах осуществления неионогенное поверхностно-активное вещество предусматривает полисорбат. В определенных вариантах осуществления полисорбат представляет собой полисорбат 80. В некоторых вариантах осуществления концентрация полисорбата 80 в фармацевтическом составе составляет от 0,005% до 0,05%. В определенных вариантах осуществления концентрация полисорбата 80 в фармацевтическом составе составляет приблизительно 0,01%. В некоторых вариантах осуществления концентрация NaCl, если таковой присутствует, в фармацевтическом составе составляет приблизительно 1 мМ или ниже. В некоторых вариантах осуществления концентрация белка составляет 10-200 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация белка составляет приблизительно 20 мг/мл.

**[0047]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержит приблизительно 20 мМ цитрата, приблизительно 250 мМ сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80 при pH 7,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит белок в концентрации приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 20 мМ фосфата калия, приблизительно 10 мМ цитрата натрия и приблизительно 125 мМ хлорида натрия при pH 7,8.

**[0048]** В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрена клетка, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих белок, раскрытый в данном документе.

**[0049]** В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрен способ усиления гибели опухолевых клеток, при этом способ включает подвергание опухолевой клетки и естественной киллерной клетки воздействию эффективного количества белка,

фармацевтической композиции или фармацевтического состава, раскрытых в данном документе.

**[0050]** В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрен способ лечения рака, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества белка, фармацевтической композиции или фармацевтического состава, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В определенных вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластического синдрома (MDS), острого лимфобластного лейкоза (ALL), миелопролиферативных новообразований (MPN), лимфомы, видов неходжкинской лимфомы и классической лимфомы Ходжкина.

**[0051]** В некоторых вариантах осуществления AML выбран из недифференцированного острого миелобластного лейкоза, острого миелобластного лейкоза с минимальным созреванием, острого миелобластного лейкоза с созреванием, острого промиелоцитарного лейкоза (APL), острого миеломоноцитарного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза с эозинофилией, острого моноцитарного лейкоза, острого эритроидного лейкоза, острого мегакариобластного лейкоза (AMKL), острого базофильного лейкоза, острого панмиелоза с фиброзом и новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (BPDCN). В определенных вариантах осуществления AML характеризуется экспрессией CLL-1 на лейкозных стволовых клетках (LSC) AML. В определенных вариантах осуществления LSC дополнительно экспрессируют мембранный маркер, выбранный из CD34, CD38, CD123, TIM3, CD25, CD32 и CD96.

**[0052]** В некоторых вариантах осуществления AML представлен минимальной остаточной болезнью (MRD). В определенных вариантах осуществления MRD характеризуется наличием или отсутствием мутации, выбранной из мутации *FLT3-ITD* (внутренних тандемных дупликаций (ITD) в гене (Fms-подобной тирозинкиназы 3)), *NPM1* (нуклеофосмина 1), *DNMT3A* (гена ДНК-метилтрансферазы *DNMT3A)* и *IDH* (изоцитратдегидрогеназы 1 и 2 (IDH1 и IDH2)).

**[0053]** В определенных вариантах осуществления MDS выбран из MDS с мультилинейной дисплазией (MDS-MLD), MDS с однолинейной дисплазией (MDS-SLD), MDS с кольцевыми сидеробластами (MDS-RS), MDS с избытком бластов (MDS-EB), MDS с изолированной del(5q) и неклассифицированного MDS (MDS-U). В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой первичный MDS или вторичный MDS.

**[0054]** В некоторых вариантах осуществления ALL выбран из В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ALL) и Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (T-ALL). В некоторых вариантах осуществления MPN выбрано из истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии (ET) и миелофиброза. В некоторых вариантах осуществления неходжкинская лимфома выбрана из В-клеточной лимфомы и Т-клеточной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления лимфома выбрана из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), лимфобластной лимфомы (LPL), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Беркитта (BL), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (PMBL), фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, волосатоклеточного лейкоза, плазмоклеточной миеломы (PCM) или множественной миеломы (MM), новообразований из зрелых Т-/NK-клеток и гистиоцитарных новообразований. В определенных вариантах осуществления рак характеризуется экспрессией CLEC12A.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0055]** На **фиг. 1** представлено гетеродимерное мультиспецифическое антитело, например триспецифический связывающий белок (TriNKET). Каждое плечо может представлять собой либо NKG2D-связывающий домен, либо связывающий домен, соответствующий опухолеассоциированному антигену. В некоторых вариантах осуществления связывающий NKG2D домен и связывающие опухолеассоциированный антиген домены могут иметь общую легкую цепь.

**[0056]** **На фиг. 2A-2E** проиллюстрированы пять иллюстративных форматов мультиспецифического связывающего белка, например триспецифического связывающего белка (TriNKET). Как показано на **фиг. 2A**, либо NKG2D-связывающий домен, либо связывающий опухолеассоциированный антиген домен могут принимать формат scFv (левое плечо). Антитело, которое содержит scFv, нацеливающийся на NKG2D, Fab-фрагмент, нацеливающийся на опухолеассоциированный антиген, и константную область гетеродимеризованного антитела, обозначается в данном документе как F3-TriNKET. Антитело, которое содержит scFv, нацеливающийся на опухолеассоциированный антиген, Fab-фрагмент, нацеливающийся на NKG2D, и константную область/домен гетеродимеризованного антитела, которые связывают CD16, обозначается в данном документе как F3'-TriNKET (**фиг. 2E**). Как показано на **фиг. 2B**, как NKG2D-связывающий домен, так и связывающий опухолеассоциированный антиген домен могут принимать формат scFv. **На фиг. 2C-2D** показаны иллюстративные представления антитела с тремя антигенсвязывающими участками, включая два антигенсвязывающих участка, которые связывают опухолеассоциированный антиген, и NKG2D-связывающий

участок, слитый с константной областью гетеродимеризованного антитела. Эти форматы антител обозначаются в данном документе как F4-TriNKET. На **фиг. 2C** проиллюстрировано, что два связывающих опухолеассоциированный антиген участка представлены в формате Fab-фрагмента, а NKG2D-связывающий участок представлен в формате scFv. На **фиг. 2D** проиллюстрировано, что связывающие опухолеассоциированный антиген участки представлены в формате scFv, а NKG2D-связывающий участок представлен в формате scFv. На **фиг. 2E** представлено триспецифическое антитело (TriNKET), которое содержит scFv, нацеливающийся на опухоль, Fab-фрагмент, нацеливающийся на NKG2D, и константную область/домен гетеродимеризованного антитела ("CD-домен"), которые связывают CD16. Формат антитела обозначается в данном документе как F3'-TriNKET. В определенных иллюстративных мультиспецифических связывающих белках мутации, способствующие гетеродимеризации, в константной области антитела включают K360E и K409W в одном константном домене и Q347R, D399V и F405T в противоположном константном домене (показаны в виде треугольной формы "ключ и замок" в CD-доменах). Выделенная жирным полоса между вариабельными доменами тяжелой и легкой цепей Fab-фрагментов представляет дисульфидную связь.

**[0057]** На **фиг. 3** представлено TriNKET в конфигурации Triomab, которое представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, сохраняющее IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух половинных антител, каждое из которых характеризуется одной легкой и одной тяжелой цепями, которые происходят от двух родительских антител. Конфигурация Triomab может представлять собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 1/2 крысиного антитела и 1/2 мышиного антитела.

**[0058]** На **фиг. 4** представлено TriNKET в конфигурации общей легкой цепи KiH, в котором применяется технология "выступы во впадины" (KIH). KiH представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab-фрагмента, связывающиеся с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями, способствующими гетеродимеризации. TriNKET в формате KiH может представлять собой гетеродимерную конструкцию с 2 Fab-фрагментами, связывающимися с мишенью 1 и мишенью 2, содержащую две разные тяжелые цепи и общую легкую цепь, которая образует пару с обеими тяжелыми цепями.

**[0059]** На **фиг. 5** представлено TriNKET в конфигурации иммуноглобулина с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig™), в котором объединены мишень-связывающие домены двух моноклональных антител посредством встречающихся в природе гибких линкеров, и за счет этого обеспечивается получение четырехвалентной IgG-подобной молекулы. DVD-Ig™ представляет собой гомодимерную конструкцию, в которой

вариабельный домен, нацеливающийся на антиген 2, слит с N-концом вариабельного домена Fab-фрагмента, нацеленного на антиген 1. Конфигурация DVD-Ig™ содержит нормальный Fc.

**[0060]** На **фиг. 6** представлено TriNKET в конфигурации Fab-фрагментов с ортогональной областью контакта (орто-Fab), которое представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 2 Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Спаривание легкой цепи (LC) и тяжелой цепи (HC) обеспечивается ортогональной областью контакта. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

**[0061]** На **фиг. 7** представлено TriNKET в формате Ig 2-в-1.

**[0062]** На **фиг. 8** представлено TriNKET в конфигурации ES, которое представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два разных Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями, обеспечивающими электростатическое координирование, в Fc.

**[0063]** На **фиг. 9** представлено TriNKET в конфигурации Fab, предусматривающего обмен плечами: антитела, которые обмениваются плечами Fab-фрагмента путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (полумолекулы) парой, представленной тяжелой-легкой цепями из другой молекулы, что приводит в результате к получению биспецифических антител. Конфигурация Fab, предусматривающего обмен плечами (cFae), представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab-фрагмента, связывающиеся с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями, способствующими гетеродимеризации.

**[0064]** На **фиг. 10** представлено TriNKET в конфигурации SEED-тела, которое представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab-фрагмента, связывающихся с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями, способствующими гетеродимеризации.

**[0065]** На **фиг. 11** представлено TriNKET в конфигурации LuZ-Y, в котором лейциновая застежка используется для индукции гетеродимеризации двух разных HC. Конфигурация LuZ-Y представляет собой гетеродимер, содержащий два разных scFab, связывающихся с мишенями 1 и 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается за счет мотивов лейциновой застежки, слитых с С-концом Fc.

**[0066]** На **фиг. 12** представлено TriNKET в конфигурации Cov-X-тела.

**[0067]** **На фиг. 13A-13B** представлены TriNKET в конфигурациях κλ-тела, которые представляют собой гетеродимерные конструкции с двумя разными Fab-фрагментами,

слитыми с Fc, стабилизированным мутациями, способствующими гетеродимеризации: один Fab-фрагмент, нацеливающийся на антиген 1, содержит каппа-LC, и второй Fab-фрагмент, нацеливающийся на антиген 2, содержит лямбда-LC. На **фиг. 13A** приведено иллюстративное представление одной конфигурации κλ-тела; на **фиг. 13B** приведено иллюстративное представление другого κλ-тела.

**[0068]** На **фиг. 14** представлена гетеродимерная конструкция Oasc-Fab, которая содержит Fab-фрагмент, связывающийся с мишенью 1, и scFab, связывающийся с мишенью 2, оба из которых слиты с доменом Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc-домене.

**[0069]** На **фиг. 15** представлено DuetMab, которое представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два разных Fab-фрагмента, связывающихся с антигенами 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями, способствующими гетеродимеризации. Fab-фрагменты 1 и 2 содержат дифференциальные мостики S-S, которые обеспечивают корректное спаривание легкой цепи и тяжелой цепи.

**[0070]** На **фиг. 16** представлено CrossmAb, представляющее собой гетеродимерную конструкцию с двумя разными Fab-фрагментами, связывающимися с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированным мутациями, способствующими гетеродимеризации. Домены CL и CH1 и домены VH и VL подвергнуты обмену местами, например, CH1 слит на оси с VL, а CL слит на одной оси с VH.

**[0071]** На **фиг. 17** представлено Fit-Ig, представляющее 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.

**[0072]** На **фиг. 18** представлена совокупность кривых, демонстрирующих профили биослойной интерферометрии (BLI) для антител, собранных из супернатантов мышиных гибридом, связывающихся с hCLEC12A.

**[0073]** На **фиг. 19** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для антител, отобранных из субклонов мышиных mAb, связывающихся с hCLEC12A (**фиг. 19A**) и cCLEC12A (**фиг. 19B**).

**[0074]** На **фиг. 20** представлен линейный график, демонстрирующий связывание очищенных субклонов CLEC12A с линией клеток AML PL21.

**[0075]** На **фиг. 21** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для антител 16B8.C8 и 9F11.B7, связывающихся с гликозилированным, дегликозилированным и десиалилированным hCLEC12A.

**[0076]** На **фиг. 22** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для TriNKET, полученных из антитела 16B8.C8.

**[0077]** На **фиг. 23** представлены линейные графики, демонстрирующие связывание hCLEC12A-нацеливающихся TriNKET F3'-1304, F3'-1295 и контрольного CLEC12A-TriNKET с hCLEC12A-экспрессирующей линией клеток RMA-hCLEC12A.

**[0078]** На **фиг. 24** представлены линейные графики, демонстрирующие опосредованный NK-клетками лизис CLEC12A-экспрессирующей линии раковых клеток HL60 в присутствии F3'-1295 и контрольного CLEC12A-TriNKET.

**[0079]** На **фиг. 25** представлены линейные графики, демонстрирующие анализ с использованием дифференциальной сканирующей колориметрии (DSC) TriNKET F3'-1295 и F3'-1602.

**[0080]** На **фиг. 26** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для TriNKET F3'-1295 и F3'-1602.

**[0081]** На **фиг. 27** представлены линейные графики, демонстрирующие связывание hCLEC12A-нацеливающихся TriNKET F3'-1295, F3'-1602 и контрольного CLEC12A-TriNKET с hCLEC12A-экспрессирующей линией клеток Ba/F3 (**фиг. 27A**), Ba/F3 дикого типа (**фиг. 27B**), линией раковых клеток HL60 (**фиг. 27C**) и линией раковых клеток PL21 (**фиг. 27D**).

**[0082]** На **фиг. 28** представлены линейные графики, демонстрирующие опосредованный NK-клетками лизис CLEC12A-экспрессирующих линий раковых клеток PL21 (**фиг. 28A**) и HL60 (**фиг. 28B**) в присутствии F3'-1295, F3'-1602 и контрольного CLEC12A-TriNKET.

**[0083]** На **фиг. 29** представлены линейные графики, демонстрирующие изоэлектрическую точку (pI), определенную посредством капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF), для F3'-1295 (**фиг. 29A**) и F3'-1602 (**фиг. 29B**).

**[0084]** На **фиг. 30** показаны результаты анализа на основе проточной цитометрии с использованием полиспецифического реагента (PSR) для TriNKET F3'-1602 и TriNKET F3'-1295.

**[0085]** На **фиг. 31** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для TriNKET hF3'-1602 и F3-TriNKET AB0010.

**[0086]** На **фиг. 32** представлены линейные графики, демонстрирующие связывание TriNKET hF3'-1602 и F3-TriNKET AB0010 с Ba/F3, экспрессирующей hCLEC12A (**фиг. 32A**), линией раковых клеток HL60 (**фиг. 32B**) и Ba/F3 дикого типа (**фиг. 32C**).

**[0087]** На **фиг. 33** представлены линейные графики, демонстрирующие опосредованный NK-клетками лизис CLEC12A-экспрессирующей линии раковых клеток

PL21 с использованием клеток KHYG-CD16V (**фиг. 33A**) и первичных NK-клеток (**фиг. 33B**) в присутствии TriNKET hF3'-1602 и F3-TriNKET AB0010.

**[0088]** На **фиг. 34** представлены линейные графики, демонстрирующие связывание TriNKET, полученных из 9F11.B7, а также TriNKET hF3'-1602 и F3-TriNKET AB0010 с Ba/F3, экспрессирующей hCLEC12A (**фиг. 34A**), и линией раковых клеток HL60 (**фиг. 34B**).

**[0089]** На **фиг. 35** представлены линейные графики, демонстрирующие опосредованный NK-клетками лизис CLEC12A-экспрессирующей линии раковых клеток HL60 в присутствии TriNKET, полученных из 9F11.B7.

**[0090]** На **фиг. 36** представлены линейные графики, демонстрирующие опосредованный NK-клетками лизис CLEC12A-экспрессирующей линии раковых клеток HL60 с использованием клеток KHYG-CD16V (**фиг. 36A**) и первичных NK-клеток (**фиг. 36B**) в присутствии TriNKET hF3'-1602 и AB0192.

**[0091]** На **фиг. 37** представлены линейные графики, демонстрирующие опосредованный NK-клетками лизис CLEC12A-экспрессирующих линии раковых клеток PL21 (**фиг. 37A**) и THP-1 (**фиг. 37B**) в присутствии TriNKET hF3'-1602 и родительского mAb.

**[0092]** На **фиг. 38** представлены линейные графики, демонстрирующие связывание TriNKET hF3'-1602 с линиями раковых клеток HL60 (**фиг. 38A**) и PL21 (**фиг. 38B**).

**[0093]** На **фиг. 39** представлены линейные графики, демонстрирующие связывание CLEC12A-нацеливающихся TriNKET, родительских mAb и варианта TriNKET AB0237 NKG2D с "мертвым" плечом с Ba/F3, экспрессирующей hCLEC12A (**фиг. 39A**), и линиями раковых клеток HL60 (**фиг. 39B**) и PL21 (**фиг. 39C**).

**[0094]** На **фиг. 40** представлены столбчатые диаграммы, демонстрирующие удерживание на поверхности CLEC12A-нацеливающихся TriNKET и родительских mAb в линиях клеток PL21 (**фиг. 40A**) и HL60 (**фиг. 40B**).

**[0095]** На **фиг. 41** представлены линейные графики, демонстрирующие опосредованный NK-клетками лизис CLEC12A-экспрессирующих линии раковых клеток PL21 (**фиг. 41A**) и HL60 (**фиг. 41B**) в присутствии TriNKET hF3'-1602, AB0192 и родительских mAb.

**[0096]** На **фиг. 42** представлены линейные графики, демонстрирующие опосредованный NK-клетками лизис CLEC12A-экспрессирующих линий раковых клеток PL21 (**фиг. 42A**) и HL60 (**фиг. 42B**) в присутствии TriNKET hF3'-1602.

**[0097]** На **фиг. 43** представлены линейные графики, демонстрирующие опосредованный CD8-T-клетками лизис CLEC12A-экспрессирующей линии раковых

клеток PL21 в присутствии TriNKET hF3'-1602, родительского mAb или его NKG2D-"мертвого" варианта.

**[0098]** На **фиг. 44** представлена совокупность гистограмм, демонстрирующих связывание TriNKET hF3'-1602 (выделено серым), родительского mAb (выделено белым) и контрольного IgG (выделено черным) с клетками крови.

**[0099]** На **фиг. 45** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для связывания TriNKET hF3'-1602 и представленного трастузумабом контроля с рекомбинантным человеческим CD64.

**[0100]** На **фиг. 46** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для связывания TriNKET hF3'-1602 и представленного трастузумабом контроля с H131 CD32a.

**[0101]** На **фиг. 47** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для связывания TriNKET hF3'-1602 и представленного трастузумабом контроля с аллелем R131 человеческого CD32a (R131 FcγRIIa).

**[0102]** На **фиг. 48** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для связывания TriNKET hF3'-1602 и представленного трастузумабом контроля с высокоаффинным аллелем V158 человеческого CD16a (V158 FcγRIIIa).

**[0103]** На **фиг. 49** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для связывания TriNKET hF3'-1602 и представленного трастузумабом контроля с низкоаффинным аллелем F158 человеческого CD16a (F158 FcγRIIIa).

**[0104]** На **фиг. 50** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для связывания TriNKET hF3'-1602 и представленного трастузумабом контроля с человеческим CD32b (FcγRIIb).

**[0105]** На **фиг. 51** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для связывания TriNKET hF3'-1602 и представленного трастузумабом контроля с человеческим CD16b (FcγRIIIb).

**[0106]** На **фиг. 52** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для связывания TriNKET hF3'-1602 и представленного трастузумабом контроля с CD16 яванского макака (макака-крабоеда).

**[0107]** На **фиг. 53** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для связывания TriNKET hF3'-1602 и представленного трастузумабом контроля с человеческим FcRn, как измерено при pH 6,0.

**[0108]** На **фиг. 54** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили для связывания TriNKET hF3'-1602 и представленного трастузумабом контроля с FcRn яванского макака, как измерено при pH 6,0.

**[0109]** На **фиг. 55** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили связывания TriNKET hF3'-1602 с CLEC12A человека.

**[0110]** На **фиг. 56** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили связывания TriNKET hF3'-1602 с NKG2D человека.

**[0111]** На **фиг. 57** представлена совокупность сенсограмм, демонстрирующих SPR-профили связывания TriNKET hF3'-1602 с внеклеточным доменом (ECD) рекомбинантного NKG2D (cNKG2D) яванского макака (ECD).

**[0112]** На **фиг. 58** представлены линейные графики, демонстрирующие связывание мишени, как определено посредством SPR, применительно к занятости одного плеча TriNKET при связывании другого плеча TriNKET.

**[0113]** На **фиг. 59** представлены линейные графики, демонстрирующие связывание мишени, как определено посредством SPR, применительно к синергизму плеча TriNKET NKG2D и CD16a.

**[0114]** На **фиг. 60** представлены линейные графики, демонстрирующие связывание hCLEC12A-специфичных TriNKET F3'-1295, F3'-1602 и контрольного CLEC12A-TriNKET с hCLEC12A-экспрессирующей линией клеток Ba/F3 (**фиг. 60A**), Ba/F3 дикого типа (**фиг. 60B**), линией раковых клеток HL60 (**фиг. 60C**) и линией раковых клеток PL21 (**фиг. 60D**).

**[0115]** На **фиг. 61** показаны результаты анализа на основе проточной цитометрии с использованием полиспецифического реагента (PSR) для TriNKET F3'-1602.

**[0116]** На **фиг. 62** представлены столбчатые диаграммы, демонстрирующие относительное связывание (Z-показатель) TriNKET F3'-1602 при равном 1 значении с CLEC12A человека по сравнению с микрочипом полного протеома человека.

**[0117]** На **фиг. 63** показаны модели зон гидрофобности в CLEC12A-связывающем плече TriNKET hF3'-1602.

**[0118]** На **фиг. 64** представлены столбчатые диаграммы, полученные на основе моделей длины CDR, поверхностной гидрофобности и поверхностного заряда в CLEC12A-связывающем плече TriNKET hF3'-1602.

**[0119]** На **фиг. 65** показаны модели зон гидрофобности в NKG2D-связывающем плече TriNKET hF3'-1602.

**[0120]** На **фиг. 66** представлены столбчатые диаграммы, полученные на основе моделей длины CDR, поверхностной гидрофобности и поверхностного заряда в NKG2D-связывающем плече TriNKET hF3'-1602.

**[0121]** На **фиг. 67** представлен линейный график, демонстрирующий результаты анализа посредством хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC) для TriNKET hF3'-1602.

**[0122]** На **фиг. 68** представлен линейный график, демонстрирующий pI, как определено посредством cIEF, для TriNKET hF3'-1602.

**[0123]** На **фиг. 69** представлена совокупность графиков результатов проточной цитометрии, демонстрирующих связывание с hCLEC12A вариантов hF3'-1602 с устраненными потенциальными участками неблагоприятных модификаций в последовательности.

**[0124]** На **фиг. 70** представлены линейные графики, демонстрирующие опосредованный NK-клетками лизис CLEC12A-экспрессирующей линии раковых клеток PL21 в присутствии TriNKET hF3'-1602 и вариантов с устраненными потенциальными участками неблагоприятных модификаций в последовательности.

**[0125]** На **фиг. 71** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание hCLEC12A при трехкратном серийном разбавлении (от 300 нМ до 0,41 нМ) с F3'-1602 в составе HST. Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных.

**[0126]** На **фиг. 72** представлена совокупность графиков, демонстрирующих связывание F3'-1602 в составе HST с hNKG2D. На верхних панелях приведены цветные сенсограммы, представляющие исходные данные для F3'-1602, вводимого поверх захваченного mFc-hNKG2D (от 9,77 нМ до 5 мкМ). Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных. На нижних панелях представлены измерения ответа в стационарном состоянии, нанесенные на график в зависимости от соответствующих концентраций аналита. Синие линии представляют значение $K_D$ в стационарном состоянии.

**[0127]** На **фиг. 73** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание F3'-1602 в составе HST с V158 hCD16a.

**[0128]** На **фиг. 74** представлен график, демонстрирующий процент лизиса клеток PL21 NKG2D- и CD16a-экспрессирующими клетками KHYG-1-CD16a в присутствии подвергнутых стрессовому условию и контрольных образцов F3'-1602 в составе HST.

**[0129]** На **фиг. 75** представлена совокупность экстракционных ионных хроматограмм для пептида CDRH3 в контрольном и подвергнутом стрессовому условию F3'-1602.

**[0130]** На **фиг. 76** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание hCLEC12A с F3'-1602 в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl. Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных.

**[0131]** На **фиг. 77** представлена совокупность графиков, демонстрирующих связывание F3'-1602 в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl с hNKG2D. На верхних

панелях приведены цветные сенсограммы, представляющие исходные данные для F3'-1602, вводимого поверх захваченного mFc-hNKG2D (от 9,77 нМ до 5 мкМ). Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных. На нижних панелях представлены измерения ответа в стационарном состоянии, нанесенные на график в зависимости от соответствующих концентраций аналита. Синие линии представляют значение $K_D$ в стационарном состоянии.

**[0132]** На **фиг. 78** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание F3'-1602 в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl с V158 hCD16a.

**[0133]** На **фиг. 79** представлен график, демонстрирующий процент лизиса клеток PL21 NKG2D- и CD16a-экспрессирующими клетками KHYG-1-CD16a в присутствии подвергнутых стрессовому условию и контрольных образцов F3'-1602 в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl.

**[0134]** На **фиг. 80** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание hCLEC12A при трехкратном серийном разбавлении (от 300 нМ до 0,41 нМ) с F3'-1602 после инкубации в составе CST при 40°C в течение четырех недель. Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных.

**[0135]** На **фиг. 81** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание hCLEC12A при трехкратном серийном разбавлении (от 300 нМ до 0,41 нМ) с F3'-1602 после инкубации в составе CST при 2-8°C и при 25°C в течение четырех недель. Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных.

**[0136]** На **фиг. 82** представлена совокупность графиков, демонстрирующих связывание F3'-1602 в составе CST с hNKG2D. На верхних панелях приведены цветные сенсограммы, представляющие исходные данные для F3'-1602, вводимого поверх захваченного mFc-hNKG2D (от 9,77 нМ до 5 мкМ). Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных. На нижних панелях представлены измерения ответа в стационарном состоянии, нанесенные на график в зависимости от соответствующих концентраций аналита. Синие линии представляют значение $K_D$ в стационарном состоянии.

**[0137]** На **фиг. 83** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание F3'-1602 в составе CST с V158 hCD16a.

**[0138]** На **фиг. 84** представлен график, демонстрирующий процент лизиса клеток PL21 NKG2D- и CD16a-экспрессирующими клетками KHYG-1-CD16a в присутствии подвергнутых стрессовому условию и контрольных образцов F3'-1602 в составе CST.

**[0139]** На **фиг. 85** представлен профиль cIEF для F3'-1602 после инкубации при стрессовом условии, представляющем собой pH 5,0.

**[0140]** На **фиг. 86** представлен профиль cIEF для F3'-1602 после инкубации при стрессовом условии, представляющем собой pH 8,0.

**[0141]** На **фиг. 87** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание hCLEC12A при трехкратном серийном разбавлении (от 300 нМ до 0,41 нМ) с F3'-1602 после воздействия стрессового условия, представляющего собой pH 5. Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных.

**[0142]** На **фиг. 88** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание hCLEC12A при трехкратном серийном разбавлении (от 300 нМ до 0,41 нМ) с F3'-1602 после воздействия стрессового условия, представляющего собой pH 8. Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных.

**[0143]** На **фиг. 89** представлена совокупность графиков, демонстрирующих связывание F3'-1602 с hNKG2D после воздействия стрессового условия, представляющего собой pH 5. На верхних панелях приведены цветные сенсограммы, представляющие исходные данные для F3'-1602, вводимого поверх захваченного mFc-hNKG2D (от 9,77 нМ до 5 мкМ). Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных. На нижних панелях представлены измерения ответа в стационарном состоянии, нанесенные на график в зависимости от соответствующих концентраций аналита. Синие линии представляют значение $K_D$ в стационарном состоянии.

**[0144]** На **фиг. 90** представлена совокупность графиков, демонстрирующих связывание F3'-1602 с hNKG2D после воздействия стрессового условия, представляющего собой pH 8. На верхних панелях приведены цветные сенсограммы, представляющие исходные данные для F3'-1602, вводимого поверх захваченного mFc-hNKG2D (от 9,77 нМ до 5 мкМ). Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных. На нижних панелях представлены измерения ответа в стационарном состоянии, нанесенные на график в зависимости от соответствующих концентраций аналита. Синие линии представляют значение $K_D$ в стационарном состоянии.

**[0145]** На **фиг. 91** представлен график, демонстрирующий процент лизиса клеток PL21 NKG2D- и CD16a-экспрессирующими клетками KHYG-1-CD16a в присутствии F3'-1602 после воздействия стрессового условия, представляющего собой pH 5.

**[0146]** На **фиг. 92** представлен график, демонстрирующий процент лизиса клеток PL21 NKG2D- и CD16a-экспрессирующими клетками KHYG-1-CD16a в присутствии F3'-1602 после воздействия стрессового условия, представляющего собой pH 8.

**[0147]** На **фиг. 93** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание hCLEC12A с F3'-1602 после воздействия стрессового условия, представляющего собой принудительное окисление. Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных.

**[0148]** На **фиг. 94** представлена совокупность графиков, демонстрирующих связывание F3'-1602 с hNKG2D после воздействия стрессового условия, представляющего собой принудительное окисление. На верхних панелях приведены цветные сенсограммы, представляющие исходные данные для F3'-1602, вводимого поверх захваченного mFc-hNKG2D (от 9,77 нМ до 5 мкМ). Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных. На нижних панелях представлены измерения ответа в стационарном состоянии, нанесенные на график в зависимости от соответствующих концентраций аналита. Синие линии представляют значение $K_D$ в стационарном состоянии.

**[0149]** На **фиг. 95** представлен график, демонстрирующий процент лизиса клеток PL21 NKG2D- и CD16a-экспрессирующими клетками KHYG-1-CD16a в присутствии F3'-1602 после воздействия стрессового условия, представляющего собой принудительное окисление.

**[0150]** На **фиг. 96** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание hCLEC12A с F3'-1602 после выдерживания при низком уровне pH. Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных.

**[0151]** На **фиг. 97** представлена совокупность графиков, демонстрирующих связывание F3'-1602 с hNKG2D после выдерживания при низком уровне pH. На верхних панелях приведены цветные сенсограммы, представляющие исходные данные для F3'-1602, вводимого поверх захваченного mFc-hNKG2D (от 9,77 нМ до 5 мкМ). Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1 для исходных данных. На нижних панелях представлены измерения ответа в стационарном состоянии, нанесенные на график в зависимости от

соответствующих концентраций аналита. Синие линии представляют значение $K_D$ в стационарном состоянии.

**[0152]** На **фиг. 98** представлена совокупность цветных сенсограмм, демонстрирующих связывание F3'-1602 с V158 hCD16a после выдерживания при низком уровне pH.

**[0153]** На **фиг. 99** представлен график, демонстрирующий процент лизиса клеток PL21 NKG2D- и CD16a-экспрессирующими клетками KHYG-1-CD16a в присутствии F3'-1602 после выдерживания при низком уровне pH.

**[0154]** На **фиг. 100** представлен график, демонстрирующий растворимость F3'-1602 в 10 мМ натрий-ацетатном буфере при pH 5,0 в PEG-6000.

**[0155]** На **фиг. 101** представлен график, демонстрирующий процентное содержание мономера F3'-1602 в зависимости от концентрации.

**[0156]** На **фиг. 102** представлены графики, демонстрирующие процент лизиса клеток PL-21 NKG2D- и CD16a-экспрессирующими клетками KHYG-1-CD16a в присутствии TriNKET F3'-1602 в F3'-формате (**фиг. 102A**) и TriNKET AB0010 в F3-формате (**фиг. 102B**) после воздействия условий теплового стресса.

**[0157]** На **фиг. 103** проиллюстрировано создание библиотеки созревания аффинности дрожжевого дисплея. **Фиг. 103A**: замена CDRH3 scFv pET1596 сайтом рестрикции для фермента BamHI. **Фиг. 103B**: вставка мутированных олигонуклеотидов CDRH3 библиотеки в ранее введенный сайт рестрикции для BamHI. **Фиг. 103C**: доставка путем электропорации линеаризованной BamHI плазмиды и олигонуклеотидов библиотеки в дрожжи с последующей гомологичной рекомбинацией в дрожжах.

**[0158]** На **фиг. 104** показана процедура обнаружения, начиная с иммунизации мышей и заканчивая получением AB0089. На верхней панели представлены результаты связывания CLEC12A, полученные посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR). На нижней панели показано связывание с CLEC12A+ раковыми клетками AML PL-21. Указаны значения аффинности связывания и EC50 для каждого варианта. BM, обратная мутация.

**[0159]** На **фиг. 105** показаны результаты анализа FACS для библиотеки дрожжевого дисплея CDRH3 17. Первый цикл отбора, проводимого в отношении библиотеки созревания аффинности дрожжевого дисплея, предусматривал сортировку при 1 нМ CLEC12A-His (**фиг. 105A**). Второй цикл отбора предусматривал сортировку при 1 нМ CLEC12A-His (**фиг. 105B**). Третий цикл отбора предусматривал сортировку при 0,1 нМ CLEC12A-His (**фиг. 105C**). Связывание компонентов библиотеки 17-R3, представленных на дрожжевых клетках, с 1 нМ CLEC12A (**фиг. 105D**). Связывание исходного клона pET1596, представленного на дрожжевых клетках, при 10 нМ CLEC12A (**фиг. 105E**).

**[0160]** На **фиг. 106** показаны результаты анализа FACS для библиотеки дрожжевого дисплея CDRH2 30. Исходная библиотека дрожжевого дисплея, созданная путем рандомизации CDRH2, построена на основе наилучшего клона, идентифицированного в библиотеке 17 (GDYGDSLDY (SEQ ID NO:322) CDRH3) (**фиг. 106A**). Сортировку осуществляли при 1 нМ CLEC12A-His для обоих циклов. Представлены результаты анализа с использованием проточной цитометрии после цикла 1 (**фиг. 106B**) и цикла 2 (**фиг. 106C**) отбора с использованием CLEC12A-His соответственно. Представлено связывание pET1596, представленного на дрожжевых клетках, при 10 нМ CLEC12A-His (**фиг. 106D**).

**[0161]** На **фиг. 107** представлено сравнение клона с улучшенной аффинностью (**фиг. 107A**), идентифицированного в библиотеке 30, с pET1596 (**фиг. 107B**) и AB0237 (**фиг. 107C**).

**[0162]** На **фиг. 108** показано схематическое представление AB0089. Мутации, способствующие гетеродимеризации, и сконструированный межцепочечный дисульфидный мостик обеспечивают эффективное спаривание цепей Fc IgG1. scFv получен из гуманизированного и откорректированного по потенциальным участкам неблагоприятных модификаций в последовательности mAb к CLEC12A 16B8.C8. scFv стабилизирован посредством сконструированного дисульфидного мостика между VH и VL.

**[0163]** На **фиг. 109** представлена рентгеновская кристаллическая структура гетеродимера Fc EW-RVT. Представлено наложение общей структуры гетеродимера Fc EW-RVT с гомодимером человеческого Fc IgG1 дикого типа (WT) (PDB ID: 3AVE) (**фиг. 109A**). Представлен крупный план областей местонахождения опосредующей взаимодействие пары W-VT (**фиг. 109B**). Представлен крупный план областей местонахождения опосредующей взаимодействие пары E-R (**фиг. 109C**).

**[0164]** На **фиг. 110** показана кристаллическая структура гетеродимерного Fc EW-RVTS–S с крупным планом асимметричной дисульфидной связи, образованной между остатками 349C(CH3A) и 354C(CH3B).

**[0165]** На **фиг. 111** показана представленная в виде ленточной диаграммы модель CLEC12A-связывающего scFv в трех различных ориентациях (верхняя панель) и их соответствующее распределение поверхностного заряда для той же ориентации (нижняя панель). Показаны три ориентации: обе внешние стороны (левая панель: вид спереди; центральная панель: вид сзади) и поверхность, взаимодействующая с антигеном (правая панель: вид сверху).

**[0166]** На **фиг. 112** показаны результаты анализов длины CDR и зон поверхностной гидрофобности CLEC12A-нацеливающегося плеча AB0089. Стрелка указывает на линию, где CLEC12A-нацеливающийся scFv AB0089 расположен относительно mAb, исследуемых на поздней стадии клинического испытания. Две внутренние пунктирные линии указывают на 2 SD (> 95% референтных молекул в пределах данной области). Две крайние снаружи пунктирные линии указывают на 3 SD (> 99,7% референтных молекул в пределах данной области).

**[0167]** На **фиг. 113** показаны результаты анализа зон, содержащих положительные (слева) и отрицательные заряды (посередине), а также симметрия (справа) этих зарядов относительно областей CDR. Представлены результаты анализа поверхностного заряда и симметрии заряда для CLEC12A-нацеливающегося плеча AB0089. Стрелка указывает на линию, где CLEC12A-нацеливающийся scFv AB0089 расположен относительно mAb, исследуемых на поздней стадии клинического испытания. На каждом графике имеются две пунктирные линии – одна ближе, а другая дальше от сплошной линии. Пунктирная линия, расположенная ближе к сплошной линии, указывает на 2 SD (> 95% референтных молекул в пределах данной области), тогда как пунктирная линия, расположенная дальше от сплошной линии, указывает на 3 SD (> 99,7% референтных молекул в пределах данной области).

**[0168]** На **фиг. 114** показан NKG2D-связывающий Fab с ленточными диаграммами трех различных ориентаций: обе внешние стороны (левая панель: вид спереди; центральная панель: вид сзади) и поверхность, взаимодействующая с антигеном (правая панель: вид сверху).

**[0169]** На **фиг. 115** показаны результаты анализов длины CDR и зон поверхностной гидрофобности NKG2D-нацеливающегося плеча AB0089. Стрелка указывает на линию, где NKG2D-нацеливающееся плечо AB0089 расположено относительно mAb, исследуемых на поздней стадии клинического испытания. Две внутренние пунктирные линии указывают на 2 SD (> 95% референтных молекул в пределах данной области). Две крайние снаружи пунктирные линии указывают на 3 SD (> 99,7% референтных молекул в пределах данной области).

**[0170]** На **фиг. 116** показаны результаты анализов поверхностного заряда и анализа гидрофобности NKG2D-нацеливающегося плеча AB0089. Стрелки указывают положение NKG2D-нацеливающегося плеча AB0089 относительно базы данных из 377 терапевтических антител, исследуемых на поздней стадии их испытания. На каждом графике имеются две пунктирные линии – одна ближе, а другая дальше от сплошной линии. Пунктирная линия, расположенная ближе к сплошной линии, указывает на 2 SD (>

95% референтных молекул в пределах данной области), тогда как пунктирная линия, расположенная дальше от сплошной линии, указывает на 3 SD (> 99,7% референтных молекул в пределах данной области).

**[0171]** На **фиг. 117** показаны акцепторные каркасные области человеческих антител, используемые в AB0089, по сравнению с другими терапевтическими mAb, исследуемыми на стадии клинического испытания. Сравнительный анализ каркасных областей, используемых в AB0089, относительно антител зародышевой линии человека, являющихся часто используемыми антителами из базы данных антител, исследуемых на стадии клинического испытания, которая содержит свыше 400 mAb из фазы I+.

**[0172]** На **фиг. 118** показаны графическое представление AB0089 с указанием составляющих компонентов цепей молекулы (**фиг. 118A**) и положений цепей H, S и L AB0089 на шкале иммуногенности белка EpiMatrix с поправкой на Treg (**фиг. 118B)**.

**[0173]** На **фиг. 119** показана технологическая схема процедуры очистки TriNKET.

**[0174]** На **фиг. 120** показана элютивная хроматограмма, полученная с использованием MabSelect с белком A для захвата.

**[0175]** На **фиг. 121** показаны результаты SEC-анализа элюата из колонки с иммобилизованным белком A, подвергнутого регулированию уровня pH и отфильтрованного для загрузки при IEX.

**[0176]** На **фиг. 122** показаны результаты анализа SDS-PAGE для AB0089 применительно к раствору, загружаемому в колонку с иммобилизованным белком A, проточной фракции и элюату из нее. Исходя из показателей поглощения, загружали 15 мкл на дорожки "раствор, загружаемый в колонку с иммобилизованным белком A" и "проточная фракция из колонки с иммобилизованным белком A", 2 мкг загружали на дорожку "элюат из колонки с иммобилизованным белком A". Основная полоса при ~120 кДа соответствует AB0089.

**[0177]** На **фиг. 123** показана хроматограмма, полученная в ходе катионообменной хроматографии с использованием Poros XS.

**[0178]** На **фиг. 124** показаны результаты анализа SDS-PAGE для AB0089 применительно к загружаемому образцу и элюционным фракциям при CIEX. Исходя из показателей поглощения, дорожки содержат ~2,0 мкг белка. Основная полоса при ~120 кДа представлена AB0089.

**[0179]** На **фиг. 125** показан SDS-PAGE партии AB0089-002 AB0089 в восстанавливающих условиях ("R") и невосстанавливающих условиях ("NR"). Три цепи (S, H и L) молекулы отмечены на дорожке R. F3' на дорожке NR относится к AB0089.

**[0180]** На **фиг. 126** показаны результаты SEC-анализа очищенной партии AB0089-002 AB0089 и указано 100%-ое содержание мономера, как определено посредством интегрированной площади пика.

**[0181]** На **фиг. 127** показаны результаты спектрометрического анализа массы интактного антитела для партии AB0089-002 AB0089. Анализ посредством LC-MS интактного AB0089 продемонстрировал наблюдаемую массу (126130,0 Да), которая хорошо согласуется с теоретической массой 126129,1 Да.

**[0182]** На **фиг. 128** показаны результаты анализа CE-SDS для AB0089, при этом для AB0089 представлены результаты анализа CE-SDS R (левая панель) и NR (правая панель).

**[0183]** На **фиг. 129** показан профиль зарядов AB0089, определенный посредством cIEF, указывающий на то, что AB0089 продемонстрировало основной пик при pI 8,52 ± 0,0.

**[0184]** На **фиг. 130** показана хроматограмма для анализа гидрофобности AB0089, определенная посредством HIC, показывающая, что AB0089 является высокочистым и гомогенным.

**[0185]** На **фиг. 131** показана термическая стабильность AB0089, как было оценено посредством анализа DSC, в трех различных составах: PBS, pH 7,4 (**фиг. 131A**), HST, pH 6,0 (**фиг. 131A**) и CST, pH 7,0 (**фиг. 131A**).

**[0186]** На **фиг. 132** показана прогнозируемая карта дисульфидных связей для AB0089.

**[0187]** На **фиг. 133** показана экстракционная ионная хроматограмма (XIC) для сконструированной дисульфидной пары в scFv (в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях) и наиболее интенсивное зарядовое состояние для этой пептидной пары.

**[0188]** На **фиг. 134** показана идентификация сконструированной межмолекулярной дисульфидной CH3-CH3-связи в Fc.

**[0189]** На **фиг. 135** показано связывание CLEC12A человека с AB0089, протестированное посредством SPR.

**[0190]** На **фиг. 136** показано, что связывание AB0089 и молекулы на основе теподитамаба с CLEC12A соответствует модели с двумя состояниями.

**[0191]** На **фиг. 137** показана оценка посредством FACS связывания AB0089 с изогенной линией клеток, экспрессирующих CLEC12A, и линиями раковых клеток AML (PL-21 и HL-60).

**[0192]** На **фиг. 138** показано связывание AB0089 с генетическим вариантом CLEC12A (Q244) (средняя панель) по сравнению с CLEC12A (K244) дикого типа (левая панель) и CLEC12A яванского макака (cCLEC12A) (правая панель).

**[0193]** На **фиг. 139** показано связывание AB0089 с дифференциально гликозилированным CLEC12A: необработанным hCLEC12A (левая панель), десиалилированным hCLEC12A (средняя панель) и полностью дегликозилированным hCLEC12A (правая панель).

**[0194]** На **фиг. 140** показано связывание AB0089 с NKG2D человека, протестированное посредством SPR. Верхняя панель: цветные сенсограммы представляют необработанные данные. Отображаемые при наложении элементы черного цвета представляют аппроксимацию данных кинетики 1:1. Нижняя панель: аппроксимация с использованием аффинности в стационарном состоянии. Показаны данные из четырех независимых каналов Biacore. Линия представляет значение KD в стационарном состоянии.

**[0195]** На **фиг. 141** показано связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным человеческим CD16a (V158).

**[0196]** На **фиг. 142** показано связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным человеческим CD64 (FcγRI).

**[0197]** На **фиг. 143** показано связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным CD64 (FcγRI) яванского макака.

**[0198]** На **фиг. 144** показано связывание AB0089 и трастузумаба с H131 человеческого CD32a (H131 FcγRIIa).

**[0199]** На **фиг. 145** показано связывание AB0089 и трастузумаба с R131 человеческого CD32a (R131 FcγRIIa).

**[0200]** На **фиг. 146** показано связывание AB0089 и трастузумаба с F158 рекомбинантного человеческого CD16a (F158 FcγRIIIa).

**[0201]** На **фиг. 147** показано связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным CD16 (FcγRIII) яванского макака.

**[0202]** На **фиг. 148** показано связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным человеческим CD32b (FcγRII).

**[0203]** На **фиг. 149** показано связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным человеческим CD16b (FcγRIIIb).

**[0204]** На **фиг. 150** показано связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным человеческим FcRn.

**[0205]** На **фиг. 151** показано связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным FcRn яванского макака.

**[0206]** На **фиг. 152** показано, что одновременное вовлечение AB0089 во взаимодействие с CD16a и NKG2D приводит в результате к авидному связыванию.

**[0207]** На **фиг. 153** показано одновременное совместное вовлечение во взаимодействие связывающих плеч CLEC12A и NKG2D AB0089.

**[0208]** На **фиг. 154** представлено краткое описание связываемого эпитопа для AB0089 в сравнении с AB0237, AB0192 и тремя CLEC12A-связывающими референтными TriNKET согласно результатам SPR. Взаимодействие AB0089 с hCLEC12A блокировалось AB0237 и двумя контрольными молекулами cFAE-A49 CLL1-Merus и cFAE-A49 теподитамаб, но не молекулой на основе Genentech-h6E7, и при этом показано, что связываемый эпитоп для AB0089 перекрывается с таковым для Merus-CLL1 и теподитамаба.

**[0209]** На **фиг. 155** показана активность AB0089 в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV, с клетками HL60 и PL21.

**[0210]** На **фиг. 156** показано, что AB0089 в высокой степени усиливает лизис раковых клеток, опосредованный первичными NK-клетками, превосходя по эффективности родительское mAb.

**[0211]** На **фиг. 157** показано схематическое представление результатов анализа с использованием PSR (**фиг. 157A**) и анализа специфичности связывания с использованием PSR для AB0089 в сравнении с антителами с известными результатами анализа специфичности связывания с использованием PSR (ритуксимаб) и антителом с отсутствием неизвестной неспецифичности (трастузумаб) (**фиг. 157B**).

**[0212]** На **фиг. 158** показано относительное связывание (Z-показатель) AB0089 при 1 мкг/мл с CLEC12A человека по сравнению с микрочипом полного протеома человека. Представлен график, демонстрирующий Z-показатель для относительного связывания (ось Y) по сравнению с 24 основными идентифицированными партнерами по связыванию AB0089 (ось X). hCLEC12a расположен на графике в положении 1 с Z-показателем, составляющим 150,61.

**[0213]** На **фиг. 159** показаны результаты SEC-анализа для AB0089 через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0, по сравнению с контрольным образцом, демонстрирующие, что AB0089 проявляет высокую стабильность.

**[0214]** На **фиг. 160** показаны результаты анализа CE-SDS для AB0089 через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0, по сравнению с контролем. Представлены невосстанавливающие (NR) (левая панель) и восстанавливающие (R) (правая панель) условия.

**[0215]** На **фиг. 161** показано, что AB0089 является стабильным через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0, без эффекта в отношении связывания с hCLEC12A (**фиг. 161A**), hNKG2D (**фиг. 161B**) или hCD16aV (**фиг. 161C**).

**[0216]** На **фиг. 162** показана активность AB0089 через 4 недели при 40°C в HST, pH 6.0.

**[0217]** На **фиг. 163** показано, что AB0089 продемонстрировало высокую стабильность после 4 недель инкубации в CST, pH 7,0, при 40°C по сравнению с контрольным образцом, как измерено посредством SEC-анализа.

**[0218]** На **фиг. 164** показано, что при CE-SDS не наблюдалась какой-либо фрагментации AB0089 через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0, по сравнению с контрольным образцом. Представлены NR (левая панель) и R (правая панель).

**[0219]** На **фиг. 165** показано, что AB0089 является стабильным через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0, без эффекта в отношении связывания с hCLEC12A (**фиг. 165A**), hNKG2D (**фиг. 165B**) или hCD16aV (**фиг. 165C**).

**[0220]** На **фиг. 166** показано, что длительный тепловой стресс не влиял на активность AB0089 через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0, по сравнению с контролем.

**[0221]** На **фиг. 167** представлена экстракционная ионная хроматограмма триптического пептида, охватывающего CDRH3 CLEC12a-нацеливающегося плеча AB0089, которая не показала признаков изомеризации аспарагиновой кислоты в пептиде, охватывающем CLEC12A-связывающий CDRH3, исходя из ручной проверки формы пика.

**[0222]** На **фиг. 168** представлены результаты SEC-анализа, демонстрирующие, что не имеется какой-либо разницы в содержании мономера между окисленным AB0089 и контрольным образцом после принудительного окисления.

**[0223]** На **фиг. 169** показано, что при CE-SDS не наблюдалась какой-либо фрагментации AB0089 после принудительного окисления по сравнению с контрольным образцом. Представлены NR (левая панель) и R (правая панель).

**[0224]** На **фиг. 170** показано, что окислительный стресс не оказывал значительного эффекта в отношении содержания активного белка или в отношении значений аффинности к hCLEC12A (**фиг. 170A**, верхняя панель), hNKG2D (**фиг. 170B**, средняя панель) и hCD16Av (**фиг. 170C**, нижняя панель).

**[0225]** На **фиг. 171** показано, что AB0089 является стабильным при принудительном окислении.

**[0226]** На **фиг. 172** представлены результаты SEC-анализа, демонстрирующие, что AB0089 является стабильным под воздействием стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8,0, 40°C, 2 недели).

**[0227]** На **фиг. 173** представлены результаты анализа CE-SDS, демонстрирующие, что AB0089 демонстрировало низкие уровни разрушения AB0089 после длительного

воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8, 40ºC, 2 недели). Представлены NR (левая панель) и R (правая панель).

**[0228]** На **фиг. 174** представлены результаты cIEF, демонстрирующие, что AB0089 демонстрировало кислотный сдвиг после длительного воздействия высокого уровня pH (pH 8, 40°C, 2 недели).

**[0229]** На **фиг. 175** показано, что не имелось значимой разницы в количестве активного белка или в значениях аффинности к hCLEC12A (**фиг. 175A**, верхняя панель), hNKG2D ((**фиг. 175B**, средняя панель) или hCD16aV (**фиг. 175C**, нижняя панель) между подвергнутыми стрессовому условию образцами и контрольными образцами после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH, составляющий 8,0 (pH 8, 40ºC, 2 недели).

**[0230]** На **фиг. 176** показано, что активность AB0089 снижалась в примерно 2 раза после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8, 40°C, 2 недели).

**[0231]** На **фиг. 177** представлены результаты SEC-анализа, демонстрирующие, что AB0089 характеризуется высокой степенью стабильности под воздействием стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 2 недели).

**[0232]** На **фиг. 178** представлены результаты анализа CE-SDS для AB0089 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 2 недели), демонстрирующие, что низкие уровни разложения AB0089 были выявлены в невосстанавливающих (левая панель) и в восстанавливающих условиях (правая панель) при CE-SDS.

**[0233]** На **фиг. 179** представлены результаты анализа cIEF, демонстрирующие, что AB0089, подвергнутое воздействию стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH, демонстрирует небольшой кислотный сдвиг в профиле зарядов.

**[0234]** На **фиг. 180** показано, что не имелось значимой разницы в содержании активного белка или в значениях аффинности AB0089 к hCLEC12A (**фиг. 180A**, верхняя панель), hNKG2D (**фиг. 180B**, средняя панель) или hCD16aV (**фиг. 180C**, нижняя панель) после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 2 недели).

**[0235]** На **фиг. 181** показано, что активность AB0089 оставалась аналогичной активности контрольного образца после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 2 недели).

**[0236]** На **фиг. 182** представлена экстракционная ионная хроматограмма триптического пептида, охватывающего CDRH3 CLEC12A-нацеливающегося плеча

AB0089, которая не показала признаков изомеризации аспарагиновой кислоты в пептиде, охватывающем CLEC12A-связывающий CDRH3, после длительного воздействия низкого уровня pH (pH 5,0), исходя из ручной проверки формы пика.

**[0237]** На **фиг. 183** представлены результаты SEC-анализа, демонстрирующие, что AB0089 является стабильным после шести циклов замораживания/оттаивания.

**[0238]** На **фиг. 184** представлены результаты анализа CE-SDS для AB0089 после шести циклов замораживания/оттаивания, демонстрирующие, что не имелось выявленных потерь в отношении чистоты в восстанавливающих (правая панель) или в невосстанавливающих условиях при CE-SDS (левая панель).

**[0239]** На **фиг. 185** представлены результаты SEC-анализа, демонстрирующие, что AB0089 является стабильным после воздействия стрессового условия, представляющего собой перемешивание (300 об/мин при комнатной температуре в планшете с глубокими лунками в течение 3 дней).

**[0240]** На **фиг. 186** представлены результаты SEC-анализа, демонстрирующие, что AB0089 характеризовалось способностью подвергаться концентрированию до > 175 мг/мл с минимальным снижением процентного содержания мономера.

**[0241]** На **фиг. 187** представлен график, демонстрирующий, что AB0089 поддается концентрированию (вплоть до 178 мг/мл) без снижения содержания мономера.

**[0242]** На **фиг. 188** представлен SEC-анализ элюата из колонки с иммобилизованным белком A до и после выдерживания при низком уровне pH, демонстрирующий, что AB0089 является высокостабильным в условиях выдерживания при низком уровне pH/вирусной инактивации, применяемых при изготовлении биологических препаратов.

**[0243]** На **фиг. 189** показано, что профиль зарядов AB0089 остается неизменным после выдерживания при низком уровне pH.

**[0244]** На **фиг. 190** показано, что на значения аффинности AB0089 к hCLEC12a, hNKG2D и CD16aV не влияло выдерживание при низком уровне pH.

**[0245]** На **фиг. 191** показано, что активность AB0089 не изменялась после стадии выдерживания при низком уровне pH.

**[0246]** На **фиг. 192** представлены результаты SEC-анализа, демонстрирующие, что изменение профиля %-ого содержания мономера не происходило после выдерживания при низком уровне pH.

**[0247]** На **фиг. 193** показано, что выдерживание при низком уровне pH не оказывало существенного эффекта в отношении профиля зарядов AB0089.

**[0248]** На **фиг. 194** показано, что AB0089 в высокой степени усиливает цитотоксичность NK-клеток человека в отношении клеток AML PL21. Очищенные NK-

клетки человека выдерживали в состоянии покоя в течение ночи и на следующий день совместно культивировали с мечеными клетками-мишенями PL21 для анализа DELFIA. Титры дозы CLEC12A-специфичного TriNKET AB0089 или родительского mAb AB0305 получали, начиная с 10 нМ, и добавляли к кокультурам. Анализы выполняли в общей сложности с шестью здоровыми донорами NK-клеток; при этом показан репрезентативный результат. Специфический лизис наносили на график в зависимости от концентрации тестируемого образца и данные аппроксимировали согласно 4-параметрической нелинейной регрессионной модели с получением значений активности. Точки данных представляют среднее ± стандартное отклонение.

**[0249]** На **фиг. 195** показано, что AB0192 в высокой степени усиливает цитотоксичность NK-клеток человека в отношении клеток AML HL60. Очищенные NK-клетки человека выдерживали в состоянии покоя в течение ночи и на следующий день совместно культивировали с мечеными клетками-мишенями HL60 для анализа DELFIA. Титры дозы CLEC12A-специфичного TriNKET AB0089 или родительского mAb AB0305 получали, начиная с 10 нМ, и добавляли к кокультурам. Анализы выполняли в общей сложности с четырьмя здоровыми донорами NK-клеток; при этом показан репрезентативный результат. Специфический лизис наносили на график в зависимости от концентрации тестируемого образца и данные аппроксимировали согласно 4-параметрической нелинейной регрессионной модели с получением значений активности. Точки данных представляют среднее ± стандартное отклонение.

**[0250]** На **фиг. 196** показано, что AB0192 в высокой степени усиливает цитотоксичность NK-клеток человека в отношении клеток AML PL21. Очищенные NK-клетки человека выдерживали в состоянии покоя в течение ночи и на следующий день совместно культивировали с мечеными клетками-мишенями PL21 для анализа DELFIA. Титры дозы CLEC12A-специфичного TriNKET AB0192 или родительского mAb AB0306 получали, начиная с 10 нМ, и добавляли к кокультурам. Анализы выполняли в общей сложности с шестью здоровыми донорами NK-клеток; при этом показан репрезентативный результат. Специфический лизис наносили на график в зависимости от концентрации тестируемого образца и данные аппроксимировали согласно 4-параметрической нелинейной регрессионной модели с получением значений активности. Точки данных представляют среднее ± стандартное отклонение.

**[0251]** На **фиг. 197** показано, что AB0192 в высокой степени усиливает цитотоксичность NK-клеток человека в отношении клеток AML HL60. Очищенные NK-клетки человека выдерживали в состоянии покоя в течение ночи и на следующий день совместно культивировали с мечеными клетками-мишенями HL60 для анализа DELFIA.

Титры дозы CLEC12A-специфичного TriNKET AB0192 или родительского mAb AB0306 получали, начиная с 10 нМ, и добавляли к кокультурам. Анализы выполняли в общей сложности с четырьмя здоровыми донорами NK-клеток; при этом показан репрезентативный результат. Специфический лизис наносили на график в зависимости от концентрации тестируемого образца и данные аппроксимировали согласно 4-параметрической нелинейной регрессионной модели с получением значений активности. Точки данных представляют среднее ± стандартное отклонение.

**[0252]** На **фиг. 198** показано, что на активность AB0089 не влияет присутствие растворимой формы MIC-A. Очищенные NK-клетки человека выдерживали в состоянии покоя в течение ночи и на следующий день помещали в лунки для совместного культивирования с клетками-мишенями PL21, мечеными для DELFIA. Получали титры дозы AB0089 и AB0305 и растворимую форму MIC-A-Fc добавляли до достижения 20 нг/мл к серии титров каждого тестируемого образца. Титры дозы аппроксимировали согласно 4-параметрической нелинейной регрессионной модели. Точки данных представляют среднее ± стандартное отклонение.

**[0253]** На **фиг. 199** показано, что AB0089 индуцирует продуцирование IFNγ и дегрануляцию, осуществляемые NK-клетками человека, которые направлены против клеток AML PL21. Замороженные PBMC оттаивали и совместно культивировали с клетками-мишенями PL21 в присутствии титров дозы AB0089, AB0305 или F3'-паливизумаба. После инкубации клетки подготавливали для FACS-анализа на дегрануляцию CD107a и внутриклеточное накопление IFNγ. Показанное на фигуре является репрезентативным для трех протестированных доноров PBMC. Процентное содержание индуцированных IFNγ+CD107+ NK-клеток наносили на график в зависимости от концентрации, и при этом данные аппроксимировали согласно 4-параметрической нелинейной регрессионной модели с получением значений активности. Точки данных представляют среднее ± стандартное отклонение.

**[0254]** На **фиг. 200** показано, что AB0089 индуцирует продуцирование IFNγ и дегрануляцию, осуществляемые NK-клетками человека, которые направлены против клеток AML HL60. Замороженные PBMC оттаивали и совместно культивировали с клетками-мишенями HL60 в присутствии титров дозы AB0089, AB0305 или F3'-паливизумаба. После инкубации клетки подготавливали для FACS-анализа на дегрануляцию CD107a и внутриклеточное накопление IFNγ. Показанное на фигуре является репрезентативным для трех протестированных доноров PBMC. Процентное содержание индуцированных IFNγ+CD107+ NK-клеток наносили на график в зависимости от концентрации, и при этом данные аппроксимировали согласно 4-параметрической

нелинейной регрессионной модели с получением значений активности. Точки данных представляют среднее ± стандартное отклонение.

**[0255]** На **фиг. 201** показано, что CLEC12A-специфичные TriNKET индуцируют ADCP-активность M0-макрофагов, направленную против клеток AML PL21. Полученные *in vitro* M0-макрофаги метили фиолетовым красителем Cell Trace и совместно культивировали с меченными Cell Trace CFSE клетками-мишенями PL21 при соотношении E:T 8:1. Через два часа клетки подготавливали для анализа посредством проточной цитометрии. Клетки, являющиеся двойными положительными по фиолетовому красителю Cell Trace/CFSE, считались событиями осуществления фагоцитоза. Анализы выполнялись с макрофагами, полученными от трех независимых доноров, при этом показанное на фигуре является репрезентативным результатом. Процент фагоцитоза клеток-мишеней наносили на график в зависимости от концентрации тестируемого образца и данные аппроксимировали согласно 4-параметрической нелинейной регрессионной модели с получением значений активности. Точки данных представляют среднее ± стандартное отклонение.

**[0256]** На **фиг. 202** показано, что AB0089 не стимулирует CDC, направленную против клеток AML PL21. AB0089 инкубировали с BATDA-меченными клетками PL21 в среде для культивирования клеток, содержащей 5% сыворотки крови человека, в течение 60 минут. Изотипический контроль IgG1 человека служил в качестве отрицательного контроля, тогда как клон W6/32 антитела к молекулам MHC класса I использовался в качестве положительного контроля. Специфический лизис клеток-мишеней наносили на график в зависимости от концентрации и данные аппроксимировали согласно 4-параметрической нелинейной регрессионной модели с получением значений активности. Точки данных представляют среднее ± стандартное отклонение.

**[0257]** На **фиг. 203** показано связывание CLEC12A-TriNKET с линиями клеток, экспрессирующих CLEC12A. Дозозависимое связывание CLEC12A-специфичных TriNKET и их родительских mAb анализировали на (**фиг. 203A**) клетках Ba/F3, сверхэкспрессирующих CLEC12A человека. Линии раковых клеток человека (**фиг. 203B**) HL60 и (**фиг. 203C**) PL21 с эндогенной экспрессией CLEC12A применяли для подтверждения результатов, полученных при использовании трансфицированной линии клеток. Показанные фигуры являются репрезентативными для результатов, относящихся к трем независимым экспериментам, которые сведены в таблицу 201.

**[0258]** На **фиг. 204** показано удерживание на поверхности CLEC12A в линиях клеток AML, подвергнутых воздействию CLEC12A-специфичных TriNKET. Удерживание CLEC12A на поверхности клеток (**фиг. 204A**) HL60 и (**фиг. 204B**) PL21 измеряли после

воздействия тестируемых образцов при 40 нМ в течение двух часов при 37°C. Тестируемые образцы применяли при концентрациях насыщения и проводили обнаружение с использованием вторичного антитела, специфичного к Fc IgG человека. Интенсивность окрашивания через два часа при 37°C нормализовали к интенсивности окрашивания того же тестируемого образца на клетках, инкубированных в течение двух часов на льду, для определения процентного содержания CLEC12A, удерживаемого на клеточных поверхностях. Столбцы данных представляют среднее значение для дублированных лунок, а планки погрешностей представляют стандартное отклонение. Показанные фигуры являются репрезентативными для результатов, относящихся к трем независимым экспериментам, которые сведены в таблицу 202.

**[0259]** На **фиг. 205** показано связывание AB0089, нормализованное к AB0237, через два часа при 37°C. Связывание AB0089 и AB0237 сравнивали на клетках HL60 после двухчасовой инкубации на льду или при 37°C. На гистограммах представлено следующее: (1-ая сверху вниз) AB0237, два часа при 37°C, (2-ая сверху вниз) AB0237, два часа на льду, (3-я сверху вниз) AB0089, два часа при 37°C, (4-ая сверху вниз) AB0089, два часа на льду. Связывание всех тестируемых образцов обнаруживали с помощью антитела к Fc IgG человека, конъюгированного с флуорофором.

**[0260]** На **фиг. 206** показано, что AB0089 связывает CLEC12A+ бласты в 10 образцах от пациентов с первичным AML. Образцы костного мозга и PBMC от доноров с первичным AML получали от коммерческих поставщиков, см. таблицу 3. Образцы подготавливали для анализа посредством проточной цитометрии в соответствии с панелью антител в таблице 1. На гистограммах представлено окрашивание бластов AML следующим образом: 4-ая сверху вниз = изотипический контроль hIgG1, 3-я сверху вниз = AB0305-CF568, 2-ая сверху вниз = AB0089-CF568, 1-ая сверху вниз = антитело к CLEC12 50C1-CF568.

**[0261]** На **фиг. 207** показано, что AB0089 связывает CLEC12A+ CD34+CD38- клетки в 10 образцах от пациентов с первичным AML. Образцы костного мозга и PBMC от доноров с первичным AML получали от коммерческих поставщиков, см. таблицу 200. Образцы подготавливали для анализа посредством проточной цитометрии в соответствии с панелью антител в таблице 198. Образцы дополнительно гейтировали по CD34+CD38- субпопуляции для обогащения лейкозными стволовыми клетками. На гистограммах представлено окрашивание CD34+CD38- бластов следующим образом: 4-ая сверху вниз = изотипический контроль hIgG1, 3-я сверху вниз = AB0305-CF568, 2-ая сверху вниз = AB0089-CF568, 1-ая сверху вниз = антитело к CLEC12 50C1-CF568.

**[0262]** На **фиг. 208** показан путь, начиная с иммунизации мышей и заканчивая получением AB0192. На верхней панели представлены результаты связывания CLEC12A согласно результатам SPR. На нижней панели показано связывание с CLEC12A+ раковыми клетками AML PL-21.

**[0263]** На **фиг. 209** показано схематическое представление AB0192. Запатентованные мутации, способствующие гетеродимеризации, и сконструированный межцепочечный дисульфидный мостик обеспечивают эффективное спаривание цепей Fc IgG1. scFv получен из гуманизированного и откорректированного по потенциальным участкам неблагоприятных модификаций в последовательности mAb к CLEC12A 9F11.B7. scFv стабилизирован посредством сконструированного дисульфидного мостика между VH и VL.

**[0264]** На **фиг. 210** показаны аминокислотные последовательности трех полипептидных цепей, которые составляют AB0192. Цепь S: scFv-CH2-CH3 антитела к CLEC12A (гуманизированная последовательность, CDR выделены жирным шрифтом, не подчеркнуты, обратные мутации выделены жирным шрифтом и подчеркнуты, сконструированный сайт образования дисульфидного мостика в scFv выделен курсивом и жирным шрифтом, а мутации Fc для обеспечения гетеродимеризации и сконструированный дисульфидный мостик между CH3 подчеркнуты нежирным шрифтом). Цепь H: VH-CH1-CH2-CH3 антитела к NKGD (полностью человеческая, CDR выделены жирным шрифтом, не подчеркнуты, мутации Fc для обеспечения гетеродимеризации и сконструированный дисульфидный мостик между CH3 подчеркнуты нежирным шрифтом). Цепь L: VL-CL антитела к NKGD (полностью человеческая, CDR выделены жирным шрифтом, не подчеркнуты).

**[0265]** На **фиг. 211** показаны акцепторные каркасные области человеческих антител, используемые в AB0192, по сравнению с другими терапевтическими mAb, исследуемыми на стадии клинического испытания. Сравнительный анализ каркасных областей, используемых в AB0192, относительно антител зародышевой линии человека, являющихся часто используемыми антителами из базы данных антител, исследуемых на стадии клинического испытания, которая содержит свыше 400 mAb из фазы I+.

**[0266]** На **фиг. 212** показана представленная в виде ленточной диаграммы модель CLEC12A-связывающего scFv в трех различных ориентациях (верхняя панель) и их соответствующее распределение поверхностного заряда для той же ориентации (нижняя панель). Распределение заряда scFv антитела к CLEC12A является поляризованным ("вид сверху", нижняя панель) с отрицательно заряженными остатками, находящимися преимущественно в CDRH3 и CDRL2. Показаны три ориентации: обе внешние стороны

(левая панель: вид спереди; центральная панель: вид сзади) и поверхность, взаимодействующая с антигеном (правая панель: вид сверху).

**[0267]** На **фиг. 213** показаны результаты анализа длины CDR и зон поверхностной гидрофобности CLEC12A-нацеливающегося плеча AB0192. Стрелка указывает на местоположение, где CLEC12A-нацеливающийся scFv AB0192 расположен относительно mAb, исследуемых на поздней стадии клинического испытания. Внутренние пунктирные линии указывают на 2 SD (> 95% референтных молекул в пределах данной области). Крайние снаружи пунктирные линии указывают на 3 SD (> 99,7% референтных молекул в пределах данной области).

**[0268]** На **фиг. 214** показаны результаты анализа зон, содержащих положительные и отрицательные заряды, а также симметрия этих зарядов относительно областей CDR. Стрелка указывает на местоположение, где CLEC12A-нацеливающийся scFv AB0192 расположен относительно mAb, исследуемых на поздней стадии клинического испытания. На каждом графике имеются две пунктирные линии – одна ближе, а другая дальше от сплошной линии. Пунктирная линия, расположенная ближе к сплошной линии, указывает на 2 SD (> 95% референтных молекул в пределах данной области), тогда как пунктирная линия, расположенная дальше от сплошной линии, указывает на 3 SD (> 99,7% референтных молекул в пределах данной области).

**[0269]** На **фиг. 215** показаны ленточные диаграммы с тремя различными ориентациями NKG2D-связывающего плеча Fab (верхняя панель) и их соответствующее распределение поверхностного заряда для той же ориентации (нижняя панель). Показаны три ориентации: обе внешние стороны (левая панель: вид спереди; центральная панель: вид сзади) и поверхность, взаимодействующая с антигеном (правая панель: вид сверху).

**[0270]** На **фиг. 216** показаны результаты анализов длины CDR и зон поверхностной гидрофобности NKG2D-нацеливающегося плеча AB0192. Стрелка указывает на местоположение, где NKG2D-нацеливающийся Fab AB0192 расположен относительно mAb, исследуемых на поздней стадии клинического испытания. Внутренние пунктирные линии указывают на 2 SD (> 95% референтных молекул в пределах данной области). Крайние снаружи пунктирные линии указывают на 3 SD (> 99,7% референтных молекул в пределах данной области).

**[0271]** На **фиг. 217** показаны результаты анализов зон, содержащих положительные и отрицательные заряды, а также симметрия этих зарядов относительно областей CDR. Стрелки указывают местонахождение положения NKG2D-нацеливающегося Fab AB0192 относительно базы данных из 377 терапевтических антител, исследуемых на поздней стадии их испытания. На каждом графике имеются две пунктирные линии – одна ближе, а

другая дальше от сплошной линии. Пунктирная линия, расположенная ближе к сплошной линии, указывает на 2 SD (> 95% референтных молекул в пределах данной области), тогда как пунктирная линия, расположенная дальше от сплошной линии, указывает на 3 SD (> 99,7% референтных молекул в пределах данной области).

**[0272]** На **фиг. 218A** и **фиг. 218B** показано положение цепей AB0192 на шкале иммуногенности белка EpiMatrix с поправкой на Treg. На **фиг. 218A** показано графическое представление AB0192; на **фиг. 218B** показаны положения цепей H, S и L AB0192 на шкале иммуногенности белка с поправкой на Treg.

**[0273]** На **фиг. 219** показано схематическое представление двухстадийной очистки платформы AB0192. Левая панель: результаты анализа SDS-PAGE для AB0192 до и после первой стадии процедуры очистки (захват посредством белка A). Средняя панель: результаты SEC-анализа для AB0192 после стадии с использованием белка A и после стадии с проведением cIEX. Правая панель: результаты SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях для очищенного AB0192.

**[0274]** На **фиг. 220** показаны результаты анализа массы интактного антитела для AB0192 (партия AB0192-005) с использованием анализа LC-MS. Теоретическая масса AB0192 = 126429,5 Да. Наблюдаемая масса партии AB0192-005 AB0192 = 126429,9 Да.

**[0275]** На **фиг. 221** показаны результаты SEC-анализа (Superdex 200) очищенного AB0192 (партии AB0192-005), который продемонстрировал >99%-ое содержание мономера, как определено посредством интегрированной площади пика.

**[0276]** На **фиг. 222** показана чистота AB0192 (партия AB0192-005) в невосстанавливающих условиях ("NR"; левая панель) и в восстанавливающих условиях ("R"; правая панель), определенная посредством CE-SDS.

**[0277]** На **фиг. 223** показан профиль cIEF для AB0192 (партия AB0192-005).

**[0278]** На **фиг. 224** показаны результаты анализа гидрофобности для AB0192, определенной посредством HIC.

**[0279]** На **фиг. 225A – фиг. 225C** показаны результаты DSC-анализа AB0192 в трех разных буферных системах. PBS, pH 7,4 (**фиг. 225A**), HST, pH 6,0 (**фиг. 225B**) и CST, pH 7,0 (**фиг. 225C**).

**[0280]** На **фиг. 226** показана прогнозируемая карта дисульфидных связей для AB0192.

**[0281]** На **фиг. 227** показана экстракционная ионная хроматограмма (XIC) для сконструированной дисульфидной пары в scFv (в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях) и наиболее интенсивное зарядовое состояние для этой пептидной пары.

**[0282]** На **фиг. 228** показано наличие сконструированной межмолекулярной дисульфидной CH3-CH3-связи в Fc.

**[0283]** На **фиг. 229** показано связывание AB0192 с CLEC12A человека, протестированное посредством SPR.

**[0284]** На **фиг. 230** показано связывание AB0192 с генетическим вариантом CLEC12A (Q244) человека по сравнению с CLEC12A (K244) дикого типа и CLEC12A яванского макака, протестированное посредством SPR.

**[0285]** На **фиг. 231** показано связывание AB0192 с дифференциально гликозилированным CLEC12A, протестированное посредством SPR.

**[0286]** На **фиг. 232** показано связывание AB0192 с CLEC12A+ изогенными клетками и клетками AML HL60 и PL21.

**[0287]** На **фиг. 233** показано связывание AB0192 с NKG2D человека, протестированное посредством SPR.

**[0288]** На **фиг. 234** показано связывание AB0192 с аллелем V158 hCD16a.

**[0289]** На **фиг. 235** показано одновременное связывание AB0192 с CD16a и NKG2D, приводящее в результате к авидному связыванию. AB0192 вводили поверх поверхностей с NKG2D (средняя линия, как указано в правой части графика), CD16a (нижняя линия, как указано в правой части графика) или смешанными CD16a и NKG2D (верхняя линия, как указано в правой части графика). Следует обратить внимание, что поверхность не была оптимизирована для максимального эффекта авидности.

**[0290]** На **фиг. 236** показано последовательное насыщение захваченного AB0192 hCLEC12A и hNKG2D. Мишени последовательно вводили поверх AB0192, захваченного на чипе Biacore. На верхней панели представлено связывание hCLEC12A (100 нМ) с последующим связыванием hNKG2D (7 мкМ) с захваченным AB0192. На нижней панели изображен обратный порядок связывания мишеней (связывания NKG2D человека с последующим связыванием hCLEC12A). Относительные стехиометрические параметры связывания (относительно связывания каждой мишени с незанятым захваченным AB0192) показаны в таблице 218.

**[0291]** На **фиг. 237** показано связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным человеческим CD64 (FcγRI). Различие в кажущихся ответах при максимальном связывании между молекулами обусловлено их различием в молекулярной массе.

**[0292]** На **фиг. 238** показано связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным человеческим CD64 (FcγRI). Различие в кажущихся ответах при максимальном связывании между молекулами обусловлено их различием в молекулярной массе.

**[0293]** На **фиг. 239** показано связывание AB0192 и трастузумаба с аллелем H131 рекомбинантного человеческого CD32a (FcγRIIa). На верхней панели для каждой молекулы представлены исходные сенсограммы связывания, тогда как на нижних панелях представлена аппроксимация к модели аффинности в стационарном состоянии. Различие в кажущихся ответах при максимальном связывании между молекулами обусловлено различием в молекулярной массе.

**[0294]** На **фиг. 240** показано связывание AB0192 и трастузумаба с аллелем R131 рекомбинантного человеческого CD32a (FcγRIIa). На верхней панели для каждой молекулы представлены исходные сенсограммы связывания, тогда как на нижних панелях представлена аппроксимация к модели аффинности в стационарном состоянии. Различие в кажущихся ответах при максимальном связывании между молекулами обусловлено различием в молекулярной массе.

**[0295]** На **фиг. 241** показано связывание AB0192 и трастузумаба с аллелем F158 рекомбинантного человеческого CD16a (FcγRIIIa). На верхней панели для каждой молекулы представлены исходные сенсограммы связывания, тогда как на нижних панелях представлена аппроксимация к модели аффинности в стационарном состоянии. Различие в кажущихся ответах при максимальном связывании между молекулами обусловлено различием в молекулярной массе.

**[0296]** На **фиг. 242** показано связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным CD16 (FcγRIII) яванского макака. На верхней панели для каждой молекулы представлены исходные сенсограммы связывания, тогда как на нижних панелях представлена аппроксимация к модели аффинности в стационарном состоянии. Различие в кажущихся ответах при максимальном связывании между молекулами обусловлено различием в молекулярной массе.

**[0297]** На **фиг. 243** показано связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным человеческим CD32b (FcγRIIb). На верхней панели для каждой молекулы представлены исходные сенсограммы связывания, тогда как на нижних панелях представлена аппроксимация к модели аффинности в стационарном состоянии. Различие в кажущихся ответах при максимальном связывании между молекулами обусловлено различием в молекулярной массе.

**[0298]** На **фиг. 244** показано связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным человеческим CD16b (FcγRIIIb). На верхней панели для каждой молекулы представлены исходные сенсограммы связывания, тогда как на нижних панелях представлена аппроксимация к модели аффинности в стационарном состоянии. Различие в кажущихся

ответах при максимальном связывании между молекулами обусловлено различием в молекулярной массе.

**[0299]** На **фиг. 245** показано связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным человеческим FcRn. На верхней панели для каждой молекулы представлены исходные сенсограммы связывания, тогда как на нижних панелях представлена аппроксимация к модели аффинности в стационарном состоянии. Различие в кажущихся ответах при максимальном связывании между молекулами обусловлено различием в молекулярной массе.

**[0300]** На **фиг. 246** показано связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным FcRn яванского макака. На верхней панели для каждой молекулы представлены исходные сенсограммы связывания, тогда как на нижних панелях представлена аппроксимация к модели аффинности в стационарном состоянии. Различие в кажущихся ответах при максимальном связывании между молекулами обусловлено различием в молекулярной массе.

**[0301]** На **фиг. 247** показана эпитоп-специфическая сортировка AB0192 по сравнению с другими CLEC12A-связывающими TriNKET.

**[0302]** На **фиг. 248** показана активность AB0192 в анализе цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками, по сравнению с соответствующим контрольным mAb.

**[0303]** На **фиг. 249A** и **фиг. 249B** показаны результаты анализа неспецифичности AB0192, полученные в анализе с использованием PSR. **Фиг. 249A**: схематическое представление анализа с использованием PSR; **фиг. 249B**: Результаты анализа специфичности связывания с использованием PSR для AB0089 в сравнении с антителами с известными результатами анализа специфичности связывания с использованием PSR (ритуксимабом) и антителом с отсутствием неизвестной неспецифичности (трастузумабом).

**[0304]** На **фиг. 250** показан относительный Z-показатель для AB0089, определенный в анализе с использованием микрочипа протеома человека HuProt™. Представлен график, демонстрирующий Z-показатель для относительного связывания (ось Y) по сравнению с 24 основными идентифицированными партнерами по связыванию AB0192 (ось X). hCLEC12a расположен на графике в положении 1 с Z-показателем, составляющим 150,06.

**[0305]** На **фиг. 251** показаны результаты SEC-анализа для AB0192 через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0, по сравнению с контролем.

**[0306]** На **фиг. 252** показаны результаты анализа CE-SDS для AB0192 через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0, по сравнению с контролем. Невосстанавливающие условия показаны на левой панели. Восстанавливающие условия показаны на правой панели.

**[0307]** На **фиг. 253** показано, что AB0192 является стабильным через 4 недели воздействия стрессового условия при 40°C в HST, pH 6,0: эффект в отношении связывания CLEC12A, NKG2D или CD16a отсутствует.

**[0308]** На **фиг. 254** показано, что не имелось никакого различия в активности между контрольными и подвергнутыми стрессовому условию образцами AB0192 через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0, в анализе KHYG-1-CD16a-опосредованной цитотоксичности.

**[0309]** На **фиг. 255** показана минимальная агрегация AB0192 через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0, как измерено посредством SEC-анализа.

**[0310]** На **фиг. 256** показана минимальная фрагментация AB0192 через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0, по сравнению с контролем, как измерено посредством анализа CE-SDS.

**[0311]** На **фиг. 257** показано, что AB0192 является стабильным через 4 недели воздействия стрессового условия при 40°C в CST, pH 7,0: эффект в отношении связывания CLEC12A, NKG2D или CD16a отсутствует.

**[0312]** На **фиг. 258** показано, что не имелось никакого различия в активности между контрольными и подвергнутыми стрессовому условию образцами AB0192 через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0, в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16a.

**[0313]** На **фиг. 259** показаны результаты SEC-анализа AB0192 после воздействия стрессового условия, представляющего собой принудительное окисление, по сравнению с контролем, и при этом продемонстрировано отсутствие значительного снижения содержания мономера.

**[0314]** На **фиг. 260** показаны результаты анализа CE-SDS для AB0192 после принудительного окисления по сравнению с контролем, и при этом продемонстрировано, что чистота оставалась высокой.

**[0315]** На **фиг. 261** показано, что AB0192 является стабильным после воздействия окислительного стресса (pH 5,0, 40°C, 14 дней): эффект в отношении связывания CLEC12A, NKG2D или CD16a отсутствует. Незначительные различия в максимальном сигнале связывания отражают различия в уровнях захвата.

**[0316]** На **фиг. 262** показано, что активность AB0192 после принудительного окисления в анализе KHYG-1-CD16a-опосредованной цитотоксичности была аналогична контрольному образцу.

**[0317]** На **фиг. 263** показаны результаты SEC-анализа AB0192 после длительного воздействия низкого уровня pH (pH 5,0, 40°C, 14 дней), и при этом продемонстрировано отсутствие снижения содержания мономера.

**[0318]** На **фиг. 264** показаны результаты анализа CE-SDS для AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 14 дней), и при этом продемонстрировано, что различия в чистоте, выявленные с использованием невосстанавливающих и восстанавливающих условий при CE-SDS, составляли менее чем 1%. Невосстанавливающие условия показаны на левой панели. Восстанавливающие условия показаны на правой панели.

**[0319]** На **фиг. 265** показано, что AB0192 является стабильным после воздействия низкого уровня pH (pH 5,0, 40°C, 14 дней): эффект в отношении связывания CLEC12A, NKG2D или CD16a отсутствует.

**[0320]** На **фиг. 266** показаны результаты анализа заряда для AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 14 дней), выполненного посредством cIEF, при этом не наблюдались какие-либо различия между контрольными образцами и образцами, подвергнутыми воздействию стрессового условия, предусматривающего pH 5.

**[0321]** На **фиг. 267** показано, что активность AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, предусматривающего pH 5,0, не изменялась по сравнению с контролем в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16a.

**[0322]** На **фиг. 268** показаны результаты SEC-анализа AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8,0, 40°C, 14 дней), которые продемонстрировали, что имело место снижение содержания мономера на 1,6%.

**[0323]** На **фиг. 269** показаны результаты анализа CE-SDS для AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8,0, 40°C, 14 дней). Незначительные различия в чистоте были выявлены в невосстанавливающих (слева) и восстанавливающих (справа) условиях.

**[0324]** На **фиг. 270** показано, что AB0192 является стабильным после воздействия высокого уровня pH: эффект в отношении связывания CLEC12A, NKG2D или CD16a отсутствует.

**[0325]** На **фиг. 271** показаны результаты анализа заряда для AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8,0, 40°C, 14 дней), выполненного посредством cIEF, с кислотным сдвигом в

образце, подвергнутом воздействию стрессового условия, предусматривающего pH 8, по сравнению с контрольным образцом.

**[0326]** На **фиг. 272** показано, что активность AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH 8,0, не затрагивалась в значительной степени, как было оценено посредством анализа цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV.

**[0327]** На **фиг. 273** показаны результаты SEC-анализа AB0192 после 6 циклов замораживания/оттаивания по сравнению с контролем, который продемонстрировал отсутствие снижения содержания мономера.

**[0328]** На **фиг. 274** показаны результаты анализа CE-SDS для AB0192 после воздействия стрессового условия, представляющего собой замораживание-оттаивание, которые продемонстрировали отсутствие потерь в отношении чистоты либо в восстанавливающих (правая панель), либо в невосстанавливающих (левая панель) условиях.

**[0329]** На **фиг. 275** показаны результаты SEC-анализа AB0192 после воздействия стрессового условия, представляющего собой перемешивание, по сравнению с контролем, которые продемонстрировали отсутствие снижения содержания мономера.

**[0330]** На **фиг. 276** показаны результаты анализа CE-SDS для AB0192 после воздействия стрессового условия, представляющего собой перемешивание, по сравнению с контролем, которые продемонстрировали отсутствие увеличения фрагментации, выявленное в восстанавливающих (правая панель) или невосстанавливающих (левая панель) условиях.

**[0331]** На **фиг. 277** показаны результаты SEC-анализа образца с выдерживанием при определенном уровне pH по сравнению с контролем, которые продемонстрировали, что не наблюдалось каких-либо изменений в профиле после выдерживания при низком уровне pH.

**[0332]** На **фиг. 278** показаны результаты анализа cIEF для AB0192 после выдерживания при низком уровне pH по сравнению с контролем, которые продемонстрировали, что выдерживание при низком уровне pH не оказало поддающегося измерению эффекта в отношении профиля зарядов AB0192.

**[0333]** На **фиг. 279** показано, что AB0192 является стабильным после выдерживания при низком уровне pH: эффект в отношении связывания CLEC12A, NKG2D или CD16a отсутствует. Незначительные различия в максимальном сигнале связывания отражают различия в уровнях захвата.

**[0334]** На **фиг. 280** показана активность AB0192 после выдерживания при низком уровне pH в анализе KHYG1-CD16a-опосредованной цитотоксичности, который продемонстрировал, что активность AB0192 не изменялась после стадии выдерживания при низком уровне pH.

**[0335]** На **фиг. 281** показано связывание AB0089 с hCLEC12A до и после выдерживания при низком уровне pH. Небольшие различия в абсолютных максимальных сигналах отражают различие в уровнях захвата AB0089.

**[0336]** На **фиг. 282** показано, что AB0089 является стабильным после выдерживания при низком уровне pH. Какого-либо различия между значениями активности в случае выдерживания при низком уровне pH и контрольными образцами не наблюдалось.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

**[0337]** В настоящей заявке предусмотрены мультиспецифические связывающие белки, которые связывают рецептор NKG2D и рецептор CD16 на естественных киллерных клетках, и опухолеассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки дополнительно содержат дополнительный антигенсвязывающий участок, который связывает опухолеассоциированный антиген. В настоящей заявке также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие такие мультиспецифические связывающие белки, и терапевтические способы с применением таких мультиспецифических белков и фармацевтических композиций для таких целей, как лечение аутоиммунных заболеваний и рака. Различные аспекты мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, изложены в нижеследующих разделах; однако аспекты мультиспецифических связывающих белков, описанные в одном конкретном разделе, не подлежат ограничению каким-либо конкретным разделом.

**[0338]** Для облегчения понимания настоящей заявки ниже определен ряд терминов и фраз.

**[0339]** Используемые в данном документе термины в единственном числе означают "один или несколько" и включают их формы во множественном числе, если контекст не является неподходящим.

**[0340]** Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий участок" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. В человеческих антителах антигенсвязывающий участок образован аминокислотными остатками N-концевых вариабельных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три существенно различающихся отрезка в пределах V-областей тяжелой и легкой цепей называются "гипервариабельными областями", которые расположены между более

консервативными фланкирующими отрезками, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые естественным образом обнаруживаются между гипервариабельными областями в иммуноглобулинах, а также прилегают к ним. В молекуле человеческого антитела три гипервариабельных области легкой цепи и три гипервариабельных области тяжелой цепи расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связанного антигена, а три гипервариабельные области каждой из тяжелой и легкой цепей называются "определяющими комплементарность областями" или "CDR". У определенных животных, таких как верблюды и хрящевые рыбы, антигенсвязывающий участок образован одной цепью антитела, обеспечивающей образование "однодоменного антитела". Антигенсвязывающие участки могут находиться в интактном антителе, в антигенсвязывающем фрагменте антитела, который сохраняет антигенсвязывающую поверхность, или в рекомбинантном полипептиде, таком как scFv, предусматривающем использование пептидного линкера для соединения вариабельного домена тяжелой цепи с вариабельный доменом легкой цепи в одном полипептиде.

**[0341]** Термин "опухолеассоциированный антиген", используемый в данном документе, означает любой антиген, включая 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, во внеклеточном матриксе, мезенхимальной строме или иммунных инфильтратах. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения термин "опухолеассоциированный антиген" относится к CLEC12A.

**[0342]** Используемые в данном документе термины "субъект" и "пациент" относятся к организму, подлежащему лечению посредством способов и композиций, описанных в данном документе. Такие организмы предпочтительно включают без ограничения млекопитающих (например, представителей мышиных, обезьянообразных, лошадиных, бычьих, свинообразных, псовых, кошачьих и т. п.) и более предпочтительно включают людей.

**[0343]** Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству соединения (например, соединения согласно настоящей заявке), достаточному для достижения полезных или требуемых результатов. Эффективное количество можно вводить за одну или несколько процедур введения, процедур применения или доз, и при этом не предусматривается, что оно ограничено конкретным

составом или путем введения. Используемый в данном документе термин "лечение" включает любой эффект, например, ослабление, уменьшение, модулирование, снижение выраженности или устранение, который в результате приводит к улучшению в отношении течения состояния, заболевания, нарушения и т. п. или снижению выраженности его симптома.

**[0344]** Используемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к комбинации активного средства с носителем, являющимся инертным или активным, который делает композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

**[0345]** Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, таких как забуференный фосфатом солевой раствор, вода, эмульсии (например, такие как эмульсии по типу масло/вода или по типу вода/масло) и различные типы смачивающих средств. Композиции также могут содержать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и вспомогательных средств см., например, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

**[0346]** Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к любой фармацевтически приемлемой соли (например, кислоты или основания) соединения, описанного в настоящей заявке, которая при введении субъекту способна обеспечивать образование соединения, описанного в данной заявке, или его активного метаболита или остатка. Как известно специалистам в данной области техники, "соли" соединений, описанных в настоящей заявке, могут быть получены из неорганических или органических кислот и оснований. Иллюстративные кислоты включают 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 и не являются фармацевтически приемлемыми, могут применяться в получении солей, применимых в качестве промежуточных соединений при получении соединений, описанных в настоящей заявке, и их фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты.

**[0347]** Иллюстративные основания включают 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.

**[0348]** Иллюстративные соли включают без ограничения ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, флюкогептаноат, 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, тозилат, ундеканоат и т. п. Другие примеры солей включают анионы соединений, описанных в настоящей заявке, составленные с подходящим катионом, таким как $Na^+$, $NH_4^+$ и $NW_4^+$ (где W представляет собой $C_{1-4}$алкильную группу) и т. п.

**[0349]** Применительно к терапевтическому применению соли соединений, описанных в настоящей заявке, рассматриваются как фармацевтически приемлемые. Однако соли кислот и оснований, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут находить применение, например, в получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения.

**[0350]** Как используется в данном документе, CLEC12A (также известный как CLL-1, DCAL-2, MICL и CD371) относится к белку под номером доступа в Uniprot Q5QGZ9 и его родственным изоформам и ортологам.

**[0351]** На протяжении всего описания, когда композиции описываются как имеющие, содержащие или предусматривающие конкретные компоненты, или когда процедуры и способы описываются как имеющие, включающие или предусматривающие конкретные стадии, предполагается, что дополнительно предусматриваются композиции, описанные в настоящей заявке, которые состоят по существу из или состоят из перечисленных компонентов, а также что предусматриваются процедуры и способы в соответствии с настоящей заявкой, которые состоят по существу из или состоят из указанных стадий обработки.

**[0352]** Как правило, процентное содержание в случае композиций, для которых оно указывается, приводится по весу, если конкретно не указано иное. Кроме того, если переменная не сопровождается определением, то приоритет отдается предыдущему определению переменной.

| **Аббревиатура** | **Условное обозначение** |
|---|---|
| A49M-I | Клон человеческого антитела к NKG2D A49M-I |
| ADCC | Антителозависимая клеточная цитотоксичность |
| ADCP | Антителозависимый клеточный фагоцитоз |

| Аббревиатура | Условное обозначение |
|---|---|
| AML | Острый миелоидный лейкоз |
| BM | Обратная мутация (мышиные остатки, введенные в последовательность человеческого mAb) |
| cCLEC12A | CLEC12A яванского макака |
| CD16 | Низкоаффинный рецептор к Fc-области гамма-иммуноглобулина, изоформа III-A |
| CD16a | Fc-гамма рецептор III |
| CDC | Комплементзависимая цитотоксичность |
| CDR | Определяющая комплементарность область |
| CFSE | Сложный сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина |
| CHO | Яичник китайского хомячка |
| cIEF | Капиллярное изоэлектрическое фокусирование |
| CIEX | Катионная ионообменная хроматография |
| CLEC12A | Член A семейства 12 лектиновых доменов C-типа |
| CLEC12A | Член A семейства 12 лектиновых доменов C-типа, основной вариант с K244, также известный как CLEC12A (K244) или CLEC12A WT |
| CLEC12AL | CLEC12A-лиганд |
| CMP | Общий миелоидный предшественник |
| ConA | Конканавалин A |
| CST | 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0 |
| DI-вода | Дистиллированная вода |
| DSC | Дифференциальная сканирующая калориметрия |
| EC50 | Эффективная концентрация, которая обеспечивает полумаксимальный ответ |
| Fab | Антигенсвязывающий фрагмент |
| FACS | Сортировка флуоресцентно-активированных клеток |
| Fc | Кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина |
| FcγR | Fc-гамма рецептор |
| GMP | Гранулоцитарно-макрофагальный предшественник |
| HBS | Забуференный Hepes солевой раствор |

| Аббревиатура | Условное обозначение |
|---|---|
| hcFAE-A49.CLL1-Merus | Duobody TriNKET на основе антитела к CLL1 от Merus |
| hcFAE-A49.h6E7 | Duobody TriNKET на основе антитела h6E7 от Genentech |
| hcFAE-A49.Теподитамаб | Duobody TriNKET на основе CLEC12A-связывающего плеча теподитамаба от Merus |
| hCLEC12A | CLEC12A человека |
| HCT | Перенос гемопоэтических клеток |
| HI-FBS | Эмбриональная бычья сыворотка, инактивированная нагреванием |
| HMWS | Высокомолекулярные фракции |
| HPLC | Высокоэффективная жидкостная хроматография |
| HST | 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,01% полисорбата 80 |
| HTFR | Гомогенная флуоресценция с временным разрешением |
| IgG1 | Иммуноглобулин изотипа G1 |
| ITIM | Иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина |
| $k_a$ | Константа скорости ассоциации |
| $K_D$ | Равновесная константа диссоциации |
| $k_d$ | Константа скорости диссоциации |
| LC | Жидкостная хроматография |
| LMWS | Низкомолекулярные фракции |
| LSC | Лейкозные стволовые клетки |
| mAb | Моноклональное антитело |
| MEP | Предшественник эритроцитов и мегакариоцитов |
| MFI | Медианная интенсивность флуоресценции |
| MHC | Главный комплекс гистосовместимости |
| MIC-A | Белок А, родственный цепи MHC класса I |
| MS | Масс-спектрометрия |
| MS/MS | Тандемная масс-спектрометрия |
| MSU | Мононатрия урат |
| NK-клетка | Естественная киллерная клетка |
| NKG2D | Интегральный мембранный белок NKG2-D типа II |
| PBS | Забуференный фосфатом солевой раствор |

| Аббревиатура | Условное обозначение |
|---|---|
| PBSF | Забуференный фосфатом солевой раствор (0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA)) |
| pI | Изоэлектрическая точка |
| PI3K | Фосфатидилинозитол-3'-киназа |
| PMT | Фотоэлектронный умножитель |
| PS-80 | Полисорбат-80, Tween-80 |
| PSR | Полиспецифический реагент |
| RU | Резонансные единицы, количественный показатель массы, регистрируемый посредством SPR |
| ScFv | Одноцепочечный вариабельный фрагмент |
| SDS-CE | Капиллярный электрофорез с использованием додецилсульфата натрия |
| SEC | Эксклюзионная хроматография |
| SH2 | Домен гомологии Src 2 |
| SHP1 | Фосфатаза-1, содержащая домен области гомологии Src 2 |
| SHP2 | Фосфатаза-2, содержащая домен области гомологии Src 2 |
| SPR | Поверхностный плазмонный резонанс |
| TAA | Опухолеассоциированный антиген |
| TriNKET | Триспецифическое терапевтическое средство, привлекающее естественные киллерные клетки |
| UHPLC | Ультравысокоэффективная жидкостная хроматография |
| WT | Дикого типа |

## I. Белки

**[0353]** В настоящей заявке предусмотрены мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных киллерных клетках, а также с CLEC12A. Мультиспецифические связывающие белки являются применимыми в фармацевтических композициях и терапевтических способах, описанных в данном документе. Связывание мультиспецифических связывающих белков с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественной клетке-киллере усиливает активность естественной киллерной клетки в отношении разрушения опухолевых клеток, экспрессирующих опухолевый антиген. Связывание мультиспецифических связывающих белков с опухолевыми клетками, экспрессирующими опухолевый антиген, обеспечивает

приведение этих клеток в непосредственную близость с естественной киллерной клеткой, что способствует непосредственному и опосредованному разрушению опухолевых клеток естественной киллерной клеткой. Мультиспецифические связывающие белки, которые связывают NKG2D, CD16 и другую мишень, раскрыты в публикациях международных заявок №№ WO 2018148445 и WO 2019157366, которые не включены в данный документ посредством ссылки. Дальнейшее описание некоторых иллюстративных мультиспецифических связывающих белков представлено ниже.

**[0354]** Первый компонент мультиспецифического связывающего белка представляет собой антигенсвязывающий участок, который связывается с клетками, экспрессирующими рецептор NKG2D, которые могут включать 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.

**[0355]** Второй компонент мультиспецифических связывающих белков представляет собой антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, опухолеассоциированный антиген. Клетки, экспрессирующие опухолеассоциированный антиген, могут быть обнаружены, например, при показаниях, относящихся к солидным опухолям, таким как рак желудочно-кишечного тракта, рак пищевода, рак легкого, рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), колоректальный рак, рак яичника, рак пищевода, рак матки, рак шейки матки, рак головы и шеи, глиома и рак поджелудочной железы, или при определенных гематологических злокачественных образованиях, таких как острый миелоидный лейкоз.

**[0356]** Третьим компонентом мультиспецифических связывающих белков является Fc-домен антитела или его часть или антигенсвязывающий участок, который связывается с клетками, экспрессирующими CD16, представляющий собой Fc-рецептор на поверхности лейкоцитов, включая естественные киллерные клетки, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки.

**[0357]** Дополнительный антигенсвязывающий участок мультиспецифических связывающих белков может связывать тот же опухолеассоциированный антиген. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, а каждый из второго и дополнительного антигенсвязывающих участков, которые связывают опухолеассоциированный антиген, представляют собой Fab-фрагмент. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, а каждый из второго и дополнительного антигенсвязывающих участков, которые связывают

опухолеассоциированный антиген, представляет собой scFv. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой Fab-фрагмент, а каждый из второго и дополнительного антигенсвязывающих участков, которые связывают опухолеассоциированный антиген, представляет собой scFv. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой Fab, а каждый из второго и дополнительного антигенсвязывающих участков, которые связывают опухолеассоциированный антиген, представляют собой Fab-фрагмент.

**[0358]** Каждый из антигенсвязывающих участков может включать вариабельный домен тяжелой цепи антитела и вариабельный домен легкой цепи антитела (например, расположенные таким же образом, как и в антителе, или слитые вместе с образованием scFv), или один или несколько из антигенсвязывающих участков могут представлять собой однодоменное антитело, такое как антитело $V_HH$, как например антитело верблюдовых, или антитело $V_{NAR}$, как например те, которые обнаружены у хрящевых рыб.

**[0359]** В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок включает вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности вариабельного домена легкой цепи, присутствующего в первом антигенсвязывающем участке.

**[0360]** Мультиспецифические связывающие белки, описанные в данном документе, могут принимать различные форматы. Например, один формат представляет собой гетеродимерное мультиспецифическое антитело, содержащее первую тяжелую цепь иммуноглобулина, первую легкую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и вторую легкую цепь иммуноглобулина (**фиг. 1**). Первая тяжелая цепь иммуноглобулина содержит первый Fc-домен (шарнирный_участок-CH2-CH3), первый вариабельный домен тяжелой цепи и необязательно первый домен тяжелой цепи CH1. Первая легкая цепь иммуноглобулина содержит первый вариабельный домен легкой цепи и необязательно первый константный домен легкой цепи. Первая легкая цепь иммуноглобулина вместе с первой тяжелой цепью иммуноглобулина образуют антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина содержит второй Fc-домен (шарнирный_участок-CH2-CH3), второй вариабельный домен тяжелой цепи и необязательно второй домен тяжелой цепи CH1. Вторая легкая цепь иммуноглобулина содержит второй вариабельный домен легкой цепи и необязательно второй константный домен легкой цепи. Вторая легкая цепь иммуноглобулина вместе со второй тяжелой цепью иммуноглобулина образуют антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A. В некоторых вариантах

осуществления 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.

**[0361]** Другой иллюстративный формат включает гетеродимерное мультиспецифическое антитело, содержащее первую тяжелую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина (например, **фиг. 2A**). В некоторых вариантах осуществления первая тяжелая цепь иммуноглобулина содержит первый Fc-домен (шарнирный_участок-CH2-CH3), слитый посредством либо линкера, либо шарнирного участка антитела с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), состоящим из вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, которые образуют пару и связывают NKG2D или связывают CLEC12A. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина содержит второй Fc-домен (шарнирный_участок-CH2-CH3), второй вариабельный домен тяжелой цепи и домен тяжелой цепи CH1. Легкая цепь иммуноглобулина содержит вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления вторая тяжелая цепь иммуноглобулина образует пару с легкой цепью иммуноглобулина и связывается с NKG2D или связывает опухолеассоциированный антиген при условии, что в случае если первый Fc-домен слит с scFv, который связывает NKG2D, вторая тяжелая цепь иммуноглобулина, объединенная в пару с легкой цепью иммуноглобулина, связывает опухолеассоциированный антиген, но не NKG2D, и наоборот. В некоторых вариантах осуществления scFv в первой тяжелой цепи иммуноглобулина связывает CLEC12A; и вариабельный домен тяжелой цепи во второй тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельный домен легкой цепи в легкой цепи иммуноглобулина при объединении в пару связывают NKG2D (например, **фиг. 2E**). В некоторых вариантах осуществления scFv в первой тяжелой цепи иммуноглобулина связывает NKG2D; и вариабельный домен тяжелой цепи во второй тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельный домен легкой цепи в легкой цепи иммуноглобулина при объединении в пару связывают CLEC12A. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе способны связываться с CD16 (например, **фиг. 2A**).

**[0362]** Другой иллюстративный формат включает гетеродимерное мультиспецифическое антитело, содержащее первую тяжелую цепь иммуноглобулина и вторую тяжелую цепь иммуноглобулина (например, **фиг. 2B**). В некоторых вариантах осуществления первая тяжелая цепь иммуноглобулина содержит первый Fc-домен (шарнирный_участок-CH2-CH3), слитый посредством либо линкера, либо шарнирного участка антитела с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), состоящим из

вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, которые образуют пару и связывают NKG2D или связывают CLEC12A. В некоторых вариантах осуществления вторая тяжелая цепь иммуноглобулина содержит второй Fc-домен (шарнирный_участок-CH2-CH3), слитый посредством либо линкера, либо шарнирного участка антитела с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), состоящим из вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, которые образуют пару и связывают NKG2D или связывают опухолеассоциированный антиген при условии, что в случае если первый Fc-домен слит с scFv, который связывает NKG2D, второй Fc-домен, слитый с scFv, связывает опухолеассоциированный антиген, но не NKG2D, и наоборот. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе способны связываться с CD16 (например, **фиг. 2B**).

**[0363]** В некоторых вариантах осуществления вышеописанный одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) связан с константным доменом антитела посредством шарнирной последовательности. В некоторых вариантах осуществления шарнирный участок содержит аминокислоты Ala-Ser или Gly-Ser. В некоторых вариантах осуществления шарнирный участок соединяет scFv, который связывает NKG2D, и константный домен тяжелой цепи антитела содержит аминокислоты Ala-Ser. В некоторых вариантах осуществления шарнирный участок соединяет scFv, который связывает опухолеассоциированный антиген, и константный домен тяжелой цепи антитела содержит аминокислоты Gly-Ser. В некоторых других вариантах осуществления шарнирный участок содержит аминокислоты Ala-Ser и Thr-Lys-Gly. Шарнирная последовательность может обеспечивать гибкость связывания с антигеном-мишенью и баланс между гибкостью и оптимальной геометрией.

**[0364]** В некоторых вариантах осуществления вышеописанный одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) 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 с повышением 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 согласно Kabat. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи связан с вариабельным доменом легкой цепи посредством гибкого линкера. Можно применять любой подходящий линкер, например, линкер $(G_4S)_4$ ($(GlyGlyGlyGlySer)_4$ (SEQ ID NO:119)). 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 С-конце вариабельного домена легкой цепи.

**[0365]** Мультиспецифические связывающие белки, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных антигенсвязывающих участков. Дополнительный(-ые) антигенсвязывающий(-ие) участок(-ки) может(-гут) быть слит(-ы) с N-концом домена CH2 константной области или с С-концом домена CH3 константной области необязательно посредством линкерной последовательности. В определенных вариантах осуществления дополнительный(-ые) антигенсвязывающий(-ие) участок(-ки) принимает(-ют) форму одноцепочечной вариабельной области (scFv), которая необязательно стабилизирована дисульфидными связями, что приводит в результате к образованию четырехвалентного или трехвалентного мультиспецифического связывающего белка. Например, мультиспецифический связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, дополнительный антигенсвязывающий участок, который связывает опухолеассоциированный антиген, и константную область антитела или ее часть, достаточные для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий участок, который связывает CD16. Любой из этих антигенсвязывающих участков может принимать форму либо Fab-фрагмента, либо scFv, такого как scFv, описанный выше.

**[0366]** В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий участок связывает эпитоп опухолеассоциированного антигена, отличный от связываемого вторым антигенсвязывающим участком. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий участок связывает тот же эпитоп, что и второй антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий участок содержит те же последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, что и второй антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий участок содержит те же последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и легкой цепи, что и второй антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий участок имеет ту(-е) же аминокислотную(-ые) последовательность(-и), что и второй антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий участок содержит последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и легкой цепи, которые отличаются от последовательностей вариабельных доменов тяжелой цепи и легкой цепи второго антигенсвязывающего участка. В некоторых вариантах осуществления дополнительный

антигенсвязывающий участок имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности второго антигенсвязывающего участка. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок и дополнительный антигенсвязывающий участок связывают разные опухолеассоциированные антигены. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок и дополнительный антигенсвязывающий участок связывают разные антигены. Иллюстративные форматы показаны на **фиг. 2C** и **фиг. 2D**. Соответственно, мультиспецифические связывающие белки могут обеспечивать вовлечение опухолеассоциированного антигена в двухвалентное взаимодействие. Вовлечение опухолеассоциированного антигена в двухвалентное взаимодействие с мультиспецифическими белками может стабилизировать опухолеассоциированный антиген на поверхности опухолевых клеток и усиливать цитотоксичность NK-клеток по отношению к опухолевым клеткам. Вовлечение опухолеассоциированного антигена в двухвалентное взаимодействие с мультиспецифическими белками может обеспечивать более сильное связывание мультиспецифических белков с опухолевыми клетками, способствуя тем самым более сильному цитотоксическому ответу NK-клеток на опухолевые клетки, особенно на опухолевые клетки, экспрессирующие опухолеассоциированный антиген на низком уровне.

**[0367]** Мультиспецифические связывающие белки могут принимать дополнительные форматы. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации Triomab, которое представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, сохраняющее IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух половинных антител, каждое из которых характеризуется одной легкой и одной тяжелой цепями, которые происходят от двух родительских антител.

**[0368]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации KiH, в которой применяется технология "выступы во впадины" (KiH). KiH предусматривает конструирование доменов $C_H3$ с созданием либо "выступа", либо "впадины" в каждой тяжелой цепи для способствования гетеродимеризации. Концепция, на которой основывается Fc-технология "выступы во впадины (KiH)", заключалась во введении "выступа" в один домен CH3 (CH3A) путем замены небольшого остатка на более крупный остаток (например, $T366W_{CH3A}$ по нумерации EU). Для размещения "выступа" на другом домене CH3 (CH3B) была создана комплементарная поверхность в виде "впадины" путем замены ближайших к выступу соседних остатков на более мелкие (например, $T366S/L368A/Y407V_{CH3B}$). Мутация, обеспечивающая образование "впадины", была оптимизирована с использованием

структурно-управляемого скрининга фаговой библиотеки (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 Fc-вариантов 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 гетеродимеризация является термодинамически благоприятной за счет гидрофобных взаимодействий, обусловленных стерической комплементарностью в основной области контакта между доменами CH3, тогда как области контакта выступ-выступ и впадина-впадина не способствуют гомодимеризации ввиду стерических препятствий и нарушения благоприятных взаимодействий соответственно.

**[0369]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации иммуноглобулина с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig™), в котором объединены мишень-связывающие домены двух моноклональных антител посредством встречающихся в природе гибких линкеров, и за счет этого обеспечивается получение четырехвалентной IgG-подобной молекулы.

**[0370]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации Fab с ортогональной областью контакта (орто-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) основанный на структуре региональный дизайн предусматривает введение комплементарных мутаций в область контакта LC и $HC_{VH\text{-}CH1}$ только в одном Fab-фрагменте, без внесения каких-либо изменений в другой Fab-фрагмент.

**[0371]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в формате Ig 2-в-1. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации ES, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два разных Fab-фрагмента, связывающихся с мишенями 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями, обеспечивающими электростатическое координирование, в Fc.

**[0372]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации кλ-тела, которое представляет собой гетеродимерную конструкцию с двумя разными Fab-фрагментами, слитыми с Fc, стабилизированным мутациями, способствующими гетеродимеризации: Fab-фрагмент 1, нацеливающийся на антиген 1, содержит каппа-LC, и Fab-фрагмент 2, нацеливающийся на антиген 2, содержит лямбда-LC. На **фиг. 13A** приведено иллюстративное представление одной конфигурации кλ-тела; на **фиг. 13B** приведено иллюстративное представление другого кλ-тела.

**[0373]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации Fab, предусматривающего обмен плечами (антитела, которые обмениваются плечами Fab-фрагмента путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (полумолекула) парой, представленной тяжелой-легкой цепями из другой молекулы, что приводит в результате к получению биспецифических антител).

**[0374]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации SEED-тела. Платформа на основе домена, сконструированного путем обмена между цепями (SEED), была разработана для создания асимметричных и биспецифических антителоподобных молекул, что обеспечило возможность расширения терапевтических областей применения природных антител. Эта платформа для белковой инженерии основана на обмене структурно родственными последовательностями иммуноглобулина в пределах консервативных доменов CH3. Дизайн SEED обеспечивает возможность эффективно создавать гетеродимеры AG/GA, в то же время препятствуя гомодимеризации доменов CH3 SEED AG и GA. (Muda M. *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* (2011, 24(5):447-54)).

**[0375]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации LuZ-Y, в которой используется лейциновая застежка для индукции гетеродимеризации двух разных HC. (Wranik, BJ. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2012), 287:43331-9).

**[0376]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации Cov-X-тела. В биспецифических CovX-телах два разных пептида соединены вместе с использованием разветвленного азетидинонового линкера и слиты с каркасным антителом при мягких условиях сайт-специфическим образом. В то время как фармакофоры отвечают за виды функциональной активности, каркас антитела обеспечивает длительный период полужизни и Ig-подобное распределение. Фармакофоры могут быть химически оптимизированы или заменены

другими фармакофорами с получением оптимизированных или уникальных биспецифических антител. (Doppalapudi VR *et al.*, *PNAS* (2010), 107(52);22611-22616).

**[0377]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в гетеродимерной конфигурации Oasc-Fab, которая предусматривает Fab-фрагмент, связывающийся с мишенью 1, и scFab, связывающийся с мишенью 2, слитые с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

**[0378]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации DuetMab, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два разных Fab-фрагмента, связывающихся с антигенами 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями, способствующими гетеродимеризации. Fab-фрагменты 1 и 2 содержат дифференциальные мостики S-S, которые обеспечивают корректное спаривание LC и HC.

**[0379]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации 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 подвергнуты обмену местами, например, CH1 слит в одной рамке считывания с VL, а CL слит в одной рамке считывания с VH.

**[0380]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представлен в конфигурации 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.

**[0381]** Отдельные компоненты мультиспецифических связывающих белков более подробно описаны ниже.

***NKG2D-связывающий участок***

**[0382]** При связывании с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных киллерных клетках, а также с CLEC12A мультиспецифические связывающие белки могут вовлекать во взаимодействие более чем один тип NK-активирующего рецептора и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В определенных вариантах осуществления белки могут оказывать агонистическое действие на NK-клетки у людей. В некоторых вариантах осуществления белки могут оказывать агонистическое действие на NK-клетки у людей и у других видов, таких как грызуны и яванские макаки. В некоторых вариантах осуществления белки могут оказывать агонистическое действие на NK-клетки у людей и у других видов, таких как яванские макаки.

**[0383]** 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 расположены в формате Fab. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи слиты друг с другом с образованием scFv.

**[0384]** NKG2D-связывающие участки, перечисленные в таблице 1, могут различаться по своей аффинности связывания с NKG2D, при этом, несмотря на это, все они активируют NK-клетки человека.

**[0385]** Если не указано иное, последовательности CDR, представленные в таблице 1, определены по системе нумерации согласно Kabat.

**Таблица 1**

| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
|---|---|---|
| ADI-27705 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) CDR1 (SEQ ID NO:2) – GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO:3) – EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:4) – ARARGPWSFDP | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:5) |
| ADI-27724 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGGGTKVEIK |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | (SEQ ID NO:1) | (SEQ ID NO:6) |
| ADI-27740 (A40) | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYHSFYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7) |
| ADI-27741 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQSNSYYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8) |
| ADI-27743 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYNSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9) |
| ADI-28153 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWGFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:10) | ELQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRTSQSISSYLNWYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDSATYY CQQSYDIPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:11) |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| ADI-28226 (C26) | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYGSFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:12) |
| ADI-28154 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPDDFATY YCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:13) |
| ADI-29399 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYNSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:14) |
| ADI-29401 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:15) |
| ADI-29403 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:16) |
| ADI-29405 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:17) |
| ADI-29407 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYQSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:18) |
| ADI-29419 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYSSFSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:19) |
| ADI-29421 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | YCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) | SGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYESYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:20) |
| ADI-29424 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDSFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:21) |
| ADI-29425 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYQSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22) |
| ADI-29426 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:23) |
| ADI-29429 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYELYSYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:24) |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | (SEQ ID NO:1) | |
| ADI-29447 (F47) | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYDTFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:25) |
| ADI-27727 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCARGDSSIRHAYYYYGMDVW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:26) CDR1– GTFSSYAIS (не в соответствии с Kabat) (SEQ ID NO:27) или SYAIS (SEQ ID NO:28) CDR2 (SEQ ID NO:29) – GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 – ARGDSSIRHAYYYYGMDV (не в соответствии с Kabat) (SEQ ID NO:30) или GDSSIRHAYYYYGMDV (SEQ ID NO:31) | DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQQYYSTPITFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:32) CDR1 (SEQ ID NO:33) – KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:34) – WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:35) – QQYYSTPIT |
| ADI-29443 (F43) | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV SGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLE WIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY | EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSRYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSG |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | CARGSDRFHPYFDYWGQGTLVTVSS<br>(SEQ ID NO:36)<br>CDR1– GSISSSSYYWG (не в соответствии с Kabat) (SEQ ID NO:37) или SSSYYWG (SEQ ID NO:38)<br>CDR2 (SEQ ID NO:39) – SIYYSGSTYYNPSLKS<br>CDR3 – ARGSDRFHPYFDY (не в соответствии с Kabat) (SEQ ID NO:40) или GSDRFHPYFDY (SEQ ID NO:41) | SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFDTWPPTFGGGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:42)<br>CDR1 (SEQ ID NO:43) – RASQSVSRYLA<br>CDR2 (SEQ ID NO:44) – DASNRAT<br>CDR3 (SEQ ID NO:45) – QQFDTWPPT |
| ADI-29404 (F04) | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCEQYDSYPTFGGGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:46) |
| ADI-28200 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGRKASGSFYYYYGMDVWGQGTTVTVSS<br>(SEQ ID NO:47)<br>CDR1 (SEQ ID NO:27) – GTFSSYAIS<br>CDR2 (SEQ ID NO:29) – GIIPIFGTANYAQKFQG | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK<br>(SEQ ID NO:49)<br>CDR1 (SEQ ID NO:50) – ESSQSLLNSGNQKNYLT<br>CDR2 (SEQ ID NO:34) – WASTRES |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | CDR3 (SEQ ID NO:48) – ARRGRKASGSFYYYYGMDV | CDR3 (SEQ ID NO:51) – QNDYSYPYT |
| ADI-29379 (E79) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYYMHWVRQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGAPNYGDTTHDYYY MDVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:52) CDR1 (SEQ ID NO:53) – YTFTSYYMH (не в соответствии с Kabat) или SYYMH (SEQ ID NO:54) CDR2 (SEQ ID NO:55) – IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 – ARGAPNYGDTTHDYYYMDV (не в соответствии с Kabat) (SEQ ID NO:56) или GAPNYGDTTHDYYYMDV (SEQ ID NO:57) | EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQYDDWPFTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:58) CDR1 (SEQ ID NO:59) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:60) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:61) - QQYDDWPFT |
| ADI-29463 (F63) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTGYYMHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQKFQG RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARDTGEYYDTDDHGM DVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:62) CDR1 – YTFTGYYMH (не в соответствии с Kabat) (SEQ ID | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQDDYWPPTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:68) CDR1 (SEQ ID NO:59) - RASQSVSSNLA |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | NO:63) или GYYMH (SEQ ID NO:64)<br>CDR2 (SEQ ID NO:65) – WINPNSGGTNYAQKFQG<br>CDR3 – ARDTGEYYDTDDHGMDV (не в соответствии с Kabat) (SEQ ID NO:66) или DTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO:67) | CDR2 (SEQ ID NO:60) - GASTRAT<br>CDR3 (SEQ ID NO:69) - QQDDYWPPT |
| ADI-27744 (A44) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKDGGYYDSGAGDYWGQG TLVTVSS<br>(SEQ ID NO:70)<br>CDR1 – FTFSSYAMS (не в соответствии с Kabat) (SEQ ID NO:71) или SYAMS (SEQ ID NO:115)<br>CDR2 (SEQ ID NO:72) – AISGSGGSTYYADSVKG<br>CDR3 – AKDGGYYDSGAGDY (не в соответствии с Kabat) (SEQ ID NO:73) или DGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO:74) | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGIDSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSYPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:75)<br>CDR1 (SEQ ID NO:76) - RASQGIDSWLA<br>CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS<br>CDR3 (SEQ ID NO:78) - QQGVSYPRT |
| ADI-27749 (A49) | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAPMGAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:79) CDR1 – FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (не в соответствии с Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:81) CDR2 (SEQ ID NO:82) – SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 – ARGAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:83) (не в соответствии с Kabat) или GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:84) | SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSFPRT |
| | scFv (VL-VH) с Q44C в VH и G100C в VL, линкер выделен курсивом: DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSF PRTFGCGTKVEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSSYIY YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGA AAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:88) | |
| ADI-29378 (E78) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYYMHWVRQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREGAGFAYGMDYYY MDVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:89) CDR1 – YTFTSYYMH (SEQ ID NO:53) (не в соответствии с Kabat) или SYYMH (SEQ ID NO:54) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQSDNWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:92) CDR1 (SEQ ID NO:93) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:44) - DASNRAT |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | CDR2 (SEQ ID NO:55) – IINPSGGSTSYAQKFQG<br>CDR3 – AREGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:90) (не в соответствии с Kabat) или EGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:91) | CDR3 (SEQ ID NO:94) - QQSDNWPFT |
| A49MI | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAP**I**GAAAGWFDPWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:95)<br>CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (не в соответствии с Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:81)<br>CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82)<br>CDR3: ARGAP**I**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:96) (не в соответствии с Kabat) или GAP**I**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:97) | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85)<br>CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA<br>CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS<br>CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSFPRT |
| A49MQ | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAP**Q**GAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:98) | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85) |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (не в соответствии с Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:81)<br>CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82)<br>CDR3 – ARGAP**Q**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:99) (не в соответствии с Kabat) или GAP**Q**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:100) | CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA<br>CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS<br>CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSFPRT |
| A49ML | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAP**L**GAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS<br>(SEQ ID NO:101)<br>CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (не в соответствии с Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:81)<br>CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82)<br>CDR3 – ARGAP**L**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:102) (не в соответствии с Kabat) или GAP**L**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:103) | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85)<br>CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA<br>CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS<br>CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSFPRT |
| A49MF | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| | YYCARGAP**F**GAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:104) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (не в соответствии с Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:81) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82) CDR3 – ARGAP**F**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:105) (не в соответствии с Kabat) или GAP**F**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:106) | (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSFPRT |
| A49MV | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAP**V**GAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:107) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (не в соответствии с Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:81) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82) CDR3 – ARGAP**V**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:108) (не в соответствии с Kabat) или GAP**V**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:109) | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) – AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:87) – QQGVSFPRT |
| A49-консенсус | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| ная последовательность | WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**X**GAAAGWFDPWGQGTLVTVSS, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F (SEQ ID NO:110)<br>CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (не в соответствии с Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:81)<br>CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82)<br>CDR3 – ARGAP**X**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:111) (не в соответствии с Kabat) или GAP**X**GAAAGWFDP (SEQ ID NO:112), где X представляет собой M, L, I, V, Q или F | APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85)<br>CDR1 (SEQ ID NO:86) – RASQGISSWLA<br>CDR2 (SEQ ID NO:77) – AASSLQS<br>CDR3 (SEQ ID NO:87) – QQGVSFPRT |
| NKG2D-связывающая молекула, представленная в US 9273136 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:113) | QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLLPSGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:114) |
| NKG2D-связывающая молекула, представл | QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSANYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV |

| Таблица 1 | | |
|---|---|---|
| **Клоны** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи** | **Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи** |
| енная в US 78799 85 | ANWDDAFNIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:116) | YYCQQYGSSPWTFGQGTKVEI K (SEQ ID NO:117) |

**[0386]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D (например, NKG2D человека), содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH), который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную VH антитела, раскрытого в таблице 1, и вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную VL того же антитела, раскрытого в таблице 1. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, определенные согласно Kabat (см. Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Chothia (см., например, Chothia C & Lesk A M, (1987), J. Mol. Biol. 196: 901-917), MacCallum (см. MacCallum R M *et al.*, (1996) J. Mol. Biol. 262: 732-745) или любому другому известному из уровня техники способу определения CDR последовательностей VH и VL антитела, раскрытых в таблице 1. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, раскрытого в таблице 1.

**[0387]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, полученный из SEQ ID NO:1, такой как имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:1, и/или содержащий аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:2), CDR2 (SEQ ID NO:3) и CDR3 (SEQ ID NO:4) из SEQ ID NO:1. Вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:1, может быть соединен с рядом различных вариабельных доменов легкой цепи с образованием NKG2D-связывающего участка. Например, первый антигенсвязывающий участок, который включает вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:1, может дополнительно включать вариабельный домен легкой цепи, выбранный из последовательностей, полученных из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 и 46. Например, первый антигенсвязывающий участок включает вариабельный домен тяжелой цепи с аминокислотными последовательностями, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичными SEQ ID NO:1, и вариабельный домен легкой цепи с аминокислотными последовательностями, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичными любой из последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 и 46.

**[0388]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:26, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:32. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 27 или 28, 29 и 30 или 31 соответственно (например, SEQ ID NO: 27, 29 и 30 соответственно или SEQ ID NO: 28, 29 и 31 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1,

CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 27 или 28, 29 и 30 или 31 соответственно (например, SEQ ID NO: 27, 29 и 30 соответственно или SEQ ID NO: 28, 29 и 31 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно.

**[0389]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:36, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:42. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 37 или 38, 39 и 40 или 41 соответственно (например, SEQ ID NO: 37, 39 и 40 соответственно или SEQ ID NO: 38, 39 и 41 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 43, 44 и 45 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 37 или 38, 39 и 40 или 41 соответственно (например, SEQ ID NO: 37, 39 и 40 соответственно или SEQ ID NO: 38, 39 и 41 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 43, 44 и 45 соответственно.

**[0390]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:47, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%

(например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:49. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 27, 29 и 48 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 50, 34 и 51 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 27, 29 и 48 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 50, 34 и 51 соответственно.

**[0391]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:52, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:58. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 53 или 54, 55 и 56 или 57 соответственно (например, SEQ ID NO: 53, 55 и 56 соответственно или SEQ ID NO: 54, 55 и 57 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 59, 60 и 61 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 53 или 54, 55 и 56 или 57 соответственно (например, SEQ ID NO: 53, 55 и 56 соответственно или SEQ ID NO: 54, 55 и 57 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 59, 60 и 61 соответственно.

**[0392]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную

последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:62, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:68. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 63 или 64, 65 и 66 или 67 соответственно (например, SEQ ID NO: 63, 65 и 66 соответственно или SEQ ID NO: 64, 65 и 67 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 59, 60 и 69 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 63 или 64, 65 и 66 или 67 соответственно (например, SEQ ID NO: 63, 65 и 66 соответственно или SEQ ID NO: 64, 65 и 67 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 59, 60 и 69 соответственно.

**[0393]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:89, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:92. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 53 или 54, 55 и 90 или 91 соответственно (например, SEQ ID NO: 53, 55 и 90 соответственно или SEQ ID NO: 54, 55 и 91 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 93, 44 и 94 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый

антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 53 или 54, 55 и 90 или 91 соответственно (например, SEQ ID NO: 53, 55 и 90 соответственно или SEQ ID NO: 54, 55 и 91 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 93, 44 и 94 соответственно.

**[0394]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:70, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:75. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 71 или 115, 72 и 73 или 74 соответственно (например, SEQ ID NO: 71, 72 и 73 соответственно или SEQ ID NO: 115, 72 и 74 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 71 или 115, 72 и 73 или 74 соответственно (например, SEQ ID NO: 71, 72 и 73 соответственно или SEQ ID NO: 115, 72 и 74 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно.

**[0395]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:79, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по

меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:85. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 83 или 84 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 83 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 84 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 83 или 84 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 83 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 84 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

**[0396]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:95, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:85. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 96 или 97 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 96 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 97 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 96 или 97 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 96 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 97 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

**[0397]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:98, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:85. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 99 или 100 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 99 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 100 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 99 или 100 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 99 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 100 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

**[0398]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:101, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:85. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 102 или 103 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 102 соответственно или SEQ ID NO: 81,

82 и 103 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 102 или 103 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 102 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 103 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

**[0399]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:104, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:85. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 105 или 106 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 105 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 106 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 105 или 106 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 105 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 106 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

**[0400]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:107, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:85. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 108 или 109 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 108 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 109 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 108 или 109 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 108 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 109 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

**[0401]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:110, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:85. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 111 или 112 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 111 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 112 соответственно). В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3,

содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80 или 81, 82 и 111 или 112 соответственно (например, SEQ ID NO: 80, 82 и 111 соответственно или SEQ ID NO: 81, 82 и 112 соответственно); и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

**[0402]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:113, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:114.

**[0403]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:116, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:117.

**[0404]** Мультиспецифические связывающие белки могут связываться с NKG2D-экспрессирующими клетками, которые включают без ограничения NK-клетки, γδ-T-клетки и $CD8^+$ αβ-T-клетки. При связывании NKG2D мультиспецифические связывающие белки могут блокировать природные лиганды, такие как ULBP6 и MICA, от связывания с NKG2D и активации NK-клеток.

**[0405]** Мультиспецифические связывающие белки связываются с клетками, экспрессирующими CD16, являющийся Fc-рецептором на поверхности лейкоцитов, включая естественные киллерные клетки, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки. Белок по настоящему изобретению связывается с NKG2D с аффинностью, характеризующейся $K_D$, составляющей 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, от 2 нМ до 60 нМ, от 2 нМ до 50 нМ, от 2 нМ до 40 нМ, от 2 нМ до 30 нМ, от 2 нМ до 20 нМ, от 2 нМ до 10 нМ, приблизительно 15 нМ, приблизительно 14 нМ, приблизительно 13 нМ, приблизительно 12 нМ, приблизительно 11 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 9 нМ, приблизительно 8 нМ, приблизительно 7 нМ, приблизительно 6 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 4,5 нМ, приблизительно 4 нМ, приблизительно 3,5 нМ, приблизительно 3 нМ, приблизительно 2,5 нМ, приблизительно 2 нМ, приблизительно 1,5 нМ, приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 1 нМ до приблизительно 2 нМ, от приблизительно 2 нМ до 3 нМ, от приблизительно 3 нМ до 4 нМ, от приблизительно 4 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 6 нМ, от приблизительно 6 нМ до приблизительно 7 нМ, от приблизительно 7 нМ до приблизительно 8 нМ, от приблизительно 8 нМ до приблизительно 9 нМ, от приблизительно 9 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 2 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 3 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 4 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 6 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 7 нМ до приблизительно 10 нМ или от приблизительно 8 нМ до приблизительно 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления NKG2D-связывающие участки связываются с NKG2D с $K_D$, составляющей 10-62 нМ.

***CLEC12A-связывающий участок***

**[0406]** Связывающий опухолеассоциированный антиген участок мультиспецифического связывающего белка, раскрытого в данном документе, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи. В **таблице 2** перечислены некоторые иллюстративные последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с этими опухолеассоциированными антигенами.

**[0407]** В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных киллерных клетках, а также с CLEC12A. В таблице 2 перечислены некоторые иллюстративные последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с CLEC12A. Последовательности CDR идентифицированы по системе нумерации согласно Kabat, как указано.

**Таблица 2. Последовательности иллюстративных антигенсвязывающих участков, которые связывают CLEC12A**

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| 16B8.C8 | EVQLQESGPGLVQPSQSLSITCT VSGFSLTNYGLHWVRQSPGKG LEWLGVIWSGGKTDYNTPFKS RLSISKDISKNQVFFKMNSLQP NDTAIYFCAKYDYDDSLDYWG QGTSVTVSS [SEQ ID NO:135] CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137] CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138] CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | DIQMNQSPSSLSASLGDTIAITCHA SQNINFWLSWYQQKPGNIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLT ISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFG QGTKLEIK [SEQ ID NO:136] CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140] CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141] CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде scFv-1292 / scFv-1301 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKG LEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSR VTISKDTSKNQFSLKLSSVQAN DTAVYYCAKYDYDDSLDYWG QGTLVTVSS [SEQ ID NO:143] CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137] CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138] CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHA SQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLT ISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFG QGTKLEIK [SEQ ID NO:144] CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140] CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141] CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| scFv гуманизированного 16B8.C8 scFv-1292 / scFv-1301 | scFv-1292 (VH-VL): QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWI GVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYC AKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEA SNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGC GTKLEIK [SEQ ID NO:145] scFv-1301 (VL-VH): | |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFG CGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRV TISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLV TVSS [SEQ ID NO:146] | |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде scFv-1293 / scFv-1302 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKG LEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSR VTISVDTSKNQFSLKLSSVQAN DTAVYYCAKYDYDDSLDYWG QGTLVTVSS [SEQ ID NO:147] CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137] CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138] CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHA SQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLT ISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFG QGTKLEIK [SEQ ID NO:144] CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140] CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141] CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| scFv гуманизированного 16B8.C8 scFv-1293 / scFv-1302 | scFv-1293 (VH-VL): QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWI GVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYC AKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEA SNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGC GTKLEIK [SEQ ID NO:149] scFv-1302 (VL-VH): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFG CGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRV | |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| | TISVDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLV TVSS [SEQ ID NO:150] | |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде scFv-1294 / scFv-1303 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKG LEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSR VTISKDTSKNQFSLKLSSVTAN DTAVYYCAKYDYDDSLDYWG QGTLVTVSS [SEQ ID NO:244] CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137] CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138] CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHA SQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLT ISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFG QGTKLEIK [SEQ ID NO:144] CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140] CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141] CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| scFv гуманизированного 16B8.C8 scFv-1294 / scFv-1303 | scFv-1294 (VH-VL): QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWI GVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTANDTAVYYC AKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEA SNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGC GTKLEIK [SEQ ID NO:153] scFv-1303 (VL-VH): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFG CGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRV TISKDTSKNQFSLKLSSVTANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLV TVSS [SEQ ID NO:154] | |
| Гуманизированное | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKG | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHA SQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| 16B8.C8, представленное в виде scFv-1295 / scFv-1304 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | LEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSR VTISKDTSKNQFSLKLSSVQAA DTAVYYCAKYDYDDSLDYWG QGTLVTVSS [SEQ ID NO:178] CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137] CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138] CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLT ISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFG QGTKLEIK [SEQ ID NO:144] CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140] CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141] CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| scFv гуманизированного 16B8.C8 scFv-1295 / scFv-1304 | scFv-1295 (VH-VL): QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWI GVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYC AKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEA SNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGC GTKLEIK [SEQ ID NO:156] scFv-1304 (VL-VH): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFG CGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRV TISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLV TVSS [SEQ ID NO:157] | |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде scFv-1296 / scFv- | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKG LEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSR VTISKDTSKNQFSLKLSSVQAN DTAVYYCARYDYDDSLDYWG QGTLVTVSS [SEQ ID NO:256] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHA SQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLT ISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFG QGTKLEIK [SEQ ID NO:144] |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| 1305 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137]<br>CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138]<br>CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140]<br>CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141]<br>CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| scFv гуманизированного 16B8.C8 scFv-1296 / scFv-1305 | scFv-1296 (VH-VL):<br>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCARYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:160]<br><br>scFv-1305 (VL-VH):<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCARYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS<br>[SEQ ID NO:161] | |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде scFv-1297 / scFv-1306 (обратные мутации в VH и VL | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS<br>[SEQ ID NO:143]<br>CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137]<br>CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGQGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:163]<br>CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140]<br>CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141]<br>CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| подчеркнуты ) | CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | |
| scFv гуманизированного 16B8.C8 scFv-1297 / scFv-1306 | scFv-1297 (VH-VL): QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK [SEQ ID NO:164] scFv-1306 (VL-VH): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO:165] | |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде scFv-1298 / scFv-1307 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты ) | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO:143] CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137] CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138] CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGQGTKLEIK [SEQ ID NO:167] CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140] CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141] CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| scFv гуманизиров | scFv-1298 (VH-VL): QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYC | |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| анного 16B8.C8 scFv-1298 / scFv-1307 | AKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEA SNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGC GTKLEIK<br>[SEQ ID NO:168]<br>scFv-1307 (VL-VH):<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTF GCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSR VTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTL VTVSS<br>[SEQ ID NO:169] | |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде scFv-1299 / scFv-1308 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKG LEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSR VTISKDTSKNQFSLKLSSVQAN DTAVYYCAKYDYDDSLDYWG QGTLVTVSS<br>[SEQ ID NO:143]<br>CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137]<br>CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138]<br>CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHA SQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFG QGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:171]<br>CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140]<br>CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141]<br>CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| scFv гуманизированного 16B8.C8 scFv-1299 / scFv-1308 | scFv-1299 (VH-VL):<br>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWI GVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYC AKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEA SNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGC GTKLEIK<br>[SEQ ID NO:172]<br>scFv-1308 (VL-VH): | |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTF GCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSR VTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTL VTVSS<br>[SEQ ID NO:173] | |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде scFv-1300 / scFv-1309 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKG LEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSR VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARYDYDDSLDYWG QGTLVTVSS<br>[SEQ ID NO:174]<br>CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137]<br>CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138]<br>CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHA SQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIY EASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFG QGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:175]<br>CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140]<br>CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141]<br>CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| scFv гуманизированного 16B8.C8 scFv-1300 / scFv-1309 | scFv-1300 (VH-VL):<br>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWI GVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEA SNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGC GTKLEIK<br>[SEQ ID NO:176]<br>scFv-1309 (VL-VH):<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLI YEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLT FGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSET LSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARYDYDDSLDYWGQGT LVTVSS | |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| | [SEQ ID NO:177] | |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде scFv-1602 / scFv-2061 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO:178]<br>CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137]<br>CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138]<br>CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGGGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:289]<br>CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140]<br>CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141]<br>CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| scFv гуманизированного 16B8.C8 scFv-1602 / scFv-2061 | scFv-1602 (VH-VL):<br>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:180]<br>scFv-2061 (VL-VH):<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS<br>[SEQ ID NO:181] | |
| Гуманизированное 16B8.C8 Консенсусная | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISX$_1$DTSKNQFSLKLSSVX$_2$AX$_3$DTAVYYCAX$_4$YDYDDSLDYWGQGTLVTVSS, | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKX$_1$PKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTX$_2$FTLTISSLQPEDX$_3$ATYYCQQSHSYPLTFGX$_4$GTKLEIK, |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| последовательность | где $X_1$ представляет собой V или K, $X_2$ представляет собой T или Q, $X_3$ представляет собой A или N, и $X_4$ представляет собой R или K<br>[SEQ ID NO:182]<br>CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137]<br>CDR2: WSGGK [SEQ ID NO:138]<br>CDR3: YDYDDSLDY [SEQ ID NO:139] | где $X_1$ представляет собой A или I, $X_2$ представляет собой D или R, $X_3$ представляет собой F или I, и $X_4$ представляет собой Q или G<br>[SEQ ID NO:151]<br>CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140]<br>CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141]<br>CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде AB0305 / AB5030 (Цистеиновые мутации, способствующие гетеродимеризации, подчеркнуты. Такие мутации могут способствовать образованию дисульфидного мостика | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWVGGATDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDTLDYWGQGTLVTVSS<br>[SEQ ID NO:270]<br>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWVGGATDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDTLDYWGQGTLVTVSS<br>[SEQ ID NO:335]<br>CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137]<br>CDR2: WVGGA [SEQ ID NO:272]<br>CDR3: GDYGDTLDY [SEQ ID NO:273] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGSGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:271]<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:336]<br>CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140]<br>CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141]<br>CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| между VH и VL scFv.) | | |
| scFv гуманизированного 16B8.C8 AB0305/ AB5030 | AB0305 (VH-VL):<br>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWVGGATDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDTLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:274]<br><br>AB5030 (VL-VH):<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWVGGATDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDTLDYWGQGTLVTVSS<br>[SEQ ID NO:275] | |
| Гуманизированное 16B8.C8, представленное в виде AB0147/ AB7410 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVILSGGWTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDALDYWGQGTLVTVSS<br>[SEQ ID NO:294]<br><br>CDR1: GFSLTNY [SEQ ID NO:137]<br>CDR2: LSGGW [SEQ ID NO:296]<br>CDR3: GDYGDALDY [SEQ ID NO:279] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGSGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:295]<br><br>CDR1: HASQNINFWLS [SEQ ID NO:140]<br>CDR2: EASNLHT [SEQ ID NO:141]<br>CDR3: QQSHSYPLT [SEQ ID NO:142] |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| scFv гуманизированного 16B8.C8 AB0147/ AB7410 | AB0147(VH-VL)<br>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWI<br>GVILSGGWTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYC<br>AKGDYGDALDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ<br>MTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEA<br>SNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGC<br>GTKLEIK<br>[SEQ ID NO:280]<br><br>AB7410 (VL-VH)<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLI<br>YEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTF<br>GCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETL<br>SLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVILSGGWTDYNPSLKSR<br>VTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDALDYWGQGTL<br>VTVSS<br>[SEQ ID NO:200] | |
| 9F11.B7 | EVQLQESGGGLVQPGGSRKLS<br>CAASGFTFNSFGMHWVRQAPE<br>KGLEWVAFISSGSTSIYYANTV<br>KGRFTISRDNPKNTLFLQMTSL<br>RSEDTAMYYCARDGYPTGGA<br>MDYWGQGTSVTVSS [SEQ ID<br>NO:193]<br><br>CDR1: GFTFNSF [SEQ ID<br>NO:192]<br>CDR2: SSGSTS [SEQ ID NO:196]<br>CDR3: DGYPTGGAMDY [SEQ<br>ID NO:187] | DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCK<br>ASQDIYNYLSWFQLKPGKSPRPLI<br>YRANILVSGVPSKFSGSGSGQDYS<br>LTINSLEYEDLGIYYCLQFDAFPFT<br>FGSGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:194]<br>CDR1: KASQDIYNYLS [SEQ ID<br>NO:198]<br>CDR2: RANILVS [SEQ ID NO:199]<br>CDR3: LQFDAFPFT [SEQ ID<br>NO:201] |
| Гуманизированное 9F11.B7, | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLS<br>CAASGFTFNSFGMHWVRQAPG<br>KGLEWVAFISSGSTSIYYANTV<br>KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA<br>SQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIY<br>RANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTFT |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| представленное в виде AB0191 / AB0185 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | RAEDTAVYYCARDGYPTGGA MDYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:162] CDR1: GFTFNSF [SEQ ID NO:192] CDR2: SSGSTS [SEQ ID NO:196] CDR3: DGYPTGGAMDY [SEQ ID NO:187] | ISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGS GTKLEIK [SEQ ID NO:203] CDR1: KASQDIYNYLS [SEQ ID NO:198] CDR2: RANILVS [SEQ ID NO:199] CDR3: LQFDAFPFT [SEQ ID NO:201] |
| scFv гуманизированного 9F11.B7 AB0191 / AB0185 | AB0191 (VH-VL): EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLE WVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLI YRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTF GCGTKLEIK [SEQ ID NO:184]<br><br>AB0185 (VL-VH): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLI YRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTF GCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDY WGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:185] | |
| Гуманизированное 9F11.B7, представленное в виде AB0192/ AB0186 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFNAFGMHWVRQAPG KGLEWVAFISSGSTSIYYANTV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDGYPTGGA MDYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:148] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIY RANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTFT ISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGS GTKLEIK [SEQ ID NO:203] CDR1: KASQDIYNYLS [SEQ ID NO:198] |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | CDR1: GFTFNAF [SEQ ID NO:195]<br>CDR2: SSGSTS [SEQ ID NO:196]<br>CDR3: DGYPTGGAMDY [SEQ ID NO:187] | CDR2: RANILVS [SEQ ID NO:199]<br>CDR3: LQFDAFPFT [SEQ ID NO:201] |
| scFv гуманизированного 9F11.B7 AB0192/ AB0186 | AB0192 (VH-VL):<br>EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNAFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:204]<br><br>AB0186 (VL-VH):<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNAFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSS<br>[SEQ ID NO:205] | |
| Гуманизированное 9F11.B7, представленное в виде AB0193/ AB0187 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSS<br>[SEQ ID NO:210]<br>CDR1: GFTFNSF [SEQ ID NO:192]<br>CDR2: SSGSTS [SEQ ID NO:196]<br>CDR3: SGYPTGGAMDY [SEQ ID NO:213] | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGSGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:203]<br>CDR1: KASQDIYNYLS [SEQ ID NO:198]<br>CDR2: RANILVS [SEQ ID NO:199]<br>CDR3: LQFDAFPFT [SEQ ID NO:201] |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| scFv гуманизированного 9F11.B7 AB0193/ AB0187 | AB0193 (VH-VL): EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK [SEQ ID NO:208] AB0187 (VL-VH): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:209] | |
| Гуманизированное 9F11.B7, представленное в виде AB0194/ AB0188 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:162] CDR1: GFTFNSF [SEQ ID NO:192] CDR2: SSGSTS [SEQ ID NO:196] CDR3: DGYPTGGAMDY [SEQ ID NO:187] | DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGSGTKLEIK [SEQ ID NO:218] CDR1: KASQDIYNYLS [SEQ ID NO:198] CDR2: RANILVS [SEQ ID NO:199] CDR3: LQFDAFPFT [SEQ ID NO:201] |
| scFv гуманизированного 9F11.B7 AB0194/ AB0188 | AB0194 (VH-VL): EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLI | |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| | YRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTF GCGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:215]<br>AB0188 (VL-VH):<br>DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLI YRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTF GCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDY WGQGTSVTVSS<br>[SEQ ID NO:216] | |
| Гуманизированное 9F11.B7, представленное в виде AB0195/ AB0189 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFNAFGMHWVRQAPG KGLEWVAFISSGSTSIYYANTV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDGYPTGGA MDYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:148]<br>CDR1: GFTFNAF [SEQ ID NO:195]<br>CDR2: SSGSTS [SEQ ID NO:196]<br>CDR3: DGYPTGGAMDY [SEQ ID NO:187] | DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIY RANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTL TISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTF GSGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:218]<br>CDR1: KASQDIYNYLS [SEQ ID NO:198]<br>CDR2: RANILVS [SEQ ID NO:199]<br>CDR3: LQFDAFPFT [SEQ ID NO:201] |
| scFv гуманизированного 9F11.B7 AB0195/ AB0189 | AB0195 (VH-VL):<br>EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNAFGMHWVRQAPGKCLE WVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLI YRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTF GCGTKLEIK<br>[SEQ ID NO:252]<br><br>AB0189 (VL-VH): | |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| | DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLI YRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTF GCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGFTFNAFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDY WGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:253] | |
| Гуманизированное 9F11.B7, представленное в виде AB0196/ AB0190 (обратные мутации в VH и VL подчеркнуты) | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFNSFGMHWVRQAPG KGLEWVAFISSGSTSIYYANTV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARSGYPTGGAM DYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO:210] CDR1: GFTFNSF [SEQ ID NO:192] CDR2: SSGSTS [SEQ ID NO:196] CDR3: SGYPTGGAMDY [SEQ ID NO:213] | DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIY RANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTL TISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTF GSGTKLEIK [SEQ ID NO:218] CDR1: KASQDIYNYLS [SEQ ID NO:198] CDR2: RANILVS [SEQ ID NO:199] CDR3: LQFDAFPFT [SEQ ID NO:201] |
| scFv гуманизированного 9F11.B7 AB0196/ AB0190 | AB0196 (VH-VL): EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLE WVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARSGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLI YRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTF GCGTKLEIK [SEQ ID NO:254]<br><br>AB0190 (VL-VH): DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLI YRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTF GCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTV | |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| | KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYPTGGAMDYW GQGTSVTVSS [SEQ ID NO:255] | |
| Гуманизированное 9F11.B7 Консенсусная последовательность | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFNX$_1$FGMHWVRQAP GKGLEWVAFISSGSTSIYYANT VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARX$_2$GYPTGG AMDYWGQGTSVTVSS, где X$_1$ представляет собой S или A, и X$_2$ представляет собой D или S [SEQ ID NO:249] CDR1: GFTFNXF, где X представляет собой S или A [SEQ ID NO:251] CDR2: SSGSTS [SEQ ID NO:196] CDR3: XGYPTGGAMDY, где X представляет собой D или S [SEQ ID NO:246] | DIX$_1$MTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLI YRANILVSGVPSRFSGSGSGQDYT X$_2$TISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFT FGSGTKLEIK, где X$_1$ представляет собой Q или K, и X$_2$ представляет собой F или L [SEQ ID NO:250] CDR1: KASQDIYNYLS [SEQ ID NO:198] CDR2: RANILVS [SEQ ID NO:199] CDR3: LQFDAFPFT [SEQ ID NO:201] |
| 30A9.E9 | EVQLQESGPGLVQPSQSLSITCT VSGFSLTSFGVHWVRQSPGKG LEWLGVIWSGGSTDSNAAFISR LTITKDNSKSQVFFKMNSLQAT DTAIYYCARSYFAMDYWGQGT SVSVSS [SEQ ID NO:247] CDR1: GFSLTSF [SEQ ID NO:221] CDR2: WSGGS [SEQ ID NO:166] CDR3: SYFAMDY [SEQ ID NO:223] | DIVMTQSPSSLAVTAGEKVTMRCK SSQSLLWNVNQNNYLLWYQQKQ GQPPKLLIYGASIRESWVPDRFTGS GSGTDFTLTISNVHVEDLAVYYCQ HNHGSFLPYTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:248] CDR1: KSSQSLLWNVNQNNYLL [SEQ ID NO:240] CDR2: GASIRES [SEQ ID NO:226] CDR3: QHNHGSFLPYT [SEQ ID NO:179] |
| 23A5.H8 | QVQLRQSGPGLVQPSQSLSITC TVSGFSLTSYGVHWVRQSPGK | GIVMTQSPSSLAVTAGEKVTMRCK SSQSLLWSVNQNNYLLWYQQKQG |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| | GLEWLGVMWSGGSTDYNAAF MSRLSISKDNSKSQVFFTMNSL QADDTAIYYCARTHFGMDYW GQGTPVTVSS [SEQ ID NO:242] CDR1: GFSLTSY [SEQ ID NO:206] CDR2: WSGGS [SEQ ID NO:166] CDR3: THFGMDY [SEQ ID NO:241] | QPPKLLIYGASIRQSWVPDRFTGSG SGTDFTLSISNVHAEDLAVYYCQH NHGSFLPYTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:243] CDR1: KSSQSLLWSVNQNNYLL [SEQ ID NO:245] CDR2: GASIRQS [SEQ ID NO:239] CDR3: QHNHGSFLPYT [SEQ ID NO:179] |
| 20D6.H8 | EVQLQESGPGLVQPSQSLSITCT VSGFSLTSFGIHWVRQSPGKGL EWLGVIWSGGNTDSNAAFISRL SITKDISKSQVFFKMNSLQVTD TAIYYCARSYFAMDYWGQGTS VTVSS [SEQ ID NO:238] CDR1: GFSLTSF [SEQ ID NO:221] CDR2: WSGGN [SEQ ID NO:236] CDR3: SYFAMDY [SEQ ID NO:223] | GIVMTQSPSSLAVTAGEKVTMRCK SSQSLLWNVNQNNYLVWYQQKQ GQPPKLLIYGASIRESWVPDRFTGS GSGTDFTLTISNVHAEDLAVYYCQ HNHGSFLPYTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:237] CDR1: KSSQSLLWNVNQNNYLV [SEQ ID NO:152] CDR2: GASIRES [SEQ ID NO:226] CDR3: QHNHGSFLPYT [SEQ ID NO:179] |
| 15A10.G8 | EVQLQESGAELVRSGASIKLSC AASAFNIKDYFIHWVRQRPDQ GLEWIGWIDPENDDTEYAPKFQ DKATMTADTSSNTAYLQLSSLT SADTAVYYCNALWSRGGYFD YWGQGTTLTVSS [SEQ ID NO:155] CDR1: AFNIKDY [SEQ ID NO:159] CDR2: DPENDD [SEQ ID NO:170] | EVLLTQSPAIIAASPGEKVTITCSAR SSVSYMSWYQQKPGSSPKIWIYGI SKLASGVPARFSGSGSGTYFSFTIN NLEAEDVATYYCQQRSYYPFTFGS GTKLEIK [SEQ ID NO:158] CDR1: SARSSVSYMS [SEQ ID NO:186] CDR2: GISKLAS [SEQ ID NO:188] CDR3: QQRSYYPFT [SEQ ID NO:189] |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| | CDR3: LWSRGGYFDY [SEQ ID NO:183] | |
| 13E1.A4 | EVQLQESGPELEKPGASVRISC KASGYSFTAYNMNWVKQSNG KSLEWIGNIDPSYGDATYNQKF KGKATLTVDKSSSTAYMQLKS LTSEDSAVYYCARDNYYGSGY FDYWGQGTTLTVSS [SEQ ID NO:190] CDR1: GYSFTAY [SEQ ID NO:197] CDR2: DPSYGD [SEQ ID NO:202] CDR3: DNYYGSGYFDY [SEQ ID NO:207] | SVLMTQTPLSLPVSLGDRASISCRS SQGIVHINGNTYLEWYLQKPGQSP KLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSH VPWTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:191] CDR1: RSSQGIVHINGNTYLE [SEQ ID NO:211] CDR2: KVSNRFS [SEQ ID NO:212] CDR3: FQGSHVPWT [SEQ ID NO:214] |
| 12F8.H7 | EVQLQESGAELVRSGASVKLSC TVSGFNIKDYYMHWVKQRPEQ GLEWIGWIDPENGDTENVPKFQ GKATMTADTSSNTAYLQLRSL TSEDTAVYYCKSYYYDSSSRY VDVWGAGTTVTVSS [SEQ ID NO:217] CDR1: GFNIKDY [SEQ ID NO:220] CDR2: DPENGD [SEQ ID NO:222] CDR3: YYYDSSSRYVDV [SEQ ID NO:257] | GIVMTQAPLTLSVTIGQPASISCKS SQSLLDSDGKTFLNWFLQRPGQSP KRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGT DFTLKLSRVEPEDLGVYYCWQGT HFPYTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:219] CDR1: KSSQSLLDSDGKTFLN [SEQ ID NO:224] CDR2: LVSKLDS [SEQ ID NO:225] CDR3: WQGTHFPYT [SEQ ID NO:227] |
| 9E4.B7 | EVQLQESGAELMKPGASVKISC RTTGYTFSTYWIEWVKQRPGR GPEWIGELFPGNSDTTLNEKFT GKATFTADSSSNTAYMQLSSLT | GIVMTQSPASLSASVGETVTITCRA GENIHSYLAWYQQKQGKSPQLLV YNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFS LKINSLQPEDFGSYYCQHHYGTPR TFGGGTKLEIK |

| Клон | VH | VL |
|---|---|---|
| | SEDSAVYYCARSGYYGSSLDY WGQGTTLTVSS [SEQ ID NO:228]<br><br>CDR1: GYTFSTY [SEQ ID NO:230]<br>CDR2: FPGNSD [SEQ ID NO:231]<br>CDR3: SGYYGSSLDY [SEQ ID NO:232] | [SEQ ID NO:229]<br><br>CDR1: RAGENIHSYLA [SEQ ID NO:233]<br>CDR2: NAKTLAE [SEQ ID NO:234]<br>CDR3: QHHYGTPRT [SEQ ID NO:235] |

**[0408]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A (например, CLEC12A человека), содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH), который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную VH антитела, раскрытого в таблице 2, и вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную VL того же антитела, раскрытого в таблице 2. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, определенные согласно Kabat (см. Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Chothia (см., например, Chothia C & Lesk A M, (1987), *J. Mol. Biol.* 196: 901-917), MacCallum (см. MacCallum R M *et al.*, (1996) *J. Mol. Biol.* 262: 732-745) или любому другому известному из уровня техники способу определения CDR последовательностей VH и VL антигенсвязывающего участка, раскрытого в таблице 2. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, раскрытого в таблице 2.

**[0409]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из 16B8.C8. Например, в определенных вариантах осуществления второй

антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:135, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:136. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно.

**[0410]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из scFv-1292 или scFv-1301. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:143, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:144. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие

аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:145 или 146.

**[0411]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из scFv-1293 или scFv-1302. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:147, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:144. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:149 или 150.

**[0412]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из scFv-1294 или scFv-1303. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:244, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:144. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:153 или 154.

**[0413]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из scFv-1295 или scFv-1304. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:178, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей

мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:144. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:156 или 157.

**[0414]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из scFv-1296 или scFv-1305. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:256, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:144. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b)

VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:160 или 161.

**[0415]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из scFv-1297 или scFv-1306. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:143, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:163. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:164 или 165.

**[0416]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из scFv-1298 или scFv-1307. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:143, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:167. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:168 или 169.

**[0417]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из scFv-1299 или scFv-1308. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:143, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей

мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:171. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:172 или 173.

**[0418]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из scFv-1300 или scFv-1309. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:174, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:175. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b)

VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:176 или 177.

**[0419]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из scFv-1602 или scFv-2061. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:178, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:289. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:180 или 181.

**[0420]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из гуманизированного 16B.C8. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:182, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:151. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно.

**[0421]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из AB0305 или AB5030. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:270, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:271. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по

меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:335, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:336. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH и VL, каждый из которых содержит цистеиновую мутацию, способствующую гетеродимеризации. Такие мутации, способствующие гетеродимеризации, могут способствовать образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 272 и 273 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 272 и 273 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:274 или 275.

**[0422]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из AB0147 или AB7410. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:294, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную

SEQ ID NO:295. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 296 и 279 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 296 и 279 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:280 или 200.

**[0423]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из 9F11.B7. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:193, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:194. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 187 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 187 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно.

**[0424]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из AB0191 или AB0185. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:162, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:203. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 187 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 187 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:184 или 185.

**[0425]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из AB0192 или AB0186. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:148, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей

мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:203. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 195, 196 и 187 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 195, 196 и 187 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:204 или 205.

**[0426]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из AB0193 или AB0187. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:210, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:203. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 213 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 213 соответственно; и (b)

VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:208 или 209.

**[0427]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из AB0194 или AB0188. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:162, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:218. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 187 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 187 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:215 или 216.

**[0428]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из AB0195 или AB0189. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:148, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:218. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 195, 196 и 187 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 195, 196 и 187 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:252 или 253.

**[0429]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из AB0196 или AB0190. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:210, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей

мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:218. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 213 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 213 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:254 или 255.

**[0430]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из гуманизированного 9F11.B7. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:249, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:250. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 251, 196 и 246 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 251, 196 и 246 соответственно; и (b)

VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно.

**[0431]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из 30A9.E9. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:247, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:248. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 221, 166 и 223 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 240, 226 и 179 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 221, 166 и 223 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 240, 226 и 179 соответственно.

**[0432]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из 23A5.H8. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:242, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:243. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 206, 166 и 241 соответственно. В

определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 245, 239 и 179 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 206, 166 и 241 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 245, 239 и 179 соответственно.

**[0433]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из 20D6.H8. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:238, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:237. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 221, 236 и 223 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 152, 226 и 179 соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 221, 236 и 223 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 152, 226 и 179 соответственно.

**[0434]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из 15A10.G8. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:155, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%

(например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:158. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 159, 170 и 183 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 186, 188 и 189 и соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 159, 170 и 183 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 186, 188 и 189 соответственно.

**[0435]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из 13E1.A4. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:190, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:191. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 197, 202 и 207 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 211, 212 и 214 и соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 197, 202 и 207 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 211, 212 и 214 соответственно.

**[0436]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из 12F8.H7. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную

последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:217, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:219. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 220, 222 и 257 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 224, 225 и 227 и соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 220, 222 и 257 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 224, 225 и 227 соответственно.

**[0437]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок получен из 9E4.B7. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:228, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:229. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 230, 231 и 232 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 233, 234 и 235 и соответственно. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 230, 231 и 232 соответственно; и (b) VL, который

содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 233, 234 и 235 соответственно.

**[0438]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, представляет собой scFv. Например, в определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:145, 146, 149, 150, 153, 154, 156, 157, 160, 161, 164, 165, 168, 169, 172, 173, 176, 177, 180, 181, 184, 185, 204, 205, 208, 209, 215, 216, 252, 253, 254, 255, 274, 275, 280, или 281. В конкретных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:180.

**[0439]** В качестве альтернативы, новые антигенсвязывающие участки, которые могут связываться с CLEC12A, могут быть идентифицированы путем скрининга в отношении связывания с аминокислотной последовательностью, определенной под SEQ ID NO:258, ее вариантом, ее зрелым внеклеточным фрагментом или фрагментом, содержащим домен CLEC12A.

**SEQ ID NO:258**

MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLTLLCLLLLIGLGVL ASMFHVTLKIEMKKMNKLQNISEELQRNISLQLMSNMNISNKIRNLSTTLQTIATKLCRE LYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYFLSDDVQTWQESKMACAAQNASLLKINNKNAL EFIKSQSRSYDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAWVIRNAPDLNNMYCGYINRLYVQ YYHCTYKKRMICEKMANPVQLGSTYFREA (Uniprot ID № Q5QGZ9)

**[0440]** Предполагается, что в scFv VH и VL могут быть соединены линкером, например, $(GlyGlyGlyGlySer)_4$, т. е. линкером $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:119). Специалисту в данной области техники будет понятно, что любой из других раскрытых линкеров (см., например, таблицу 10) можно применять в scFv, имеющем последовательности VH и VL, раскрытые в данном документе (например, в таблице 2).

**[0441]** В каждом из приведенных выше вариантов осуществления в данном документе предполагается, что последовательности scFv, VH и/или VL, которые связывают CLEC12A, могут содержать аминокислотные изменения (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 10 аминокислотных замен, делеций или добавлений) в каркасных областях VH и/или VL без влияния на их способность связываться с CLEC12A. Например, в данном документе предполагается, что последовательности scFv, VH и/или VL, которые связывают CLEC12A, могут содержать цистеиновые мутации, способствующие гетеродимеризации, способствующие образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv.

**[0442]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, раскрытый в данном документе, связывает CLEC12A человека с $K_D$ (т. е. константой диссоциации), составляющей 1 нМ или ниже, 5 нМ или ниже, 10 нМ или ниже, 15 нМ или ниже или 20 нМ или ниже, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, с применением способа, описанного в примере 12) или посредством биослойной интерферометрии (BLI), и/или связывает CLEC12A из жидкости, ткани и/или клетки организма субъекта. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, раскрытый в данном документе, характеризуется $K_d$ (т. е. скоростью диссоциации, также называемой $K_{off}$), составляющей $1 \times 10^{-5}$, $1 \times 10^{-4}$, $1 \times 10^{-3}$, $5 \times 10^{-3}$, 0,01, 0,02 или 0,05 1/с или ниже, как измерено посредством SPR (например, с применением способа, описанного в примере 12) или посредством BLI.

**[0443]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, полученный из 15A10.G8 или 20D6.A8, связывает CLEC12A яванского макака с $K_D$ (т. е. константой диссоциации), составляющей 5 нМ или ниже, 10 нМ или ниже, 15 нМ или ниже, 20 нМ или ниже или 30 нМ или ниже, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, с применением способа, описанного в примере 12) или посредством биослойной интерферометрии (BLI), и/или связывает CLEC12A из жидкости, ткани и/или клетки организма субъекта. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, раскрытый в данном документе, характеризуется $K_d$ (т. е. скоростью диссоциации, также называемой $K_{off}$), составляющей $1 \times 10^{-3}$, $5 \times 10^{-3}$, 0,01, 0,02 или 0,03 1/с или ниже, как измерено посредством SPR (например, с применением способа, описанного в примере 12) или посредством BLI.

**[0444]** Сообщалось о вариациях статуса гликозилирования CLEC12A на поверхности различных типов клеток (Marshall *et al.*, (2006) *Eur J Immunol.* 36(8):2159-69). CLEC12A, экспрессируемый на поверхности клеток AML у разных пациентов, также может иметь разные паттерны гликозилирования. Более того, разветвленные гликаны могут ограничивать доступ к белковому компоненту CLEC12A, ограничивая разнообразие доступных эпитопов. Определенные антигенсвязывающие участки или настоящая заявка способны преодолевать вариации гликозилирования. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок, раскрытый в данном документе, например, антигенсвязывающий участок, полученный из 16B8.C8, гуманизированного 16B8.C8, 9F11.B7 или гуманизированного 9F11.B7, связывает CLEC12A (например, CLEC12A человека) независимым от гликозилирования образом, т. е. связывает как

гликозилированный CLEC12A, так и дегликозилированный CLEC12A. В определенных вариантах осуществления соотношение $K_D$, при котором второй антигенсвязывающий участок связывает дегликозилированный CLEC12A, и $K_D$, при котором второй антигенсвязывающий участок связывает гликозилированный CLEC12A, находится в диапазоне от 1:10 до 10:1 (например, в диапазоне от 1:5 до 5:1, от 1:3 до 3:1 или от 1:2 до 2:1). В определенных вариантах осуществления соотношение составляет приблизительно 1:5, приблизительно 1:3, приблизительно 1:2, приблизительно 1:1,5, приблизительно 1:1, приблизительно 1,5:1, приблизительно 2:1, приблизительно 3:1 или приблизительно 5:1. В определенных вариантах осуществления соотношение составляет приблизительно 1:1. В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает мультиспецифический связывающий белок, содержащий (a) первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A; и (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16; где второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A независимым от гликозилирования образом.

**[0445]** CLEC12A, содержащий замену K244Q, представляет собой полиморфный вариант, распространенный у приблизительно 30% населения. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок мультиспецифического связывающего белка, раскрытого в данном документе, связывает CLEC12A-K244Q. В определенных вариантах осуществления соотношение $K_D$, при котором второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A-K244Q, и $K_D$, при котором второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A дикого типа, находится в диапазоне от 1:2 до 2:1. В определенных вариантах осуществления соотношение составляет приблизительно 1:2, приблизительно 1:1,5, приблизительно 1:1, приблизительно 1,5:1 или приблизительно 2:1. В определенных вариантах осуществления соотношение составляет приблизительно 1:1.

**[0446]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические связывающие белки, описанные в данном документе, связываются с CLEC12A при изоэлектрической точке (pI), составляющей от приблизительно 8 до приблизительно 9. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические связывающие белки, описанные в данном документе, связываются с CLEC12A при pI, составляющей от приблизительно 8,5 до приблизительно 8,9. В определенных вариантах осуществления мультиспецифические связывающие белки, описанные в данном документе, связываются с CLEC12A при pI, составляющей приблизительно 8,7.

**[0447]** В некоторых вариантах осуществления формат F3' CLEC12A-специфичного TriNKET, описанный в данном документе (например, TriNKET hF3'-1602), характеризуется значением EC50, которое является в приблизительно 2 раза более низким (например, в приблизительно 1 раз более низким, в приблизительно 2 раза более низким, в приблизительно 3 раза более низким, в приблизительно 4 раза более низким, в приблизительно 5 раз более низким, в приблизительно 6 раз более низким), чем таковое для соответствующего формата F3 TriNKET, например AB0010, при связывании с CLEC12A человека на поверхности клетки, например раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления формат F3' CLEC12A-специфичного TriNKET, описанный в данном документе (например, TriNKET hF3'-1602), характеризуется значением EC50, которое является на приблизительно 50% более низким (например, на приблизительно 25% более низким, на приблизительно на 30% более низким, на приблизительно 40% более низким, на приблизительно 50% более низким, на приблизительно 55% более низким, на приблизительно 60% более низким, на приблизительно 70% более низким, на приблизительно 75% более низким), чем таковое для соответствующего формата F3 TriNKET, например AB0010, при связывании с CLEC12A человека на поверхности клетки, например раковой клетки.

**[0448]** В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует за связывание с CLEC12A с соответствующим вышеописанным антигенсвязывающим участком. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает мультиспецифический связывающий белок, содержащий (a) первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A; и (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16; где второй антигенсвязывающий участок конкурирует с антигенсвязывающим участком, который связывает CLEC12A, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует с антигенсвязывающим участком, полученным из 16B8.C8, раскрытым выше, за связывание с CLEC12A. В одном варианте осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует с 16B8.C8 за связывание с CLEC12A. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует с антигенсвязывающим участком, полученным из гуманизированного 16B8.C8, раскрытым выше, за связывание с CLEC12A. В одном варианте осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует с гуманизированным 16B8.C8 за связывание с CLEC12A. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует с антигенсвязывающим

участком, полученным из 9F11.B7, раскрытым выше, за связывание с CLEC12A. В одном варианте осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует с 9F11.B7 за связывание с CLEC12A. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует с антигенсвязывающим участком, полученным из гуманизированного 9F11.B7, раскрытым выше, за связывание с CLEC12A. В одном варианте осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует с гуманизированным 9F11.B7 за связывание с CLEC12A. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует с антигенсвязывающим участком, полученным из 12F8.H7, 13E1.A4, 15A10.E8, 20D6.H8 или 23A5.H8, раскрытым выше, за связывание с CLEC12A. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок конкурирует с 12F8.H7, 13E1.A4, 15A10.E8, 20D6.H8 или 23A5.H8 за связывание с CLEC12A.

***Fc-домен***

**[0449]** В Fc-домене связывание CD16 опосредуется 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-глюкозамин в домене CH2 (см. Sondermann *et al.*, Nature, 406 (6793):267-273). На основе известных доменов можно выбирать мутации для усиления или снижения аффинности связывания с CD16, как например с использованием библиотек, представленных в фаговом дисплее, или библиотек cDNA, отображаемых на поверхности дрожжей, или их можно разрабатывать на основе известной трехмерной структуры взаимодействия. Соответственно, в определенном варианте осуществления Fc-домен антитела или его часть содержат шарнирный участок и домен CH2.

**[0450]** Сборка тяжелых цепей гетеродимерных антител может быть осуществлена путем экспрессии двух разных последовательностей тяжелых цепей антитела в одной и той же клетке, что может приводить к сборке гомодимеров каждой тяжелой цепи антитела, а также к сборке гетеродимеров. Стимулирование предпочтительной сборки гетеродимеров может быть достигнуто путем включения различных мутаций в домен CH3 каждой константной области тяжелой цепи 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 осуществлены в домене CH3 на основе IgG1 человека и предусматривают включение отличающихся пар аминокислотных замен в первый полипептид и второй полипептид, которые обеспечивают для этих двух цепей возможность селективно гетеродимеризоваться друг с

другом. Все положения аминокислотных замен, проиллюстрированные ниже, пронумерованы в соответствии с EU-индексом, как у Kabat.

**[0451]** В одном сценарии аминокислотная замена в первом полипептиде предусматривает замену исходной аминокислоты на аминокислоту большего размера, выбранную из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) или триптофана (W), и по меньшей мере одна аминокислотная замена во втором полипептиде предусматривает замену исходной(-ых) аминокислоты(-от) на аминокислоту(-ы) меньшего размера, выбранную(-ые) из аланина (A), серина (S), треонина (T) или валина (V), вследствие чего замена на аминокислоту большего размера (выпуклость) совмещается с поверхностью, полученной в результате замены на аминокислоту меньшего размера (полость). Например, один полипептид может включать замену T366W, а другой может включать три замены, включая T366S, L368A и Y407V.

**[0452]** Вариабельный домен тяжелой цепи антитела, описанный в настоящей заявке, необязательно может быть связан с аминокислотной последовательностью, на по меньшей мере 90% идентичной константной области антитела, такой как константная область IgG, содержащая шарнирный участок, домены CH2 и CH3 с доменом CH1 или без него. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области на по меньшей мере 90% идентична константной области антитела человека, такой как константная область IgG1, константная область IgG2, константная область IgG3 или константная область IgG4 человека. В одном варианте осуществления Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16, содержат аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную последовательности Fc человеческого IgG1 дикого типа DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:118). В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области на по меньшей мере 90% идентична константной области антитела другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кошка, мышь или лошадь.

**[0453]** В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела, связанный с scFv или Fab-фрагментом, способен связываться с CD16. В некоторых

вариантах осуществления белок содержит часть Fc-домена антитела (например, часть Fc-домена антитела, достаточную для связывания CD16), где Fc-домен антитела содержит шарнирный участок и домен CH2 (например, шарнирный участок и домен CH2 человеческого антитела изотипа IgG1) и/или аминокислотные последовательности, на по меньшей мере 90% идентичные последовательности аминокислот 234-332 человеческого антитела класса IgG.

**[0454]** Одна или несколько 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. Иллюстративные замены 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.

**[0455]** В определенных вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в CH1 константной области IgG1 человека, могут затрагивать аминокислоты V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171 и/или V173. В определенных вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в Ск константной области IgG1 человека, могут затрагивать аминокислоты E123, F116, S176, V163, S174 и/или T164.

**[0456]** В качестве альтернативы, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, представленных 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 |

**[0457]** В качестве альтернативы, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, представленных 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 |

**[0458]** В качестве альтернативы, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, представленных 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 |

**[0459]** В качестве альтернативы, 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<br>K392D, K392E, K409F,<br>K409W, T411D и T411E |

**[0460]** В качестве альтернативы, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующих наборов замен в таблице 7, где в положении(-ях), указанном(-ых) в столбце "Первый полипептид", предусматривается замена на любую известную отрицательно заряженную аминокислоту, а в положении(-ях), указанном(-ых) в столбце "Второй полипептид", предусматривается замена на любую известную положительно заряженную аминокислоту.

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

**[0461]** В качестве альтернативы, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора в таблице 8, где в положении(-ях), указанном(-ых) в столбце "Первый полипептид", предусматривается замена на любую известную положительно заряженную аминокислоту, а в положении(-ях), указанном(-ых) в столбце "Второй полипептид", предусматривается замена на любую известную отрицательно заряженную аминокислоту.

| Таблица 8 | |
|---|---|
| Первый полипептид | Второй полипептид |
| D399, E356 или E357 | K409, K439, K370 или K392 |

**[0462]** В качестве альтернативы, 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 |

**[0463]** В качестве альтернативы или в дополнение структурная стабильность гетеромультимерного белка может быть повышена путем введения S354C в любую из первой или второй полипептидных цепей и Y349C в противоположную полипептидную цепь, что обеспечивает образование искусственного дисульфидного мостика в пределах области контакта двух полипептидов.

**[0464]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по положению T366, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368 и Y407.

**[0465]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по положению T366.

**[0466]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411.

**[0467]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411.

**[0468]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, N390, K392, K409 и T411.

**[0469]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из L351, D399, S400 и Y407.

**[0470]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из Q347, E357, D399 и F405.

**[0471]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из Y349, K360, Q347 и K409.

**[0472]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из D356, E357 и D399.

**[0473]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из K370, K392, K409 и K439.

**[0474]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из Y349, L351, L368, K392 и K409.

**[0475]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 по одному или нескольким положениям, выбранным 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 по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из L351, E356, T366 и D399.

**[0476]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C.

**[0477]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области

антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C.

**[0478]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами Q347R, D399V и F405T.

**[0479]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами Q347R, D399V и F405T, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W.

**[0480]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366W, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V.

**[0481]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой T366W.

**[0482]** 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, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W.

**[0483]** 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,

и 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***

**[0484]** Ниже перечислены примеры TriNKET, содержащих антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, и антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, каждый из которых связан с константной областью антитела, где константные области антитела содержат мутации, которые обеспечивают возможность гетеродимеризации двух цепей Fc.

**[0485]** Иллюстративные CLEC12A-нацеливающихся TriNKET рассматриваются в форматах F3' и F3. Как описано выше, в формате F3' антигенсвязывающий участок, который связывает опухолеассоциированный антиген, представляет собой scFv, а антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой Fab. В формате F3 антигенсвязывающий участок, который связывает опухолеассоциированный антиген, представляет собой Fab, и антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В каждом TriNKET scFv может содержать замену Cys в VH- и VL-областях, способствующую образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv.

**[0486]** VH и VL scFv могут быть соединены посредством линкера, например, пептидного линкера. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой гибкий линкер. Что касается аминокислотного состава линкера, то пептиды выбраны со свойствами, которые придают гибкость, не влияют на структуру и функцию других доменов белков, описанных в настоящей заявке, и устойчивы к расщеплению протеазами. Например, остатки глицина и серина обычно обеспечивают устойчивость к протеазам. В определенных вариантах осуществления VL связан на N-конце или C-конце с VH посредством линкера $(GlyGlyGlyGlySer)_4$ $((G_4S)_4)$ (SEQ ID NO:119).

**[0487]** В отношении своей длины линкер (например, гибкого линкера) может быть "коротким", например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков или "длинным", например, по меньшей мере 13 аминокислотных остатков. В определенных вариантах осуществления длина линкера составляет 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.

**[0488]** В определенных вариантах осуществления линкер содержит последовательности $(GS)_n$ (SEQ ID NO:120), $(GGS)_n$ (SEQ ID NO:121), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:122), $(GGSG)_n$ (SEQ ID NO:123), $(GGSGG)_n$ (SEQ ID NO:124) и $(GGGGS)_n$ (SEQ ID

NO:125), где n равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, или состоит из них. В определенных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:119 и SEQ ID NO:126-134, как перечислено в таблице 10, или состоит из нее.

| Таблица 10 | |
|---|---|
| SEQ ID | Аминокислотная последовательность |
| SEQ ID NO:126 | GSGSGSGSGSGSGSGSGS |
| SEQ ID NO:127 | GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS |
| SEQ ID NO:128 | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS GS |
| SEQ ID NO:129 | GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS G |
| SEQ ID NO:130 | GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGG |
| SEQ ID NO:131 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGS |
| SEQ ID NO:119 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS |
| SEQ ID NO:132 | GGGGSGGGGSGGGGS |
| SEQ ID NO:133 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS |
| SEQ ID NO:134 | GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG |

**[0489]** В F3'-TriNKET scFv, связывающий опухолеассоциированный антиген, связан с N-концом Fc посредством линкера Gly-Ser. Линкер Ala-Ser или Gly-Ser включен в последовательность изгиба шарнирной области, чтобы создать баланс между гибкостью и оптимальной геометрией. В определенных вариантах осуществления дополнительная последовательность Thr-Lys-Gly может быть добавлена на N-конце или C-конце к последовательности Ala-Ser или Gly-Ser в шарнирном участке.

**[0490]** Как используется в данном документе для описания этих иллюстративных TriNKET, Fc предусматривает шарнирный участок, CH2 и CH3 антитела. В каждом иллюстративном TriNKET Fc-домен, связанный с scFv, содержит мутации Q347R, D399V

и F405T, а Fc-домен, связанный с Fab, содержит соответствующие мутации K360E и K409W для образования гетеродимера. Fc-домен, связанный с scFv, дополнительно содержит замену S354C в домене CH3, посредством которой образуется дисульфидная связь с участием замены Y349C в Fc, связанном с Fab. Эти замены выделены жирным шрифтом в последовательностях, описанных в данном подразделе.

**[0491]** Например, TriNKET по настоящему изобретению представляет собой TriNKET F3'-1602, также обозначаемое в данном документе как "TriNKET hF3'-1602" и "AB0237". TriNKET F3'-1602 содержит (a) последовательность CLEC12A-связывающего scFv, полученную из scFv-1602 из таблицы 2, при ориентации VH, предусматривающей его расположение на N-конце по отношению к VL, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, содержащий часть, представленную тяжелой цепью, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. TriNKET F3'-1602 содержит три полипептида, представляющие собой scFv-1602-VH-VL-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL.

*scFv-1602-VH-VL-Fc* (SEQ ID NO:259) ("цепь S")

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDY
NPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPS
RFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

*A49MI-VH-CH1-Fc* (SEQ ID NO:260) ("цепь H")

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIY
YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGT
LVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR
DELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

*A49MI-VL-CL* (SEQ ID NO:261) ("цепь L")
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**[0492]** scFv-1602-VH-VL-Fc представляет собой полноразмерную последовательность CLEC12A-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом посредством шарнирного участка, содержащего Gly-Ser. Fc-домен, связанный с scFv, содержит замены Q347R, D399V и F405T для обеспечения гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с участием замены Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv имеет аминокислотную последовательность scFv-1602, которая предусматривает вариабельный домен тяжелой цепи scFv-1602, соединенный с N-концом вариабельного домена легкой цепи scFv-1602 посредством линкера $(G_4S)_4$. scFv-1602-VH-VL-Fc содержит замену Cys в VH- и VL-областях в G44 и S100, способствующую образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv.

**[0493]** A49MI-VH-CH1-Fc представляет часть Fab-фрагмента, представленную тяжелой цепью, которая содержит вариабельный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:95) NKG2D-связывающего A49MI и домен CH1, соединенный с Fc-доменом. Fc-домен в A49MI-VH-CH1-Fc содержит замену Y349C в домене CH3, посредством которой образуется дисульфидная связь с участием замены S354C в Fc в scFv-1602-VH-VL-Fc. В A49MI-VH-CH1-Fc Fc-домен также содержит замены K360E и K409W для обеспечения гетеродимеризации с Fc в scFv-1602-VH-VL-Fc.

**[0494]** A49MI-VL-CL представляет часть Fab-фрагмента, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи NKG2D-связывающего A49MI (SEQ ID NO:85) и константный домен легкой цепи.

**[0495]** Последовательности ДНК, кодирующие полипептиды scFv-1602-VH-VL-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL, представлены в таблице 260.

Таблица 260. Последовательности ДНК TriNKET F3'-1602

| Полипептид | Последовательность ДНК |
|---|---|
| scFv-1602-VH-VL-Fc | ATGGACATGAGGGTACCAGCTCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGC<br>TTTGGCTTCCTGGCGCTAGATGCCAATTGCAGCTGCAAGAATC<br>CGGACCAGGGCTCGTAAAACCTTCTGAAACCCTCTCCCTCACT<br>TGCACTGTGTCTGGATTCTCTCTCACGAACTACGGGTTGCATT<br>GGATCCGACAGCCGCCTGGCAAGTGTCTTGAGTGGATTGGCGT<br>TATCTGGTCAGGAGGGAAGACGGATTATAATCCAAGTCTGAA<br>ATCCAGAGTGACAATTTCTAAGGACACGTCCAAAAATCAGTTT<br>AGCCTCAAACTTTCCTCAGTTCAGGCTGCTGATACAGCGGTGT<br>ACTATTGCGCAAAGTACGACTATGATGACAGTTTGGACTACTG<br>GGGACAGGGTACACTGGTAACAGTGAGTTCTGGAGGCGGCGG<br>TAGTGGAGGCGGGGGAAGTGGTGGCGGAGGGAGTGGAGGAG<br>GGGGCAGTGATATTCAAATGACGCAGAGCCCCAGTTCCCTTTC<br>AGCTAGCGTTGGCGACAGAGTAACGATAACGTGTCACGCTTCC<br>CAGAACATTAATTTTTGGCTTAGCTGGTATCAACAGAAACCGG<br>GAAAAGCACCCAAGCTGCTTATCTATGAAGCGTCCAATCTCCA<br>CACGGGTGTCCCATCAAGATTTTCTGGATCAGGCAGTGGCACA<br>CGATTCACACTGACCATTAGTTCCTTGCAGCCCGAGGATATCG<br>CAACTTACTACTGTCAGCAAAGTCACTCTTACCCGTTGACATT<br>CGGATGTGGAACTAAACTGGAGATTAAGGGATCCGATAAGAC<br>CCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGA<br>CCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGAT<br>GATCAGCAGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGT<br>GTCTCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGA<br>CGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGA<br>ACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT<br>GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA<br>GGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATC<br>AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTAGAGTGTATACC<br>TTGCCTCCATGCCGGGACGAGCTGACCAAGAATCAGGTGTCCC<br>TGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGT<br>GGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGA<br>CCACACCTCCTGTGCTGGTGTCCGACGGCAGCTTTACCCTGTA<br>CAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCA |

| Полипептид | Последовательность ДНК |
|---|---|
| | ACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA<br>CTACACCCAGAAAAGCCTGAGCCTGTCTCCTGGCTAA<br>[SEQ ID NO:267] |
| A49MI-VH-CH1-Fc | ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCA<br>CAGGCGTGCACTCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCG<br>GACTTGTGAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC<br>CAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTACAGCATGAACTGGGTCCGA<br>CAGGCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCAGCATCAGC<br>AGCAGCTCCAGCTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGC<br>AGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC<br>CTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTAC<br>TATTGTGCTAGAGGCGCCCCTATTGGAGCCGCCGCTGGATGGT<br>TCGATCCTTGGGGACAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTTCTGC<br>CTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGC<br>AAGAGCACAAGCGGAGGAACAGCTGCCCTGGGCTGTCTGGTC<br>AAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACAGCG<br>GAGCACTGACTAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCA<br>AAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCT<br>AGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACC<br>ACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCA<br>AGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCC<br>AGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAG<br>CCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACC<br>TGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAG<br>TTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG<br>ACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTG<br>GTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCA<br>AAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTC<br>CTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCG<br>AACCTCAAGTCTGTACACTGCCTCCTAGCCGGGATGAGCTGAC<br>CGAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTAC<br>CCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCA<br>GAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGAC |

| Полипептид | Последовательность ДНК |
|---|---|
| | GGCTCATTCTTCCTGTACAGCTGGCTGACCGTGGACAAGTCCA<br>GATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACG<br>AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAG<br>CCCAGGCTAA<br>[SEQ ID NO:268] |
| A49MI-VL-CL | ATGGACATGAGAGTTCCAGCTCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGC<br>TTTGGCTTCCTGGCGCTAGATGCGACATCCAGATGACACAGAG<br>CCCCAGCTCCGTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATC<br>ACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCTCTTCTTGGCTGGCCTGGT<br>ATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTATGC<br>CGCTAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCCTCTAGATTTTCTGGCA<br>GCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGCA<br>GCCTGAGGACTTCGCCACCTACTATTGTCAGCAGGGCGTGTCC<br>TTTCCACGGACCTTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAG<br>CGGACAGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGCG<br>ACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT<br>GAACAACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT<br>GGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGAC<br>AGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCAC<br>CCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTA<br>CGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACC<br>AAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGTTGA<br>[SEQ ID NO:269] |

**[0496]** В другом примере TriNKET по настоящему изобретению представляет собой TriNKET hF3'-2061, также обозначаемое в данном документе как TriNKET F3'2061. TriNKET F3'-2061 содержит (a) последовательность CLEC12A-связывающего scFv, полученную из scFv-2061 из таблицы 2, при ориентации VH, предусматривающей его расположение на C-конце по отношению к VL, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, содержащий часть, представленную тяжелой цепью, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. TriNKET F3'-

2061 содержит три полипептида: scFv-2061-VL-VH-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL.

*scFv-2061-VL-VH-Fc* (SEQ ID NO:262)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPS
RFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDY
NPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

**[0497]** scFv-2061-VL-VH-Fc представляет собой полноразмерную последовательность связывающего опухолеассоциированный антиген scFv, связанную с Fc-доменом посредством шарнирного участка, содержащего Gly-Ser. Fc-домен, связанный с scFv, содержит замены Q347R, D399V и F405T для обеспечения гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с участием замены Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv имеет аминокислотную последовательность scFv-2061, которая предусматривает вариабельный домен тяжелой цепи scFv-2061, соединенный с C-концом вариабельного домена легкой цепи scFv-2061 посредством линкера $(G_4S)_4$. Предполагается, что scFv-2061-VL-VH-Fc может содержать замену Cys в VH- и VL-областях, способствующую образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv.

**[0498]** A49MI-VH-CH1-Fc представляет часть Fab-фрагмента, представленную тяжелой цепью, которая содержит вариабельный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:95) NKG2D-связывающего A49MI и домен CH1, соединенный с Fc-доменом. Fc-домен в A49MI-VH-CH1-Fc содержит замену Y349C в домене CH3, посредством которой образуется дисульфидная связь с участием замены S354C в Fc в scFv-2061-VL-VH-Fc. В A49MI-VH-CH1-Fc Fc-домен также содержит замены K360E и K409W для обеспечения гетеродимеризации с Fc в scFv-2061-VL-VH-Fc.

**[0499]** A49MI-VL-CL представляет часть Fab-фрагмента, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи NKG2D-связывающего A49MI (SEQ ID NO:85) и константный домен легкой цепи.

**[0500]** В другом примере TriNKET по настоящему изобретению представляет собой TriNKET AB0089. TriNKET AB0089 содержит (a) последовательность CLEC12A-связывающего scFv, полученную из AB0305 из таблицы 2, при ориентации VH, предусматривающей его расположение на N-конце по отношению к VL, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, содержащий часть, представленную тяжелой цепью, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. TriNKET AB0089 содержит три полипептида: AB0305-VH-VL-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL.

*AB0305-VH-VL-Fc* (SEQ ID NO:276)
QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWVGGATDY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDTLDYWGQGTLVTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

**[0501]** AB0305-VH-VL-Fc представляет собой полноразмерную последовательность связывающего опухолеассоциированный антиген scFv, связанную с Fc-доменом посредством шарнирного участка, содержащего Gly-Ser. Fc-домен, связанный с scFv, содержит замены Q347R, D399V и F405T для обеспечения гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с участием замены Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи AB0305, соединенный с N-концом вариабельного домена легкой цепи AB0305 посредством линкера $(G_4S)_4$. AB0305-VH-VL-Fc содержит замену Cys в VH- и VL-областях в G44 и S100, способствующую образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv.

**[0502]** A49MI-VH-CH1-Fc представляет часть Fab-фрагмента, представленную тяжелой цепью, которая содержит вариабельный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:95) NKG2D-связывающего A49MI и домен CH1, соединенный с Fc-доменом. Fc-домен в

A49MI-VH-CH1-Fc содержит замену Y349C в домене CH3, посредством которой образуется дисульфидная связь с участием замены S354C в Fc в AB0305-VH-VL-Fc. В A49MI-VH-CH1-Fc Fc-домен также содержит замены K360E и K409W для обеспечения гетеродимеризации с Fc в AB0305-VH-VL-Fc.

**[0503]** A49MI-VL-CL представляет часть Fab-фрагмента, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи NKG2D-связывающего A49MI (SEQ ID NO:85) и константный домен легкой цепи.

**[0504]** В другом примере TriNKET по настоящему изобретению представляет собой TriNKET AB0147. TriNKET AB0147 содержит (a) последовательность CLEC12A-связывающего scFv, полученную из AB0304 из таблицы 2, при ориентации VH, предусматривающей его расположение на N-конце по отношению к VL, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, содержащий часть, представленную тяжелой цепью, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. TriNKET AB0147 содержит три полипептида AB0304-VH-VL-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL.

*AB0304-VH-VL-Fc* (SEQ ID NO:277)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVILSGGWTDYN
PSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDALDYWGQGTLVTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPS
RFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

**[0505]** AB0304-VH-VL-Fc представляет собой полноразмерную последовательность связывающего опухолеассоциированный антиген scFv, связанную с Fc-доменом посредством шарнирного участка, содержащего Gly-Ser. Fc-домен, связанный с scFv, содержит замены Q347R, D399V и F405T для обеспечения гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с участием замены Y349C в A49MI-VH-CH1-

Fc, как описано ниже. scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи AB0304, соединенный с N-концом вариабельного домена легкой цепи AB0304 посредством линкера $(G_4S)_4$. AB0304-VH-VL-Fc содержит замену Cys в VH- и VL-областях в G44 и S100, способствующую образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv.

**[0506]** A49MI-VH-CH1-Fc представляет часть Fab-фрагмента, представленную тяжелой цепью, которая содержит вариабельный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:95) NKG2D-связывающего A49MI и домен CH1, соединенный с Fc-доменом. Fc-домен в A49MI-VH-CH1-Fc содержит замену Y349C в домене CH3, посредством которой образуется дисульфидная связь с участием замены S354C в Fc в AB0037-VH-VL-Fc. В A49MI-VH-CH1-Fc Fc-домен также содержит замены K360E и K409W для обеспечения гетеродимеризации с Fc в AB0304-VH-VL-Fc.

**[0507]** A49MI-VL-CL представляет часть Fab-фрагмента, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи NKG2D-связывающего A49MI (SEQ ID NO:85) и константный домен легкой цепи.

**[0508]** В другом примере TriNKET по настоящему изобретению представляет собой TriNKET AB0192. TriNKET AB0192 содержит (a) последовательность CLEC12A-связывающего scFv, полученную из AB0192 из таблицы 2, при ориентации VH, предусматривающей его расположение на N-конце по отношению к VL, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, содержащий часть, представленную тяжелой цепью, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. TriNKET AB0192 содержит три полипептида AB0192-VH-VL-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL.

*AB0192-VH-VL-Fc* (SEQ ID NO:278)

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNAFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIY
YANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDYWGQGTSV
TVSS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPS
RFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

KAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

**[0509]** AB0192-VH-VL-Fc представляет собой полноразмерную последовательность связывающего опухолеассоциированный антиген scFv, связанную с Fc-доменом посредством шарнирного участка, содержащего Gly-Ser. Fc-домен, связанный с scFv, содержит замены Q347R, D399V и F405T для обеспечения гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с участием замены Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи AB0192, соединенный с N-концом вариабельного домена легкой цепи AB0192 посредством линкера $(G_4S)_4$. AB0192-VH-VL-Fc содержит замену Cys в VH- и VL-областях в G44 и S100, способствующую образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv.

**[0510]** A49MI-VH-CH1-Fc представляет часть Fab-фрагмента, представленную тяжелой цепью, которая содержит вариабельный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:95) NKG2D-связывающего A49MI и домен CH1, соединенный с Fc-доменом. Fc-домен в A49MI-VH-CH1-Fc содержит замену Y349C в домене CH3, посредством которой образуется дисульфидная связь с участием замены S354C в Fc в AB0192-VH-VL-Fc. В A49MI-VH-CH1-Fc Fc-домен также содержит замены K360E и K409W для обеспечения гетеродимеризации с Fc в AB0192-VH-VL-Fc.

**[0511]** A49MI-VL-CL представляет часть Fab-фрагмента, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи NKG2D-связывающего A49MI (SEQ ID NO:85) и константный домен легкой цепи.

**[0512]** В другом примере TriNKET по настоящему изобретению представляет собой TriNKET hF3'-1295, также обозначаемое в данном документе как TriNKET F3'-1295. TriNKET F3'-1295 включает (a) последовательность CLEC12A-связывающего scFv, полученную из scFv-1295 из таблицы 2, при ориентации VH, предусматривающей его расположение на N-конце по отношению к VL, связанную с Fc-доменом, и (b) NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49MI, содержащий часть, представленную тяжелой цепью, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. TriNKET F3'-1295 содержит три полипептида scFv-1295-VH-VL-Fc, A49MI-VH-CH1-Fc и A49MI-VL-CL.

*scFv-1295-VH-VL-Fc* (SEQ ID NO:281)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDY
NPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPS
RFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

**[0513]** scFv-1295-VH-VL-Fc представляет собой полноразмерную последовательность связывающего опухолеассоциированный антиген scFv, связанную с Fc-доменом посредством шарнирного участка, содержащего Gly-Ser. Fc-домен, связанный с scFv, содержит замены Q347R, D399V и F405T для обеспечения гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с участием замены Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи scFv-1295, соединенный с N-концом вариабельного домена легкой цепи scFv-1295 посредством линкера $(G_4S)_4$. scFv-1295-VH-VL-Fc содержит замену Cys в VH- и VL-областях в G44 и S100, способствующую образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv.

**[0514]** A49MI-VH-CH1-Fc представляет часть Fab-фрагмента, представленную тяжелой цепью, которая содержит вариабельный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:95) NKG2D-связывающего A49MI и домен CH1, соединенный с Fc-доменом. Fc-домен в A49MI-VH-CH1-Fc содержит замену Y349C в домене CH3, посредством которой образуется дисульфидная связь с участием замены S354C в Fc в AB0192-VH-VL-Fc. В A49MI-VH-CH1-Fc Fc-домен также содержит замены K360E и K409W для обеспечения гетеродимеризации с Fc в scFv-1295-VH-VL-Fc.

**[0515]** A49MI-VL-CL представляет часть Fab-фрагмента, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи NKG2D-связывающего A49MI (SEQ ID NO:85) и константный домен легкой цепи.

**[0516]** В другом примере TriNKET по настоящему изобретению представляет собой TriNKET F3 1602, также обозначаемое в данном документе как AB0010. TriNKET F3 1602 содержит (a) NKG2D-связывающую последовательность scFv, полученную из scFv-A49MI из таблицы 1, при ориентации VH, предусматривающей его расположение на N-конце по

отношению к VL, связанную с Fc-доменом, и (b) CLEC12A-связывающий Fab-фрагмент, полученный из scFv-1602, содержащий часть, представленную тяжелой цепью, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и часть, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, где домен CH1 соединен с Fc-доменом. TriNKET F3 1602 содержит три полипептида scFv-A49MI-VH-VL-Fc, 1602-VH-CH1-Fc и 1602-VL-CL.

*scFv-A49MI-VH-VL-Fc* (SEQ ID NO:286)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIY
YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGT
LVTVSS
GS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

*1602-VH-CH1-Fc* (SEQ ID NO:287)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWSGGKTDY
NPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR
DELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

*1602-VL-CL* (SEQ ID NO:288)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPS
RFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**[0517]** scFv-A49MI-VH-VL-Fc представляет собой полноразмерную последовательность NKG2D-связывающего scFv A49MI, связанную с Fc-доменом посредством шарнирного участка, содержащего Gly-Ser. Fc-домен, связанный с scFv, содержит замены Q347R, D399V и F405T для обеспечения гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с участием замены Y349C в A49MI-VH-CH1-Fc, как описано ниже. scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи scFv-1295, соединенный с N-концом вариабельного домена легкой цепи scFv-A49MI посредством линкера $(G_4S)_4$. scFv-A49MI-VH-VL-Fc содержит замену Cys в VH- и VL-областях в G44 и S100, способствующую образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv.

**[0518]** 1602-VH-CH1-Fc представляет собой часть Fab-фрагмента, представленную тяжелой цепью, которая содержит вариабельный домен тяжелой цепи CLEC12A-связывающего 1602 и домен CH1, соединенный с Fc-доменом. Fc-домен в 1602-VH-CH1-Fc содержит замену Y349C в домене CH3, посредством которой образуется дисульфидная связь с участием замены S354C в Fc в scFv-A49MI-VH-VL-Fc. В 1602-VH-CH1-Fc Fc-домен также содержит замены K360E и K409W для обеспечения гетеродимеризации с Fc в scFv-A49MI-VH-VL-Fc.

**[0519]** 1602-VL-CL представляет часть Fab-фрагмента, представленную легкой цепью, содержащую вариабельный домен легкой цепи CLEC12A-связывающего 1602 и константный домен легкой цепи.

**[0520]** В определенных вариантах осуществления TriNKET по настоящему изобретению идентично одному из вышеописанных иллюстративных TriNKET, которое содержит мутации Fc EW-RVT, за исключением того, что Fc-домен, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, содержит замены Q347R, D399V и F405T, и Fc-домен, связанный со связывающим опухолеассоциированный антиген scFv, содержит соответствующие замены K360E и K409W для образования гетеродимера. В определенных вариантах осуществления TriNKET по настоящему изобретению идентично одному из вышеописанных иллюстративных TriNKET, которое содержит мутации Fc KiH, за исключением того, что Fc-домен, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, содержит замены T366S, L368A и Y407V, обеспечивающие образование "впадины", и Fc-домен, связанный с scFv, связывающим опухолеассоциированный антиген, содержит замену T366W, обеспечивающую образование "выступа", для образования гетеродимера.

**[0521]** В определенных вариантах осуществления TriNKET по настоящему изобретению идентично одному из вышеописанных иллюстративных TriNKET, за исключением того, что Fc-домен, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, содержит замену S354C в домене CH3, и Fc-домен, связанный с scFv, связывающим

опухолеассоциированный антиген, содержит соответствующую замену Y349C в домене CH3 для образования дисульфидной связи.

**[0522]** Специалисту в данной области техники будет понятно, что во время получения и/или хранения белков N-концевой глутамат (E) или глутамин (Q) могут подвергаться циклизации с образованием лактама (например, спонтанно или при катализе ферментом, присутствующим во время получения и/или хранения). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, где N-концевой остаток аминокислотной последовательности полипептида представляет собой E или Q, в данном документе также рассматривается соответствующая аминокислотная последовательность с E или Q, замененными пироглутаматом.

**[0523]** Специалисту в данной области также будет понятно, что во время получения и/или хранения белка C-концевой лизин (K) белка может быть удален (например, спонтанно или при катализе ферментом, присутствующим во время получения и/или хранения). Такое удаление K часто наблюдается в случае белков, 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 данном документе также рассматривается соответствующая аминокислотная последовательность с удаленным K.

**[0524]** Вышеописанные мультиспецифические белки можно получать с применением технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалисту в данной области техники. 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; при этом первым, вторым и третьим векторами экспрессии можно стабильно совместно трансфицировать клетки-хозяева с получением мультимерных белков.

**[0525]** Для достижения наиболее высокого выхода мультиспецифического белка можно исследовать различные соотношения первого, второго и третьего вектора экспрессии, чтобы определить оптимальное соотношение для трансфекции клеток-хозяев. После трансфекции отдельные клоны могут быть выделены для создания банка клеток с применением способов, известных из уровня техники, таких как предельное разбавление, ELISA, FACS, микроскопия или Clonepix.

**[0526]** В настоящей заявке также предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который является частью мультиспецифического белка, предусмотренного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит три полипептида. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит (a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:276; (b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:260; и (c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:261. В определенных вариантах осуществления в настоящей заявке предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая каждый из трех полипептидов, которые являются частью мультиспецифического белка. В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:276. В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:260. В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:261.

**[0527]** В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрена клетка, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, который является частью мультиспецифического белка, предусмотренного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит одну или несколько нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует один или несколько из трех полипептидов, которые являются частью мультиспецифического белка. В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрена клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, которая кодирует первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:276. В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрена клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, которая кодирует второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:260. В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрена клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, которая кодирует третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:261.

**[0528]** Также в данном документе предусмотрены способы получения или создания мультиспецифического белка, предусмотренного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает (a) культивирование клетки-хозяина в

условиях, подходящих для экспрессии белка, при этом клетка-хозяин содержит одну или несколько нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует один или несколько полипептидов, которые являются частью мультиспецифического белка; и (b) выделение и очистку белка. В некоторых вариантах осуществления способ включает (a) культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии белка, при этом клетка-хозяин содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:276, вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:260, и третью нуклеиновую кислоту, кодирующую третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:261; и (b) выделение и очистку белка.

**[0529]** Клоны можно культивировать в условиях, подходящих для масштабирования при продуцировании в биореакторе и поддержания экспрессии мультиспецифического белка. Мультиспецифические белки можно выделять и очищать с применением способов, известных из уровня техники, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, лизис клеток, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, ионообменную хроматографию гидрофобного взаимодействия и хроматографию в смешанном режиме.

## II. Характеристики мультиспецифических белков

**[0530]** Мультиспецифические белки, описанные в данном документе, содержат NKG2D-связывающий участок, связывающий опухолеассоциированный антиген участок, который связывает CLEC12A, и Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16, или антигенсвязывающий участок, который связывает CD16. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки содержат дополнительный антигенсвязывающий участок, который связывается с тем же опухолеассоциированным антигеном (CLEC12A), что и проиллюстрированный для формата F4-TriNKET (например, фиг. 2C и 2D).

**[0531]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки демонстрируют термостабильность, сходную с соответствующим моноклональным антителом, т. е. моноклональным антителом, содержащим тот же связывающий опухолеассоциированный антиген участок, что и участок, включенный в мультиспецифические белки.

**[0532]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки одновременно связываются с клетками, экспрессирующими NKG2D и/или CD16, такими как NK-клетки, и клетками, экспрессирующими CLEC12A, такими как определенные

опухолевые клетки. Связывание мультиспецифических белков с NK-клетками может усиливать активность NK-клеток в отношении разрушения опухолевых клеток, экспрессирующих опухолеассоциированный антиген. Сообщалось, что NK-клетки проявляют более сильную цитотоксичность в отношении клеток-мишеней, подвергнутых стрессовому условию (см. Chan *et al.*, (2014) Cell Death Differ. 21(1): 5-14). Без ограничения какой-либо теорией предполагается, что при взаимодействии NK-клеток с популяцией клеток, обеспечиваемом TriNKET, NK-клетки могут селективно уничтожать клетки-мишени, подвергнутые стрессовому условию (например, злокачественные клетки и клетки в микроокружении опухоли). Этот механизм может способствовать повышению специфичности и снижению токсичности TriNKET, что делает возможным избирательное удаление подвергнутых стрессовому условию клеток, даже если экспрессия опухолеассоциированного антигена не ограничена требуемыми клетками-мишенями.

**[0533]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки индуцируют антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки индуцируют активность, подобную антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки индуцируют активность ADCC. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки не индуцируют комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

**[0534]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки связываются с опухолеассоциированным антигеном с аффинностью, сходной с таковой для соответствующего моноклонального антитела к опухолеассоциированному антигену (т. е. моноклонального антитела, содержащего тот же связывающий опухолеассоциированный антиген участок, что и участок, включенный в мультиспецифические белки). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки являются более эффективными в отношении уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих опухолеассоциированный антиген, чем соответствующие моноклональные антитела.

**[0535]** В определенных вариантах осуществления мультиспецифические белки, описанные в данном документе, которые содержат участок связывания для опухолеассоциированного антигена, активируют первичные NK-клетки человека при совместном культивировании с клетками, экспрессирующими этот опухолеассоциированный антиген. Активация NK-клеток отмечена усилением дегрануляции CD107a и выработки цитокина IFN-γ. Кроме того, по сравнению с соответствующим моноклональным антителом к опухолеассоциированному антигену

мультиспецифические белки могут демонстрировать более сильную активацию NK-клеток человека в присутствии клеток, экспрессирующих опухолеассоциированный антиген.

**[0536]** В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки, описанные в данном документе, которые содержат участок связывания для опухолеассоциированного антигена, усиливают активность выдержанных в состоянии покоя и IL-2-активированных NK-клеток человека при совместном культивировании с клетками, экспрессирующими опухолеассоциированный антиген.

**[0537]** В некоторых вариантах осуществления по сравнению с соответствующим моноклональным антителом, которое связывается с опухолеассоциированным антигеном, мультиспецифические белки обеспечивают преимущество в отношении нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют средние и низкие уровни опухолеассоциированного антигена.

**[0538]** В некоторых вариантах осуществления двухвалентный формат F4 TriNKET (т. е. TriNKET содержат дополнительный антигенсвязывающий участок, который связывается с опухолеассоциированным антигеном) улучшает авидность, с которой TriNKET связываются с опухолеассоциированным антигеном, что в результате стабилизирует экспрессию и поддержание высоких уровней опухолеассоциированного антигена на поверхности опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления F4-TriNKET опосредуют более эффективное уничтожение опухолевых клеток, чем соответствующие F3-TriNKET или F3'-TriNKET.

## III. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОСТАВЫ

**[0539]** Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтические составы, которые содержат терапевтически эффективное количество мультиспецифического связывающего белка, раскрытого в данном документе (например, F3'-1602). Фармацевтический состав содержит одно или несколько вспомогательных веществ и поддерживается при определенном pH. Термин "вспомогательное вещество", используемый в данном документе, означает любое нетерапевтическое средство, добавляемое к составу для обеспечения требуемого физического или химического свойства, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения.

*Вспомогательные вещества и pH*

**[0540]** Одно или несколько вспомогательных веществ в фармацевтическом составе на основе мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке,

предусматривают буферное средство. Термин "буферное средство", используемый в данном документе, относится к одному или нескольким компонентам, которые в случае добавления к водному раствору способны защищать раствор от изменений pH при добавлении кислоты или щелочи или при разбавлении растворителем. В дополнение к фосфатным буферам могут применяться глицинатный, карбонатный, цитратный, гистидиновый буферы и т. п., при этом в данном случае противоионом могут служить ионы натрия, калия или аммония.

**[0541]** В определенных вариантах осуществления буфер или буферная система предусматривает по меньшей мере один буфер, который характеризуется буферным диапазоном, полностью или частично перекрывающимся с диапазоном pH 7,0-9,0. В определенных вариантах осуществления буфер характеризуется pKa приблизительно 7,0 ± 0,5. В определенных вариантах осуществления буфер характеризуется pKa приблизительно 7,5 ± 0,5.

**[0542]** В определенных вариантах осуществления буфер предусматривает цитратный буфер. В определенных вариантах осуществления цитрат присутствует в концентрации, составляющей 5-100 мМ, 10-100 мМ, 15-100 мМ, 20-100 мМ, 5-50 мМ, 10-50 мМ, 15-100 мМ, 20-100 мМ, 5-25 мМ, 10-25 мМ, 15-25 мМ, 20-25 мМ, 5-20 мМ, 10-20 мМ или 15-20 мМ. В определенных вариантах осуществления цитрат присутствует в концентрации, составляющей 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ или 50 мМ. В определенных вариантах осуществления цитрат присутствует в концентрации, составляющей 20 мМ.

**[0543]** В определенных вариантах осуществления буфер предусматривает или дополнительно предусматривает фосфатный буфер. В определенных вариантах осуществления фосфат присутствует в концентрации, составляющей 5-100 мМ, 10-100 мМ, 15-100 мМ, 20-100 мМ, 5-50 мМ, 10-50 мМ, 15-100 мМ, 20-100 мМ, 5-25 мМ, 10-25 мМ, 15-25 мМ, 20-25 мМ, 5-20 мМ, 10-20 мМ или 15-20 мМ. В определенных вариантах осуществления фосфат присутствует в концентрации, составляющей 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ или 50 мМ. В определенных вариантах осуществления фосфат присутствует в концентрации, составляющей 10 мМ. Следует понимать, что фосфат не является хорошо совместимым с лиофилизированной формой. Соответственно, в определенных вариантах осуществления концентрация фосфата в фармацевтическом составе, если таковой имеется, составляет 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 1 мМ, 0,5 мМ, 0,1 мМ, 50 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ или 1 мкМ или ниже. В определенных вариантах осуществления концентрация фосфата в фармацевтическом составе находится ниже предела обнаружения. В определенных вариантах осуществления при получении фармацевтического состава фосфат не добавляют.

**[0544]** Фармацевтический состав на основе мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, может характеризоваться pH выше 7,0. Например, в определенных вариантах осуществления фармацевтический состав характеризуется pH от 7,0 до 8,0 (т. е. 7,5 ± 0,5), от 7,0 до 7,8 (т. е. 7,4 ± 0,4), от 7,0 до 7,6 (т. е. 7,3 ± 0,3), от 7,0 до 7,4 (т. е. 7,2 ± 0,2), от 7,0 до 7,2 (т. е. 7,1 ± 0,1), от 7,1 до 7,3 (т. е. 7,2 ± 0,1), от 7,2 до 7,4 (т. е. 7,3 ± 0,1), от 7,3 до 7,5 (т. е. 7,4 ± 0,1), от 7,4 до 7,6 (т. е. 7,5 ± 0,1), от 7,5 до 7,7 (т. е. 7,6 ± 0,1), от 7,6 до 7,8 (т. е. 7,7 ± 0,1), от 7,7 до 7,9 (т. е. 7,8 ± 0,1) или от 7,8 до 8,0 (т. е. 7,9 ± 0,1). В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав характеризуется pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав характеризуется pH 7,0. В соответствии с используемыми в научной деятельности правилами округления значение pH, равное 6,95 или больше и равное 7,05 или меньше, округляется до 7,0.

**[0545]** Одно или несколько вспомогательных веществ в фармацевтическом составе на основе мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, дополнительно предусматривают сахар или сахарный спирт. Сахара и сахарные спирты являются применимыми в фармацевтических составах в качестве термостабилизаторов. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит сахар, например, моносахарид (глюкозу, ксилозу или эритрит), дисахарид (например, сахарозу, трегалозу, мальтозу или галактозу) или олигосахарид (например, стахиозу). В конкретных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит сахарозу. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит сахарный спирт, например, сахарный спирт, полученный из моносахарида (например, маннита, сорбита или ксилита), сахарный спирт, полученный из дисахарида (например, лактита или мальтита), или сахарный спирт, полученный из олигосахарида. В конкретных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит сорбит.

**[0546]** Количество сахара или сахарного спирта, содержащихся в составе, может варьироваться в зависимости от конкретных обстоятельств и предполагаемых целей, для которых применяется состав. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит 50-300 мМ, 50-250 мМ, 100-300 мМ, 100-250 мМ, 150-300 мМ, 150-250 мМ, 200-300 мМ, 200-250 мМ или 250-300 мМ сахара или сахарного спирта. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит 50 мМ, 75 мМ, 100 мМ, 125 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 250 мМ или 300 мМ сахара или сахарного спирта. В конкретных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит 250 мМ сахара или сахарного спирта (например, сахарозы или сорбита).

**[0547]** Одно или несколько вспомогательных веществ в фармацевтическом составе, раскрытом в данном документе, дополнительно предусматривают поверхностно-активное вещество. Термин "поверхностно-активное вещество", используемый в данном документе, относится к поверхностно-активной молекуле, содержащей как гидрофобную часть (например, алкильную цепь), так и гидрофильную часть (например, карбоксильную и карбоксилатную группы). Поверхностно-активные вещества являются применимыми в фармацевтических составах для уменьшения агрегации терапевтического белка. Поверхностно-активные вещества, подходящие для применения в фармацевтических составах, обычно представляют собой неионогенные поверхностно-активные вещества и включают без ограничения полисорбаты (например, полисорбаты 20 или 80); полоксамеры (например, полоксамер 188); сложные эфиры сорбитана и производные; Triton; лаурилсульфат натрия; октилгликозид натрия; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсульфобетадин; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсаркозин; линолеил-, миристил- или цетилбетаин; лаурамидопропил-кокамидопропил-, линолеамидопропил-, миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилбетаин (например, лауроамидопропил); миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилдиметиламин; натрия метилкокоил- или динатрия метилолеилтаурат и серию MONAQUAT$^{TM}$ (Mona Industries, Inc., Патерсон, Нью-Джерси, США), полиэтиленгликоль, полипропилгликоль и сополимеры этилена и пропиленгликоля (например, Pluronics, PF68 т. д.). В определенных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. В определенных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

**[0548]** Количество неионогенного поверхностно-активного вещества, содержащегося в фармацевтическом составе на основе мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, может варьироваться в зависимости от требуемых конкретных свойств состава, а также конкретных обстоятельств и целей, для которых составы предназначены для применения. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит от 0,005% до 0,5%, от 0,005% до 0,2%, от 0,005% до 0,1%, от 0,005% до 0,05%, от 0,005% до 0,02%, от 0,005% до 0,01%, от 0,01% до 0,5%, от 0,01% до 0,2%, от 0,01% до 0,1%, от 0,01% до 0,05% или от 0,01% до 0,02% неионогенного поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 80). В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45% или 0,5% неионогенного поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 80).

**[0549]** В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав является изотоническим. "Изотонический" состав представляет собой состав, осмотическое давление которого по существу такое же, как у крови человека. Изотонические составы обычно характеризуются осмотическим давлением, составляющим от приблизительно 250 до 350 мОсмоль/кг $H_2O$. Изотоничность можно измерить с помощью парофазного осмометра или осмометра для определения точки замерзания. В определенных вариантах осуществления осмолярность фармацевтического состава составляет 250-350 мОсмоль/кг $H_2O$. В определенных вариантах осуществления осмолярность фармацевтического состава составляет 300-350 мОсмоль/кг $H_2O$.

**[0550]** Вещества, такие как сахар, сахарный спирт и NaCl, могут быть включены в фармацевтический состав для достижения требуемой осмолярности. Следует понимать, что NaCl не является хорошо совместимым с лиофилизированной формой. Соответственно, в определенных вариантах осуществления концентрация NaCl в фармацевтическом составе, если таковой имеется, составляет 10 мМ, 9 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 1 мМ, 0,5 мМ, 0,1 мМ, 50 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ или 1 мкМ или ниже. В определенных вариантах осуществления концентрация NaCl в фармацевтическом составе находится ниже предела обнаружения. В определенных вариантах осуществления при получении фармацевтического состава соль NaCl не добавляют.

**[0551]** Фармацевтический состав на основе мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, может дополнительно содержать одно или несколько других веществ, таких как объемообразующее средство или консервант. "Объемообразующее средство" представляет собой соединение, которое увеличивает массу лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной массы (например, способствует получению по существу однородной лиофилизированной массы, которая сохраняет структуру с открытыми порами). Иллюстративные объемообразующие средства включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лиофилизированные составы на основе мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, могут содержать такие объемообразующие средства. Консервант уменьшает бактериальную активность и может, например, способствовать получению состава для многоразового (многодозового) применения.

*Иллюстративные составы*

**[0552]** В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав на основе мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке,

содержит мультиспецифический связывающий белок в буфере при pH 7,0 или выше (например, при pH от 7,0 до 8,0).

**[0553]** В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-200 мг/мл, 10-25 мМ цитрата, 200-300 мМ сахара или сахарного спирта (например, сахарозы) и от 0,005% до 0,05% полисорбата (например, полисорбата 80) при pH от 7,0 до 8,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-200 мг/мл, 20 мМ цитрата, 250 мМ сахара или сахарного спирта (например, сахарозы) и 0,01% полисорбата (например, полисорбата 80) при pH от 7,0 до 8,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-200 мг/мл, 20 мМ цитрата, 250 мМ сахара или сахарного спирта (например, сахарозы) и 0,01% полисорбата (например, полисорбата 80) при pH от 7,0 до 7,5 (например, pH 7,0).

**[0554]** В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-50 мг/мл, 10-25 мМ цитрата, 200-300 мМ сахара или сахарного спирта (например, сахарозы) и от 0,005% до 0,05% полисорбата (например, полисорбата 80) при pH от 7,0 до 8,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-50 мг/мл, 20 мМ цитрата, 250 мМ сахара или сахарного спирта (например, сахарозы) и 0,01% полисорбата (например, полисорбата 80) при pH от 7,0 до 8,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-50 мг/мл, 20 мМ цитрата, 250 мМ сахара или сахарного спирта (например, сахарозы) и 0,01% полисорбата (например, полисорбата 80) при pH от 7,0 до 7,5 (например, pH 7,0).

**[0555]** В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-200 мг/мл, 5-20 мМ цитрата, 5-20 мМ фосфата и 100-150 мМ NaCl при pH от 7,0 до 8,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-200 мг/мл, 10 мМ цитрата, 10 мМ фосфата и 125 мМ NaCl при pH от 7,0 до 8,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-200 мг/мл, 10 мМ цитрата, 10 мМ фосфата и 125 мМ NaCl при pH от 7,5 до 8,0 (например, pH 7,8).

**[0556]** В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-50 мг/мл, 5-20 мМ цитрата, 5-20 мМ фосфата и 100-150 мМ NaCl при pH от 7,0 до 8,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-50 мг/мл, 10 мМ цитрата, 10 мМ фосфата и 125 мМ NaCl при pH от 7,0 до 8,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации 10-50 мг/мл, 10 мМ цитрата, 10 мМ фосфата и 125 мМ NaCl при pH от 7,5 до 8,0 (например, pH 7,8).

*Стабильность мультиспецифического связывающего белка*

**[0557]** Фармацевтические составы на основе мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, демонстрируют высокие уровни стабильности. Фармацевтический состав является стабильным, когда мультиспецифический связывающий белок в составе сохраняет приемлемый уровень физического свойства, химической структуры и/или биологической функции после хранения при определенных условиях.

**[0558]** Стрессовые условия во время изготовления, хранения и применения фармацевтического состава включают без ограничения тепловой стресс (например, инкубацию при 40°C в течение 4 недель), воздействие стрессового условия, представляющего собой замораживание-оттаивание (например, после 6 циклов замораживания/оттаивания), воздействие стрессового условия, представляющего собой перемешивание (например, перемешивание при 60 об/мин при 4°C в течение 18 часов), воздействие стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (например, инкубацию при pH 5,0 при 40°C в течение 2 недель), воздействие стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (например, инкубацию при pH 8,0 при 40°C в течение 2 недель), окислительный стресс (например, принудительное окисление в 0,02% пероксида водорода при комнатной температуре в течение 24 часов) или выдерживание при низком уровне pH (например, инкубацию при pH 3,3 при комнатной температуре в течение 1,5 часа). В определенных вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок является стабильным после подвергания воздействию одного или нескольких из этих стрессовых условий.

**[0559]** Стабильность можно измерять путем определения в составе процентного содержания мультиспецифического связывающего белка, который остается в нативной конформации после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре. Процентное содержание белка в нативной конформации

можно определить, например, посредством эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии), когда белок в нативной конформации является неагрегированным (элюированным в высокомолекулярной фракции) или разрушенным (элюированным в низкомолекулярной фракции). В определенных вариантах осуществления менее чем 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1% мультиспецифического связывающего белка образует высокомолекулярный комплекс (т. е. имеющего более высокую молекулярную массу, чем нативный белок), как определено посредством эксклюзионной хроматографии, после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления разрушению подвергается менее чем 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1% мультиспецифического связывающего белка (т. е. имеющего более низкую молекулярную массу, чем нативный белок), как определено посредством эксклюзионной хроматографии, после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе.

**[0560]** Стабильность также может быть измерена путем определения процентного содержания мультиспецифического связывающего белка, присутствующего в более кислой фракции ("кислая форма") по отношению к основной фракции белка ("форма основного заряда"). Без привязки к какой-либо теории, дезамидирование белка может приводить к тому, что он станет более отрицательно заряженным, а следовательно более кислым по сравнению с белком, не подвергнутым дезамидированию (см., например, Robinson, Protein Deamidation, (2002) PNAS 99(8):5283-88). Процентное содержание кислой формы белка можно определить посредством ионообменной хроматографии (например, катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии) или капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (icIEF). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% мультиспецифического связывающего белка в фармацевтическом составе находится в форме основного заряда после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления не более чем 10%, 20%, 30%, 40% или 50% мультиспецифического связывающего белка в фармацевтическом составе находится в кислой форме после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе.

**[0561]** Стабильность также можно измерять путем определения чистоты мультиспецифического связывающего белка посредством электрофореза после денатурации белка додецилсульфатом натрия (SDS). Образец белка можно денатурировать в присутствии или в отсутствие средства, которое восстанавливает

дисульфидные связи в белке (например, β-меркаптоэтанола). В определенных вариантах осуществления чистота мультиспецифического связывающего белка в фармацевтическом составе, измеренная посредством капиллярного электрофореза после денатурации образца белка в восстанавливающих условиях (например, в присутствии β-меркаптоэтанола), составляет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления чистота мультиспецифического связывающего белка в фармацевтическом составе, измеренная посредством капиллярного электрофореза после денатурации образца белка в восстанавливающих условиях (например, в присутствии β-меркаптоэтанола), составляет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления чистота мультиспецифического связывающего белка в фармацевтическом составе, измеренная посредством капиллярного электрофореза после денатурации образца белка в невосстанавливающих условиях, составляет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления чистота мультиспецифического связывающего белка в фармацевтическом составе, измеренная посредством капиллярного электрофореза после денатурации образца белка в невосстанавливающих условиях, составляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе.

**[0562]** Стабильность также можно измерить путем определения параметров белкового раствора методом динамического рассеяния света. Средние Z-значения и значения коэффициента полидисперсности (PDI) указывают на средний диаметр частиц в растворе, и эти количественные показатели увеличиваются в том случае, если в растворе присутствуют агрегаты. Значение %Pd мономера указывает на распространение различных выявленных мономеров, при этом более низкие значения указывают на монодисперсный раствор, который является предпочтительным. Размер мономера, выявленный посредством DLS, является применимым для подтверждения того, что основная популяция представлена мономером, а также для определения характеристик любых агрегатов более высокого порядка, которые могут присутствовать. В определенных вариантах осуществления среднее Z-значение фармацевтического состава не увеличивается на более чем 5%, 10% или 15% после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах

осуществления значение PDI фармацевтического состава не увеличивается на более чем 10%, 20%, 30%, 40% или 50% после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе.

**[0563]** В дополнение к оценке вышеприведенных параметров стабильность можно также измерять путем определения функциональных характеристик белка. Мультиспецифические связывающие белки, раскрытые в данном документе, связывают CLEC12A, NKG2D и CD16. В соответствии с определенными вариантами осуществления аффинность связывания мультиспецифического связывающего белка с CLEC12A (например, CLEC12A человека) после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе, как измерено посредством константы диссоциации ($K_D$) или ответа при максимальном связывания (уровня захвата), не ниже на более чем 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20% или 30% таковой в контрольном образце (не подвергнутом воздействию стрессового условия). В определенных вариантах осуществления аффинность связывания мультиспецифического связывающего белка с NKG2D (например, NKG2D человека) после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе, как измерено посредством константы диссоциации ($K_D$) или ответа при максимальном связывания (уровня захвата), не ниже на более чем 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20% или 30% таковой в контрольном образце (не подвергнутом воздействию стрессового условия). В определенных вариантах осуществления аффинность связывания мультиспецифического связывающего белка с CD16 (например, V158 человеческого CD16a) после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе, как измерено посредством константы диссоциации ($K_D$) или ответа при максимальном связывания (уровня захвата), не ниже на более чем 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20% или 30% таковой в контрольном образце (не подвергнутом воздействию стрессового условия).

**[0564]** Мультиспецифический связывающий белок, раскрытый в данном документе, обладает способностью опосредовать цитотоксичность, направленную против CLEC12A-экспрессирующей опухолевой клетки, оказываемую NK-клетками. В определенных вариантах осуществления способность мультиспецифического связывающего белка опосредовать такую цитотоксичность после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе, как измерено посредством EC50 мультиспецифического связывающего белка в анализе цитотоксичности в смешанной культуре, не превышает таковую в контрольном образце (не подвергнутом воздействию стрессового условия) на более чем 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20% или 30%. В определенных вариантах осуществления способность мультиспецифического

связывающего белка опосредовать такую цитотоксичность после воздействия одного или нескольких стрессовых условий, раскрытых в данном документе, как измерено посредством максимального лизиса клеток-мишеней в анализе цитотоксичности в смешанной культуре, не превышает таковую в контрольном образце (не подвергнутом воздействию стрессового условия) на более чем 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20% или 30%.

**[0565]** Иллюстративные способы определения стабильности мультиспецифического связывающего белка в фармацевтическом составе описаны в примерах 13 и 14 настоящего изобретения. Кроме того, стабильность белка можно оценивать путем измерения аффинности связывания мультиспецифического связывающего белка с его мишенями или биологической активности мультиспецифического связывающего белка в определенных анализах *in vitro*, таких как анализы активации NK-клеток и анализы цитотоксичности, описанные в WO 2018/152518.

*Лекарственные формы*

**[0566]** Фармацевтический состав можно получать и хранить в виде жидкого состава или в лиофилизированном виде. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав представляет собой жидкий состав для хранения при 2-8°C (например, 4°C) или замороженный состав для хранения при -20°C или ниже. Сахар или сахарный спирт в составе используются в качестве лиопротектора.

**[0567]** Перед фармацевтическим применением фармацевтический состав может быть разбавлен или восстановлен в водном носителе, подходящем для пути введения. Другие иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), буферизованный раствор для доведения pH (например, буферизованный фосфатом солевой раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. Например, в случае если фармацевтический состав получают для внутривенного введения, фармацевтический состав можно разбавлять в 0,9% растворе хлорида натрия (NaCl). В определенных вариантах осуществления разбавленный фармацевтический состав является изотоническим и подходит для введения посредством внутривенной инфузии.

**[0568]** Фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации, подходящей для хранения. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации, составляющей 10-200 мг/мл, 10-150 мг/мл, 10-100 мг/мл, 10-50 мг/мл, 10-40 мг/мл, 10-30 мг/мл, 10-25 мг/мл, 10-20 мг/мл, 10-15 мг/мл, 20-200 мг/мл, 20-150 мг/мл, 20-100 мг/мл, 20-50 мг/мл, 20-40 мг/мл, 20-30 мг/мл, 20-25 мг/мл, 50-200 мг/мл, 50-150 мг/мл, 50-100 мг/мл, 100-200 мг/мл, 100-150 мг/мл или 150-200 мг/мл. В

определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в концентрации, составляющей 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл, 150 мг/мл или 200 мг/мл.

**[0569]** В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав упакован в контейнер (например, флакон, пакет, шприц-ручку или шприц). В определенных вариантах осуществления состав может представлять собой лиофилизированный состав или жидкий состав. В определенных вариантах осуществления количество мультиспецифического связывающего белка в контейнере подходит для введения в виде однократной дозы. В определенных вариантах осуществления количество мультиспецифического связывающего белка в контейнере подходит для введения в нескольких дозах. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в количестве, составляющем 0,1-2000 мг. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в количестве, составляющем 1-2000 мг, 10-2000 мг, 20-2000 мг, 50-2000 мг, 100-2000 мг, 200-2000 мг, 500-2000 мг, 1000-2000 мг, 0,1-1000 мг, 1-1000 мг, 10-1000 мг, 20-1000 мг, 50-1000 мг, 100-1000 мг, 200-1000 мг, 500-1000 мг, 0,1-500 мг, 1-500 мг, 10-500 мг, 20-500 мг, 50-500 мг, 100-500 мг, 200-500 мг, 0,1-200 мг, 1-200 мг, 10-200 мг, 20-200 мг, 50-200 мг, 100-200 мг, 0,1-100 мг, 1-100 мг, 10-100 мг, 20-100 мг, 50-100 мг, 0,1-50 мг, 1-50 мг, 10-50 мг, 20-50 мг, 0,1-20 мг, 1-20 мг, 10-20 мг, 0,1-10 мг, 1-10 мг или 0,1-1 мг. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит мультиспецифический связывающий белок в количестве, составляющем 0,1 мг, 1 мг, 2 мг, 5 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1000 мг, 1500 мг или 2000 мг.

## IV. Варианты терапевтического применения

**[0570]** В настоящей заявке предусмотрены способы лечения аутоиммунного заболевания или рака с применением мультиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе, и/или фармацевтической композиции (например, фармацевтического состава), описанного в данном документе. Способы могут применяться для лечения ряда различных видов рака, характеризующихся экспрессией CLEC12A.

**[0571]** Терапевтический способ может быть охарактеризован в зависимости от вида рака, подлежащего лечению. Рак, подлежащий лечению, может быть охарактеризован в

соответствии с присутствием определенного антигена, экспрессируемого на поверхности раковой клетки.

**[0572]** Виды рака, характеризующиеся экспрессией CLEC12A, включают без ограничения показания, относящиеся к солидным опухолям, таким как рак желудочно-кишечного тракта, рак пищевода, рак легкого, трижды негативный рак молочной железы, колоректальный рак и рак головы и шеи.

**[0573]** Предполагается, что белок, конъюгат, клетки и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут применяться для лечения ряда различных видов рака, не ограниченных видами рака, при которых раковые клетки или клетки в микроокружении рака экспрессируют CLEC12A.

**[0574]** Терапевтический способ может быть охарактеризован в зависимости от вида рака, подлежащего лечению. Например, в некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, тимому, аденоидную кистозную карциному, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки, рак молочной железы, глиобластому, рак легкого, рак яичника, рак головного мозга, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы или меланому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование или лейкемию. В определенных 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.

**[0575]** В определенных вариантах осуществления AML представлен минимальной остаточной болезнью (MRD). В определенных вариантах осуществления MRD характеризуется наличием или отсутствием мутации, выбранной из мутации CLEC12A-ITD (внутренних тандемных дупликаций (ITD) в гене (Fms-подобной тирозинкиназы 3)), NPM1 (нуклеофосмина 1), DNMT3A (гена ДНК-метилтрансферазы DNMT3A) и IDH (изоцитратдегидрогеназы 1 и 2 (IDH1 и IDH2)). В определенных вариантах осуществления MDS выбран из MDS с мультилинейной дисплазией (MDS-MLD), MDS с однолинейной дисплазией (MDS-SLD), MDS с кольцевыми сидеробластами (MDS-RS), MDS с избытком бластов (MDS-EB), MDS с изолированной del(5q) и неклассифицированного MDS (MDS-U). В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой первичный MDS или вторичный MDS.

**[0576]** В определенных вариантах осуществления ALL выбран из В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ALL) и Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (T-ALL). В определенных вариантах осуществления MPN выбрано из истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии (ET) и миелофиброза. В определенных вариантах осуществления неходжкинская лимфома выбрана из В-клеточной лимфомы и Т-клеточной лимфомы. В определенных вариантах осуществления лимфома выбрана из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), лимфобластной лимфомы (LPL), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Беркитта (BL), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (PMBL), фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, волосатоклеточного лейкоза, плазмоклеточной миеломы (PCM) или множественной миеломы (MM), новообразований из зрелых Т-/NK-клеток и гистиоцитарных новообразований.

**[0577]** В определенных вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В определенных других вариантах осуществления рак представляет собой рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, лейкоз, рак легкого, рак печени, меланому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак желудка, рак яичка или рак матки. В еще одних вариантах осуществления рак представляет собой васкуляризованную опухоль, плоскоклеточную карциному, аденокарциному, мелкоклеточную карциному, меланому, глиому, нейробластому, саркому (например, ангиосаркому или хондросаркому), рак гортани, рак околоушной железы, рак желчных путей, рак щитовидной железы, акральную лентигинозную меланому, актинические кератозы, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденоидную кистозную карциному, аденомы, аденосаркому, аденосквамозную карциному, рак анального канала, анальный рак, аноректальный рак, астроцитарную опухоль, карциному бартолиновой железы, базальноклеточную карциному, рак желчевыводящих путей, рак кости, рак костного мозга, рак бронхов, карциному бронхиальной железы, карциноид, холангиокарциному, хондросаркому, папиллому/карциному хориоидного сплетения, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, светлоклеточную карциному, рак соединительной ткани, цистаденому, рак пищеварительной системы, рак двенадцатиперстной кишки, рак эндокринной системы, опухоль эндодермального синуса, гиперплазию эндометрия, стромальную саркому эндометрия, эндометриоидную аденокарциному, эндотелиальноклеточный рак, эпендимальный рак, эпителиальноклеточный 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, глюкагоному, рак сердца, гемангиобластомы, гемангиоэндотелиому, гемангиомы, аденому печени, аденоматоз печени, гепатобилиарный рак, гепатоцеллюлярную карциному, болезнь Ходжкина, рак подвздошной кишки, инсулиному, интраэпителиальную неоплазию, интерэпителиальную плоскоклеточную неоплазию, рак внутрипеченочных желчных протоков, инвазивную плоскоклеточную карциному, рак тощей кишки, рак сустава, саркому Капоши, рак малого таза, крупноклеточную карциному, рак толстой кишки, лейомиосаркому, злокачественные лентиго-меланомы, 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 канала, рак нервной системы, нейроэпителиальную аденокарциному, узловую меланому, неэпителиальный рак кожи, неходжкинскую лимфому, овсяноклеточную карциному, олигодендроглиальный рак, рак полости рта, остеосаркому, папиллярную серозную аденокарциному, рак полового члена, рак глотки, опухоли гипофиза, плазмоцитому, псевдосаркому, легочную бластому, рак прямой кишки, почечноклеточную карциному, рак дыхательной системы, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому, серозную карциному, рак придаточных пазух носа, рак кожи, мелкоклеточную карциному, рак тонкой кишки, рак гладких мышц, рак мягких тканей, соматостатин-секретирующую опухоль, рак позвоночника, плоскоклеточную карциному, рак поперечно-полосатых 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.

**[0578]** В определенных других вариантах осуществления рак представляет собой неходжкинскую лимфому, такую как В-клеточная лимфома или Т-клеточная лимфома. В определенных вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой В-клеточную лимфому, такую как диффузная В-крупноклеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лимфома из клеток мантийной зоны, В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, экстранодальная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, узловая В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны,

селезеночная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, лимфома Беркитта, лимфоплазмоцитарная лимфома, волосатоклеточный лейкоз или первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС). В определенных других вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой Т-клеточную лимфому, такую как Т-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, периферическая Т-клеточная лимфома, кожная Т-клеточная лимфома, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, экстранодальная лимфома из естественных киллерных клеток/Т-клеток, Т-клеточная лимфома энтеропатического типа, Т-клеточная лимфома типа подкожного панникулита, анапластическая крупноклеточная лимфома или периферическая Т-клеточная лимфома.

## IV. Комбинированная терапия

**[0579]** Другой аспект настоящей заявки предусматривает комбинированную терапию. Мультиспецифический связывающий белок, описанный в данном документе, можно применять в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами для лечения аутоиммунного заболевания или для лечения рака.

**[0580]** Иллюстративные терапевтические средства, которые можно применять в качестве составной части комбинированной терапии при лечении аутоиммунных воспалительных заболеваний, описаны в Li *et al.* (2017) Front. Pharmacol., 8:460, и включают, например, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) (например, ингибиторы COX-2), глюкокортикоиды (например, преднизон/преднизолон, метилпреднизолон и фторированные глюкокортикоиды, такие как дексаметазон и бетаметазон), противоревматические лекарственные средства, модифицирующие заболевание (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, нацеливающиеся на CTLA-4 (например, абатацепт), рецептор IL-6 (например, тоцилизумаб), IL-1 (например, анакинра), Th1-клеточные иммунные ответы (IL-12/IL-23) (например, устекинумаб), Th17-клеточные иммунные ответы (IL-17) (например, секукинумаб) и CD20 (например, ритуксимаб).

**[0581]** Иллюстративные терапевтические средства, которые можно использовать в качестве составной части комбинированной терапии в лечении рака, предусматривают, 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, аминоглутетимид, амсакрин, проглумид, ацетат эллиптиния, 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, рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона и варианты вышеупомянутых средств, которые могут проявлять дифференциальное связывание со своим когнатным рецептором или повышать или уменьшать период полужизни в сыворотке крови.

**[0582]** Дополнительным классом средств, которые можно применять в качестве составной части комбинированной терапии в лечении рака, являются ингибиторы контрольных точек иммунного ответа. Иллюстративные ингибиторы контрольных точек иммунного ответа предусматривают средства, которые ингибируют один или несколько из (i) цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного антигена 4 (CTLA4), (ii) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v) B7-H3, (vi) B7-H4 и (vii) TIM3. Ингибитор CTLA4 ипилимумаб был одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США для лечения меланомы.

**[0583]** Еще другие средства, которые можно применять в качестве составной части комбинированной терапии в лечении рака, представляют собой средства на основе моноклональных антител, которые нацелены на мишени, не относящиеся к контрольным точкам иммунного ответа (например, герцептин), а также нецитотоксичные средства (например, ингибиторы тирозинкиназы).

**[0584]** Еще другие категории противораковых средств включают, например, (i) ингибитор, выбранный из ингибитора ALK, ингибитора ATR, антагониста A2A, ингибитора белков, участвующих в эксцизионной репарации оснований, ингибитора тирозинкиназы Bcr-Abl, ингибитора тирозинкиназы Брутона, ингибитора CDC7, ингибитора CHK1, ингибитора циклинзависимой киназы, ингибитора DNA-PK, ингибитора, ингибирующего как DNA-PK, так и mTOR, ингибитора DNMT1, ингибитора DNMT1 плюс 2-хлордезоксиаденозин, ингибитора HDAC, ингибитора компонентов сигнального пути Hedgehog, ингибитора IDO, ингибитора JAK, ингибитора mTOR, ингибитора MEK, ингибитора MELK, ингибитора MTH1, ингибитора PARP, ингибитора фосфоинозитид-3-киназы, ингибитора, ингибирующего как PARP1, так 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.

**[0585]** Белки согласно настоящей заявке также можно применять в качестве дополнения к хирургическому удалению первичного очага.

**[0586]** Количество мультиспецифического связывающего белка и дополнительного терапевтического средства, а также относительные временные рамки введения могут быть выбраны для достижения требуемого комбинированного терапевтического эффекта. Например, в случае введения средства комбинированной терапии пациенту, нуждающемуся в таком введении, терапевтические средства в комбинации или фармацевтическую композицию или композиции, содержащие терапевтические средства, можно вводить в любом порядке, таком как, например, последовательно, параллельно, совместно, одновременно и т. п. Дополнительно, например, мультиспецифический связывающий белок можно вводить в то время, когда дополнительное(-ые) терапевтическое(-ие) средство(-а) проявляет(-ют) свой профилактический или терапевтический эффект, или наоборот.

## V. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

**[0587]** В настоящем описании также представлены фармацевтические композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество белка, описанного в данном документе. Композиция может быть составлена для применения в различных системах доставки лекарственных средств. В композицию для надлежащего составления также может быть включено одно или несколько физиологически приемлемых вспомогательных веществ или носителей. Подходящие составы для применения в настоящем изобретении можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Краткий обзор способов доставки лекарственных средств см., например, в Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

**[0588]** Состав для внутривенной доставки лекарственного средства по настоящему изобретению может содержаться в пакете, шприц-ручке или шприце. В определенных вариантах осуществления пакет может быть соединен с каналом, предусматривающим трубку и/или иглу. В определенных вариантах осуществления состав может представлять собой лиофилизированный состав или жидкий состав. В определенных вариантах осуществления состав может являться сублимированным (лиофилизированным) и содержаться в приблизительно 12-60 флаконах. В определенных вариантах осуществления состав может являться сублимированным, и в одном флаконе может содержаться 45 мг сублимированного состава. В определенных вариантах осуществления в одном флаконе

может содержаться от приблизительно 40 до приблизительно 100 мг сублимированного состава. В определенных вариантах осуществления сублимированный состав из 12, 27 или 45 флаконов объединяют с получением терапевтической дозы белка в составе на основе лекарственного средства для внутривенного введения. В определенных вариантах осуществления состав может представлять собой жидкий состав и храниться в количестве от приблизительно 250 мг/флакон до приблизительно 1000 мг/флакон. В определенных вариантах осуществления состав может представлять собой жидкий состав и храниться в количестве приблизительно 600 мг/флакон. В определенных вариантах осуществления состав может представлять собой жидкий состав и храниться в количестве приблизительно 250 мг/флакон.

**[0589]** Белок может находиться в жидком водном фармацевтическом составе, содержащем терапевтически эффективное количество белка в буферизованном растворе, образующем состав.

**[0590]** Эти композиции можно стерилизовать с применением общепринятых методик стерилизации или можно подвергать стерилизующей фильтрации. Полученные в результате водные растворы могут быть упакованы для применения в исходном виде или лиофилизированы, при этом перед введением лиофилизированный препарат объединяют со стерильным водным носителем. Значения pH препаратов обычно будут составлять 3-11, более предпочтительно 5-9 или 6-8 и наиболее предпочтительно 7-8, как например 7-7,5. Полученные в результате композиции в твердой форме могут быть упакованы в несколько емкостей с однократной дозой, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутых средства или средств. Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер для адаптированного количества.

**[0591]** В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает состав с увеличенным сроком хранения, содержащий белок по настоящему изобретению в комбинации с маннитом, моногидратом лимонной кислоты, цитратом натрия, дигидратом фосфата динатрия, дигидратом дигидрофосфата натрия, хлоридом натрия, полисорбатом 80, водой и гидроксидом натрия.

**[0592]** В некоторых вариантах осуществления получают водный состав, содержащий белок по настоящему изобретению в буферизованном растворе для доведения pH. Буфер может иметь pH от приблизительно 4 до приблизительно 8, например, от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,0 или от приблизительно 4,8 до приблизительно 5,5, или может иметь pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2. Предполагается, что диапазоны, промежуточные по отношению к вышеприведенным значениям pH, также являются частью настоящего изобретения. Например, предполагается, что включены диапазоны

значений, в которых используется комбинация любых из вышеприведенных значений в качестве верхнего и/или нижнего пределов. Примеры буферов, которые будут обеспечивать контроль pH в пределах данного диапазона, включают ацетатный (например, на основе ацетата натрия), сукцинатный (как например на основе сукцината натрия), глюконатный, гистидиновый, цитратный и другие буферы на основе органических кислот.

**[0593]** В определенных вариантах осуществления состав включает буферную систему, которая содержит цитрат и фосфат для поддержания pH в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 8. В определенных вариантах осуществления диапазон pH может составлять от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,0, или от pH приблизительно 4,8 до приблизительно 5,5, или в диапазоне pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2. В определенных вариантах осуществления буферная система включает моногидрат лимонной кислоты, цитрат натрия, дигидрат динатрийфосфата и/или дигидрат дигидрофосфата натрия. В определенных вариантах осуществления буферная система содержит приблизительно 1,3 мг/мл лимонной кислоты (например, 1,305 мг/мл), приблизительно 0,3 мг/мл цитрата натрия (например, 0,305 мг/мл), приблизительно 1,5 мг/мл дигидрата фосфата динатрия (например, 1,53 мг/мл), приблизительно 0,9 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия (например, 0,86 мг/мл) и приблизительно 6,2 мг/мл хлорида натрия (например, 6,165 мг/мл). В определенных вариантах осуществления буферная система содержит от приблизительно 1 до приблизительно 1,5 мг/мл лимонной кислоты, от приблизительно 0,25 до приблизительно 0,5 мг/мл цитрата натрия, от приблизительно 1,25 до приблизительно 1,75 мг/мл дигидрата динатрийфосфата, от приблизительно 0,7 до приблизительно 1,1 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия и от приблизительно 6,0 до приблизительно 6,4 мг/мл хлорида натрия. В определенных вариантах осуществления pH состава регулируют с помощью гидроксида натрия.

**[0594]** В состав также может быть включен полиол, который действует как регулятор тоничности и может стабилизировать антитело. Полиол добавляют в состав в количестве, которое может варьироваться в зависимости от требуемой изотоничности состава. В определенных вариантах осуществления водный состав может быть изотоническим. Количество добавляемого полиола также может изменяться в зависимости от молекулярной массы полиола. Например, может быть добавлено меньшее количество моносахарида (например, маннита) по сравнению с дисахаридом (таким как трегалоза). В определенных вариантах осуществления полиол, который можно применять в составе в качестве средства, регулирующего тоничность, представляет собой маннит. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от

приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от приблизительно 7,5 до приблизительно 15 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 14 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять приблизительно 12 мг/мл. В определенных вариантах осуществления в состав может быть включен полиол, представляющий собой сорбит.

**[0595]** В состав также могут быть добавлены детергент или поверхностно-активное вещество. Иллюстративные детергенты включают неионогенные детергенты, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20, 80 и т. д.) или полоксамеры (например, полоксамер 188). Количество добавляемого детергента таково, что оно уменьшает агрегацию составляемого антитела, и/или сводит к минимуму образование частиц в составе, и/или уменьшает адсорбцию. В определенных вариантах осуществления состав может содержать поверхностно-активное вещество, которое представляет собой полисорбат. В определенных вариантах осуществления состав может содержать детергент полисорбат 80 или Tween 80. Tween 80 представляет собой термин, используемый для описания полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеата (см. Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996). В определенных вариантах осуществления состав может содержать полисорбат 80 в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл или от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл. В определенных вариантах осуществления в состав может быть добавлено приблизительно 0,1% полисорбата 80.

**[0596]** В вариантах осуществления белковый продукт по настоящему изобретению составлен в виде жидкого состава. Жидкий состав может быть представлен в концентрации 10 мг/мл в любом флаконе USP/Евр. фарм. типа I 50R, закрытом резиновой пробкой и герметически закупоренном алюминиевым обжимным колпачком. Пробка может быть изготовлена из эластомера, соответствующего USP и Евр. фарм. В некоторых вариантах осуществления флаконы могут быть заполнены 61,2 мл раствора белкового продукта, чтобы обеспечить извлекаемый объем, составляющий 60 мл. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может быть разбавлен 0,9% солевым раствором.

**[0597]** В определенных вариантах осуществления жидкий состав по настоящему изобретению может быть получен в виде раствора с концентрацией 10 мг/мл в комбинации с сахаром при стабилизирующих уровнях. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может быть получен в водном носителе. В определенных вариантах осуществления стабилизатор может быть добавлен в количестве, не

превышающем количество, которое может привести в результате к нежелательной или не подходящей для внутривенного введения вязкости. В определенных вариантах осуществления сахар может быть представлен дисахаридами, например, сахарозой. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может также предусматривать одно или несколько из буферного средства, поверхностно-активного вещества и консерванта.

**[0598]** В определенных вариантах осуществления значение pH жидкого состава можно установить посредством добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемой кислотой может являться хлористоводородная кислота. В определенных вариантах осуществления основание может представлять собой гидроксид натрия.

**[0599]** В дополнение к агрегации дезамидирование является общераспространенным вариантом продукта на основе пептидов и белков, который может иметь место в ходе ферментации, сбора/осветления клеток, очистки, хранения лекарственного вещества/лекарственного продукта и в ходе анализа образцов. Дезамидирование представляет собой потерю $NH_3$ из белка с образованием сукцинимидного промежуточного соединения, которое может подвергаться гидролизу. Сукцинимидное промежуточное соединение обуславливает в результате уменьшение массы родительского пептида на 17 дальтон. Последующий гидролиз обуславливает в результате увеличение массы на 18 дальтон. Выделение сукцинимидного промежуточного соединения затруднено ввиду нестабильности в водных условиях. Таким образом, дезамидирование обычно поддается обнаружению по увеличению массы на 1 дальтон. Дезамидирование аспарагина обеспечивает в результате образование либо аспарагиновой, либо изоаспарагиновой кислоты. Параметры, влияющие на скорость дезамидирования, включают pH, температуру, диэлектрическую константу растворителя, ионную силу, первичную последовательность, локальную конформацию полипептида и третичную структуру. Аминокислотные остатки, прилегающие к Asn в пептидной цепи, влияют на значения скорости дезамидирования. Gly и Ser, следующие за Asn в белковых последовательностях, обуславливают в результате более высокую восприимчивость к дезамидированию.

**[0600]** В определенных вариантах осуществления жидкий состав по настоящему изобретению может храниться в условиях pH и влажности, обеспечивающих предупреждение дезаминирования белкового продукта.

**[0601]** Предусматриваемый в данном документе водный носитель, представляющий интерес, представляет собой водный носитель, который является фармацевтически

приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и является применимым для получения жидкого состава. Иллюстративные носители предусматривают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), буферизованный раствор для доведения pH (например, буферизованный фосфатом солевой раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

**[0602]** Консервант может быть необязательно добавлен в составы согласно данному документу для снижения бактериальной активности. Добавление консерванта может, например, способствовать получению состава для многоразового (многодозового) применения.

**[0603]** Составы для внутривенного (IV) введения могут являться предпочтительным путем введения в частных случаях, например, в случае если пациент находится в больнице после трансплантации, получая все лекарственные средства посредством IV пути введения. В определенных вариантах осуществления жидкий состав перед введением разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия. В определенных вариантах осуществления разбавленный лекарственный продукт для инъекции является изотоническим и подходит для введения посредством внутривенной инфузии.

**[0604]** В определенных 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 использованием "образующих основания" металлов или аминов. В определенных вариантах осуществления буфер может представлять собой фосфатный буфер. В определенных вариантах осуществления буфер может быть представлен глицинатным, карбонатным, цитратным буферами, при этом в данном случае в качестве противоиона могут служить ионы натрия, калия или аммония.

**[0605]** Консервант может быть необязательно добавлен в составы согласно данному документу для снижения бактериальной активности. Добавление консерванта может, например, способствовать получению состава для многоразового (многодозового) применения.

**[0606]** Предусматриваемый в данном документе водный носитель, представляющий интерес, представляет собой водный носитель, который является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и является применимым для получения жидкого состава. Иллюстративные носители предусматривают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), буферизованный раствор для доведения pH (например, буферизованный фосфатом солевой раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

**[0607]** Белок по настоящему изобретению может находиться в лиофилизированном составе, содержащем белки и лиопротектор. Лиопротектор может быть представлен сахаром, например, дисахаридами. В определенных вариантах осуществления лиопротектор может представлять собой сахарозу или мальтозу. Лиофилизированный состав может также предусматривать одно или несколько из буферного средства, поверхностно-активного вещества, объемообразующего средства и/или консерванта.

**[0608]** Количество сахарозы или мальтозы, применимое для стабилизации лиофилизированного лекарственного продукта, может быть представлено при весовом соотношении белка и сахарозы или мальтозы, составляющем по меньшей мере 1:2. В определенных вариантах осуществления весовое соотношение белка и сахарозы или мальтозы может составлять от 1:2 до 1:5.

**[0609]** В определенных вариантах осуществления значение pH состава перед лиофилизацией можно установить посредством добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемой кислотой может являться хлористоводородная кислота. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемым основанием может являться гидроксид натрия.

**[0610]** Перед лиофилизацией значение pH раствора, содержащего белок по настоящему изобретению, может быть доведено до 6-8. В определенных вариантах осуществления диапазон pH лиофилизированного лекарственного продукта может составлять 7-8.

**[0611]** В определенных 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 использованием "образующих основания" металлов или аминов. В определенных вариантах осуществления буфер может представлять собой фосфатный буфер. В определенных вариантах осуществления буфер может быть представлен глицинатным, карбонатным, цитратным буферами, при этом в данном случае в качестве противоиона могут служить ионы натрия, калия или аммония.

**[0612]** В определенных вариантах осуществления может быть добавлено "объемообразующее средство". "Объемообразующее средство" представляет собой соединение, которое увеличивает массу лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной массы (например, способствует получению по существу однородной лиофилизированной массы, которая сохраняет структуру с открытыми порами). Иллюстративные объемообразующие средства включают маннит,

глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лиофилизированные составы на основе мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, могут содержать такие объемообразующие средства.

**[0613]** Консервант может быть необязательно добавлен в составы согласно данному документу для снижения бактериальной активности. Добавление консерванта может, например, способствовать получению состава для многоразового (многодозового) применения.

**[0614]** В определенных вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт может быть составлен с водным носителем. Предусматриваемый в данном документе водный носитель, представляющий интерес, представляет собой водный носитель, который является фармацевтически приемлемым (например, безопасным и нетоксичным для введения человеку) и является применимым для получения жидкого состава после лиофилизации. Иллюстративные растворители предусматривают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), буферизованный раствор для доведения pH (например, буферизованный фосфатом солевой раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

**[0615]** В определенных вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт по настоящему изобретению восстанавливают с помощью либо стерильной воды для инъекций, USP (SWFI), либо 0,9% раствора хлорида натрия для инъекций, USP. Во время восстановления лиофилизированный порошок растворяется в растворе.

**[0616]** В определенных вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт по настоящему изобретению восстанавливают до объема, составляющего приблизительно 4,5 мл воды для инъекций, и разбавляют 0,9% солевым раствором (раствором хлорида натрия).

**[0617]** Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях на основе мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, могут варьироваться для получения количества активного ингредиента, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без проявления токсичности в отношении пациента.

**[0618]** Конкретная доза может представлять собой одинаковую дозу для каждого пациента, например 50-5000 мг белка. В качестве альтернативы, доза для пациента может быть индивидуализирована по отношению к примерному весу тела или площади поверхности тела пациента. Другие факторы при определении подходящей дозы могут включать заболевание или состояние, подлежащие лечению или предупреждению,

тяжесть заболевания, путь введения, а также возраст, пол пациента и его состояние с медицинской точки зрения. Дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения подходящей дозы для лечения, рутинно выполняется специалистами в данной области техники, особенно в свете информации относительно дозы и анализов, раскрытых в данном документе. Доза также может быть определена посредством применения известных анализов для определения доз, применяемых в сочетании с соответствующими данными относительно зависимости ответа от дозы. Индивидуальная доза для пациента может быть скорректирована в ходе наблюдения за течением заболевания. Уровни целевых конструкции или комплекса в крови пациента могут быть измерены, чтобы определить, имеется ли необходимость в корректировке дозы для достижения или поддержания эффективной концентрации. Фармакогеномику можно использовать для определения того, какие целевые конструкции и/или комплексы и их дозировки наиболее вероятно будут эффективны для данного индивидуума (Schmitz *et al.*, *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer *et al.*, *Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).

**[0619]** В целом, дозы, основанные на весе тела, составляют от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 100 мг на кг веса тела, как например от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 1 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 50 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 1 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 0,1 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 1 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 10 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 1 мкг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 1 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 50 мкг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мкг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно

50 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 1 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 50 мкг/кг веса тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 1 мг/кг веса тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 1 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 50 мг до приблизительно 100 мг/кг веса тела.

**[0620]** Дозы можно вводить один или несколько раз в день, еженедельно, ежемесячно или ежегодно или даже один раз в 2-20 лет. Специалисты в данной области техники могут легко оценить частоту повторного введения дозы на основе измеренных значений времени удержания и концентраций целевых конструкции или комплекса в физиологических жидкостях или тканях организма. Введение мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, может быть внутривенным, внутриартериальным, интраперитонеальным, внутримышечным, подкожным, интраплевральным, интратекальным, внутриполостным, посредством перфузии с помощью катетера или посредством прямой внутриочаговой инъекции. Их можно вводить один или несколько раз в день, один или несколько раз в неделю, один или несколько раз в месяц и один или несколько раз в год.

**[0621]** Вышеприведенное описание предусматривает несколько аспектов и вариантов осуществления мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке. В настоящей патентной заявке конкретно рассматриваются все комбинации аспектов и вариантов осуществления, а также изменения порядка их элементов. Применение любых и всех примеров или иллюстративной формулировки в данном документе, например, "такой как" или "включая", предназначено исключительно для того, чтобы лучше проиллюстрировать мультиспецифические связывающие белки, описанные в настоящей заявке, и не налагает ограничения на объем настоящего изобретения, если это не указано явным образом. Никакую формулировку в настоящем описании не следует

толковать как указывающую на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практической реализации мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке.

ПРИМЕРЫ

**[0622]** Следующие примеры являются только иллюстративными и никоим образом не предназначены для ограничения объема или состава мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке.

**Пример 1. Определение характеристик супернатантов выбранных гибридомных клонов**

**[0623]** Антитела, специфические к CLEC12A, получали посредством иммунизации мышей BALB/c с введением слитого белка hCLEC12A-His. Супернатанты 16 гибридом оценивали в отношении связывания CLEC12A посредством биослойной интерферометрии (BLI) связывания с использованием OctetRed384 (ForteBio). Указанные 16 гибридом дополнительно анализировали в отношении связывания с CLEC12A человека и яванского макака, экспрессируемого на клеточной поверхности изогенных клеток RMA; при этом связывание с CLEC12A яванского макака не наблюдали. Расчетные кинетические параметры представлены **в таблице 11**, и кривые связывания показаны на **фиг. 18**. Для дальнейшего исследования отбирали девять клонов. Способность выбранных девяти клонов связывать раковые клеточные линии U937 и PL21, экспрессирующие RMA hCLEC12A-His и CLEC12A, дополнительно анализировали посредством поверхностного плазмонного резонанса высокого разрешения (SPR). Эксперимент выполняли с использованием прибора Biacore 8K при 37°C для имитации физиологической температуры.

**Таблица 11.** Кинетические параметры и значения аффинности связывания CLEC12A-His с антителами, полученными из гибридом-кандидатов

| **Тестируемые образцы** | **Профиль сортировки (биннинга)** | **SPR при 37°C** | | | **Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) связывания с клетками** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $k_a$ **(1/M с)** | $k_d$ **(1/с)** | $K_D$ **(нМ)** | **RMA-hCLEC12A** | $k_a$ **(1/M с)** | $k_d$ **(1/с)** |
| 9E04 | Конкурент | 247,0 | $3,51 \times 10^{-2}$ | 9E04 | Конкурент | 247,0 | $3,51 \times 10^{-2}$ |

| **Тестируемые образцы** | **Профиль сортировки (биннинга)** | **SPR при 37°C** | | | **Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) связывания с клетками** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **$k_a$ (1/M c)** | **$k_d$ (1/c)** | **$K_D$ (нМ)** | **RMA-hCLEC12A** | **$k_a$ (1/M c)** | **$k_d$ (1/c)** |
| 9F11 | Конкурент | 549,0 | $5,57 \times 10^{-3}$ | 9F11 | Конкурент | 549,0 | $5,57 \times 10^{-3}$ |
| 11E02 | - | 779,0 | $7,28 \times 10^{-3}$ | 11E02 | - | 779,0 | $7,28 \times 10^{-3}$ |
| 12F08 | Уникальный | 76,7 | $6,23 \times 10^{-3}$ | 12F08 | Уникальный | 76,7 | $6,23 \times 10^{-3}$ |
| 13E01 | Уникальный | 178,0 | $7,50 \times 10^{-3}$ | 13E01 | Уникальный | 178,0 | $7,50 \times 10^{-3}$ |
| 15A10 | Уникальный | 79,5 | $2,23 \times 10^{-3}$ | 15A10 | Уникальный | 79,5 | $2,23 \times 10^{-3}$ |
| 15D11 | - | 372,0 | $6,64 \times 10^{-3}$ | 15D11 | - | 372,0 | $6,64 \times 10^{-3}$ |
| 16B08 | Конкурент | Гетерогенное связывание | | | 819,0 | 16B08 | Конкурент |
| 20D06 | Уникальный | 819,0 | $5,25 \times 10^{-2}$ | 20D06 | Уникальный | 819,0 | $5,25 \times 10^{-2}$ |
| 23A05 | Уникальный | 90,2 | $4,49 \times 10^{-2}$ | 23A05 | Уникальный | 90,2 | $4,49 \times 10^{-2}$ |
| 30A09 | - | Гетерогенное связывание | | | 74,7 | 30A09 | - |
| 6D07 | - | Несвязывающая молекула | | | 247,0 | 6D07 | - |
| 12B06 | - | Несвязывающая молекула | | | 178,0 | 12B06 | - |
| 20G10 | - | Несвязывающая молекула | | | 82,2 | 20G10 | - |

| **Тестируемые образцы** | **Профиль сортировки (биннинга)** | **SPR при 37°C** | | | **Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) связывания с клетками** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **$k_a$ (1/M c)** | **$k_d$ (1/c)** | **$K_D$ (нМ)** | **RMA-hCLEC12A** | **$k_a$ (1/M c)** | **$k_d$ (1/c)** |
| 30H07 | - | Несвязывающая молекула | | | 76,3 | 30H07 | - |
| 32A03 | - | Несвязывающая молекула | | | 71,4 | 32A03 | - |

**[0624]** Сортировку слитых гибридом в сравнении с референтными mAb осуществляли посредством BLI с использованием OctetRed384 (ForteBio). Если вкратце, супернатанты гибридом загружали на наконечники сенсоров (с предварительно иммобилизованным антителом к IgG мыши) в течение 15 минут и уравновешивали в течение 5 минут в PBSF. Сенсоры погружали в 200 нМ hCLEC12A-His и оставляли для ассоциации в течение 180 секунд с последующим погружением в 100 нМ референтного mAb к CLEC12A. Увеличение единиц ответа указывало на то, что гибридома не являлась конкурентом референтному mAb, тогда как отсутствие увеличения сигнала указывало на то, что гибридома действительно конкурировала с референтным mAb. Последовательности VH и VL данных референтных антител представлены в **таблице 12**.

**Таблица 12.** Референтные антитела

| **mAb к CLEC12A** | **Источник** | **ID последовательности** | **Эпитоп** |
|---|---|---|---|
| Merus-CLL1 | Merus US 2014/0120096A1 | VH [SEQ ID NO:263]<br>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS<br>GYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMG<br>IINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTS<br>TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGN<br>YGDEFDYWGQGTLVTVSS<br><br>VL [SEQ ID NO:264]<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ<br>SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS<br>LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE<br>DFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK | Неизвестный |
| Genentech-h6E7 | Genentech US 2016/0075787A1 | VH [SEQ ID NO:265]<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ<br>SVSTSSYNYMHWYQQKPGKPPKLLI<br>KYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQPEDFATYYCQHSWEIPLTFGQG<br>TKVEIK<br><br>VL [SEQ ID NO:266]<br>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS<br>GYSFTDYYMHWVRQAPGQGLEWIG<br>RINPYNGAAFYSQNFKDRVTLTVDTS<br>TSTAYLELSSLRSEDTAVYYCAIERG<br>ADLEGYAMDYWGQGTLVTVSS | Лектин, подобный домену С-типа, остатки 142-158 |

**[0625]** Анализ с сортировкой продемонстрировал, что антитела, полученные из пяти гибридом, а именно 12F8.G3, 13E01, 15A10.G8, 20D6.A8 и 23A5.D4, не конкурировали с референтными антителами за связывание с hCLEC12A-His. Связывание гибридом с изогенным CLEC12A человека (hCLEC12A) и перекрестную реактивность с CLEC12A

яванского макака (cCLEC12A) также оценивали путем измерения связывания антител с изогенными клетками RMA, экспрессирующими CLEC12A, и с раковой клеточной линией U937 AML.

**[0626]** Если вкратце, клетки RMA трансдуцировали ретровирусным вектором, кодирующим cCLEC12A или hCLEC12A. Связывание mAb к α-CLEC12A из неочищенных собранных гибридом с изогенными клеточными линиями, экспрессирующими hCLEC12A или cCLEC12A, а также раковыми клеточными линиями U937 CLEC12A+ (номер по каталогу ATCC CRL-1593.2) осуществляли следующим образом. Добавляли по 100000 клеток RMA, REH или SEM на лунку 96-луночного круглодонного планшета. Клетки осаждали центрифугированием и осадок осторожно диссоциировали посредством перемешивания на вортексе. Добавляли по 100 мкл на лунку красителя Zombie live/dead (PBS + краситель 1:2000) и планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут. Клетки промывали с использованием 200 мкл буфера для FACS (PBS + 2% FBS). К промытым клеткам добавляли 50 мкл супернатантов гибридом и смеси инкубировали в течение 30 минут на льду в темноте. Клетки дважды промывали буфером для FACS, затем добавляли 50 мкл вторичного антитела к мышиному Fc-PE (разведение 1:200) и инкубировали в течение 20 минут на льду в темноте. После инкубации клетки промывали, а затем фиксировали с использованием 50 мкл 4% параформальдегида в течение 15 минут на льду. Фиксированные клетки промывали буфером для FACS, ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACS и хранили при 4°C до начала анализа. Образцы клеток, ресуспендированных в буфере для FACS, анализировали на BD FACSCelesta, оснащенном HTS (высокопроизводительным пробоотборником) для определения аффинности связывания антител с изогенными клетками RMA, экспрессирующими CLEC12A, и с раковой клеточной линией U937 AML.

**[0627]** Также измеряли аффинность связывания супернатантов гибридом с раковыми клетками PL21 AML (номер по каталогу DSMZ ACC536), клеточной линией AML, которая, как сообщалось, экспрессирует CLEC12A. Как показано в **таблице 11**, девять клонов продемонстрировали аффинность связывания с раковыми клетками, экспрессирующими hCLEC12A. Связывание с cCLEC12A не выявили.

**Пример 2. Анализ очищенных мышиных антител к CLEC12A**

**[0628]** В данном примере анализировали кинетические параметры и значения аффинности связывания очищенных мышиных антител к CLEC12A. На основе данных, полученных в анализе, описанном в примере 1, восемь гибридом (9F11.B7, 12F8.G3, 16B8.C8, 15A10.G8, 20D6.A8, 9E4.B7, 13E1.A4 и 23A5.D4) отбирали для субклонирования

и секвенирования. Каждый субклон выделяли из гибридомной культуры и посредством SPR оценивали его в отношении связывания с hCLEC12A-His и cCLEC12A-His, как показано на **фиг. 19**. Данные, полученные в этих экспериментах, показаны на **фиг. 19A**. Антитела 9E4.B7, 9F11.B7, 12F8.G3 и 16B8.C8 связывались только с hCLEC12A (**фиг. 19A**), тогда как антитела 13E1.A4, 15A10.G8, 20D6.A8 и 23A5.D4 связывались как с hCLEC12A, так и с cCLEC12A (**фиг. 19B**). Кинетические константы и значения аффинности связывания hCLEC12A и cCLEC12A с очищенными мышиными субклонированными mAb представлены в **таблице 13**.

**Таблица 13. Кинетические параметры и значения аффинности связывания hCLEC12A с очищенными мышиными субклонами**

| **Тестируемый образец** | **CLEC12A-His человека** | | | **CLEC12A-His яванского макака** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
| 9E4.B7 | Низкоаффинное гетерогенное взаимодействие | | | Связывание отсутствует | | |
| 9F11.B7 | $1{,}14 \times 10^{6}$ | $1{,}57 \times 10^{-3}$ | 1,4 | Связывание отсутствует | | |
| 12F8.G3 | $3{,}97 \times 10^{5}$ | $1{,}39 \times 10^{-3}$ | 3,5 | Связывание отсутствует | | |
| 16B8.C8* | $4{,}05 \times 10^{6}$ | $4{,}44 \times 10^{-5}$ | 0,01 | Связывание отсутствует | | |
| 13E1.A4 | Низкоаффинное гетерогенное взаимодействие | | | Низкоаффинное гетерогенное взаимодействие | | |
| 15A10.G8 | $3{,}01 \times 10^{5}$ | $4{,}94 \times 10^{-4}$ | 1,6 | $1{,}96 \times 10^{5}$ | $6{,}59 \times 10^{-4}$ | 3,3 |
| 20D6.A8 | $1{,}31 \times 10^{7}$ | $9{,}50 \times 10^{-2}$ | 7,2 | $9{,}16 \times 10^{5}$ | $2{,}46 \times 10^{-2}$ | 26 |
| 23A5.D4 | Низкоаффинное гетерогенное взаимодействие | | | Низкоаффинное гетерогенное взаимодействие | | |

**[0629]** Способность восьми выделенных субклонированных mAb связываться с клетками, экспрессирующими CLEC12A, оценивали посредством анализа FACS с использованием человеческой раковой клеточной линии PL21, положительной по CLEC12A. Как показано на **фиг. 20**, 9E4.B7, 9F11.B7 и 16B8.C8 – все связывались с линией клеток PL21 со значениями EC50 в субнаномолярном диапазоне; однако только 9F11.B7 и 16B8.C8 удовлетворяли как критериям связывания рекомбинантного белка, так и критериям связывания клеток, поскольку 9E4.B7 продемонстрировало низкоаффинное гетерогенное связывание с рекомбинантным hCLEC12A-His (**таблица 14**). Хотя

15A10.G8, 13E1.A4, 20D6.A8 и 23A5.D4 продемонстрировали связывание с рекомбинантным CLEC12A человека и яванского макака в анализе SPR, эти mAb были не способны распознавать раковые клетки, что свидетельствует о конформационных отличиях в связываемом эпитопе между рекомбинантным и экспрессируемым на клеточной поверхности эпитопом CLEC12A. Было продемонстрировано, что как mAb Merus-CLL1, так и mAb Genentech-h6E7 связывались с PL21 со значительно более низкими значениями EC50 по сравнению с новыми гибридомными клонами CLEC12A.

**Таблица 14.** Подтверждение клеточного связывания очищенных мышиных mAb с человеческой клеточной линией PL21

| **Тестируемый образец** | **$EC_{50}$ (нМ)** | **Макс. MFI** |
|---|---|---|
| 9E4.B7 | 0,64 | 186 |
| 9F11.B7 | 0,56 | 217 |
| 12F8.G3 | Несвязывающая молекула | n/a* |
| 16B8.C8 | 0,18 | 300 |
| 13E1.A4 | Несвязывающая молекула | n/a |
| 15A10.G8 | Несвязывающая молекула | n/a |
| 20D6.A8 | Несвязывающая молекула | n/a |
| 23A5.D4 | Несвязывающая молекула | n/a |
| Merus-CLL1[#] | 2,02 | 201 |
| Genentech-h6E7[#] | 5 | 265 |

**[0630]** Чтобы оценить, связываются ли mAb с CLEC12A независимым от гликозилирования образом, связывание клонов 16B8.C8 и 9F11.B7 с гликозилированным, десиалилированным и обработанным PNGазой hCLEC12A оценивали посредством SPR (**фиг. 21**). Как показано на сенсограммах и в **таблице 15**, как 16B8.C8, так и 9F11.B7 связывались с десиалилированными и дегликозилированными вариантами hCLEC12A без потери аффинности, указывая на то, что статус гликозилирования мишени не оказывает влияние на взаимодействия антител с hCLEC12A.

**Таблица 15**. Кинетические параметры и значения аффинности связывания для 16B8.C8 и 9F11.B7 по отношению к дифференциально гликозилированному hCLEC12A, определенные посредством SPR

| **Тестируемый образец** | **Аналит** | $k_a$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | $k_d$ **($c^{-1}$)** | $K_D$ **(нМ)** |
|---|---|---|---|---|
| Мышиное mAb 16B8 | Гликозилированный hCLEC12A | $4{,}05 \times 10^{6}$ | $4{,}70 \times 10^{-5}$ | 0,012 |
| Мышиное mAb 16B8 | Десиалилированный hCLEC12A | $5{,}25 \times 10^{6}$ | $3{,}62 \times 10^{-5}$ | 0,007 |
| Мышиное mAb 16B8 | Дегликозилированный hCLEC12A | $4{,}26 \times 10^{6}$ | $4{,}45 \times 10^{-5}$ | 0,011 |
| Мышиное F3'-9F11 | Гликозилированный hCLEC12A | $1{,}15 \times 10^{6}$ | $1{,}11 \times 10^{-3}$ | 0,96 |
| Мышиное F3'-9F11 | Десиалилированный hCLEC12A | $1{,}58 \times 10^{6}$ | $9{,}80 \times 10^{-4}$ | 0,62 |
| Мышиное F3'-9F11 | Дегликозилированный hCLEC12A | $1{,}11 \times 10^{6}$ | $3{,}74 \times 10^{-4}$ | 0,34 |

**Пример 3. Анализ потенциальных участков неблагоприятных модификаций в последовательности**

**[0631]** Исследовали потенциальные участки неблагоприятных модификаций в последовательностях CDR (идентифицированных согласно Chothia) антител 16B8.C8 и 9F11.B7. Учитывались следующие потенциальные участки неблагоприятных модификаций: M (потенциальный участок окисления); мотивы последовательности NG, NS и NT (потенциальный участок дезамидирования); мотивы последовательности DG, DS и DT (потенциальный участок изомеризации); мотив последовательности DP (потенциальный участок химического гидролиза). Результаты сведены в **таблице 16**.

**Таблица 16.** Потенциальные участки неблагоприятных модификаций в последовательностях CDR выбранных мышиных mAb

| **ID клона** | **Потенциальный мотив неблагоприятной модификации в последовательности** | **Расположение** |
|---|---|---|
| 16B8.C8 | **DS** (участок изомеризации) | CDRH3 |

| ID клона | Потенциальный мотив неблагоприятной модификации в последовательности | Расположение |
|---|---|---|
| 9F11.B7 | **M** (участок окисления) | CDRH3 |
| | **DG** (участок изомеризации) | CDRH3 |
| | **NS** (участок дезамидирования) | CDRH1 |

**[0632]** Варианты данных антител были сконструированы с удалением потенциальных мотивов неблагоприятных модификаций в последовательности.

**Пример 4. Гуманизация субклонов**

**[0633]** Исходя из полученных данных кинетических параметров и аффинности в отношении рекомбинантного белка hCLEC12A, связывания с hCLEC12A, экспрессируемым на клеточной поверхности, и связывания с раковыми клеточными линиями AML, для гуманизации отбирали два мышиных гибридомных субклона, а именно 16B8.C8 и 9F11.B7.

**[0634]** Выполняли гуманизацию антитела 16B8.C8. Обратные мутации вводили в каркасные области с получением вариантов, имеющих последовательности VH и VL из от scFv-1292 до scFv-1309, а также scFv-1602 и scFv-2061.

**[0635]** Выполняли гуманизацию антитела 9F11.B7. Обратные мутации вводили в каркасные области с получением вариантов от AB0186 до AB0196.

**Пример 5. Отбор TriNKET CLEC12A**

**[0636]** При выборе оптимального кандидата TriNKET использовали следующие критерии, которые привели к отбору TriNKET F3'-1602 в качестве основного кандидата.

- Эффективное усиление активности NK в отношении раковых клеток AML
- Активность, превышающая активность соответствующего моноклонального антитела
- Связывание с несколькими клеточными линиями AML
- Высокая аффинность в отношении рекомбинантного hCLEC12A
- Низкая аффинность в отношении NKG2D человека
- Перекрестная реактивность с мишенями яванского макака (cyno)
- Надлежащий профиль реализуемости:
- термостабильность scFv $\geq$ 65°C
- изоэлектрическая точка (pI) в пределах 8-9

- Время удерживания при хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC) было аналогично такому у терапевтических mAb с надлежащими характеристиками

- Высокая специфичность к CLEC12A человека

- Чистый профиль в анализе с использованием полиспецифического реагента (PSR)

-Временные титры экспрессии, подобные таким для mAb

**[0637]** Все 18 гуманизированных scFv-вариантов клона 16B8.C8 объединяли с Fab-плечом A49MI NKG2D с получением гуманизированных TriNKET F3' CLEC12A. Значения аффинности связывания 18 полуочищенных TriNKET в отношении hCLEC12A оценивали посредством SPR при скрининге. Сигналы связывания у восьми F3'-TriNKET составляли менее 5 RU (приблизительно 15% от ожидаемого сигнала в данном анализе), поэтому данные TriNKET рассматривались как молекулы, которые не являются связывающими по отношению к hCLEC12A. Остальные десять F3'-TriNKET связывались с hCLEC12A с аффинностью < 10 нМ, как показано на **фиг. 22** и в **таблице 17**. Однако потенциальный участок N-гликозилирования был непреднамеренно введен в восемь из десяти F3'-TriNKET посредством введения мышиной обратной мутации N в положении H85. Только конструкции F3'-1295 и F3'-1304 (содержащие A в положении H85) не продемонстрировали потенциальные участки неблагоприятных модификаций, представляющих собой N-гликозилирование; поэтому только эти две конструкции использовали для дальнейшего определения характеристик.

**Таблица 17**. Кинетические параметры и значения аффинности связывания hCLEC12A с полуочищенными гуманизированными TriNKET F3'

| **Тестируемый образец** | **Ориентации scFv** | **Количество обратных мутаций и остатков, ревертированных в человеческие** | **Потенциальный участок неблагоприятной модификации в последовательности, представляющей собой N-гликозилирование** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **KD (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1292 | VH-VL | 7 BM | Да | 4,02 × $10^5$ | 1,30 × $10^{-3}$ | 3,22 |
| F3'-1293 | VH-VL | 6 BM, K(H71)V* | Да | 4,58 × $10^5$ | 1,75 × $10^{-3}$ | 3,81 |
| F3'-1294 | VH-VL | 6 BM, Q(H83)T | Да | Сигнал связывания < 5 RU | | |
| F3'-1295 | VH-VL | 6 BM, N(H85)A | Нет | 5,20 × $10^5$ | 1,53 × $10^{-3}$ | 2,94 |
| F3'-1296 | VH-VL | 6 BM, K(H94)R | Да | 8,74 × $10^5$ | 1,17 × $10^{-3}$ | 1,34 |
| F3'-1297 | VH-VL | 6 BM, I(L43)A | Да | 5,04 × $10^5$ | 1,41 × $10^{-3}$ | 2,79 |
| F3'-1298 | VH-VL | 6 BM, R(L70)D | Да | 6,44 × $10^5$ | 1,85 × $10^{-3}$ | 2,87 |
| F3'-1299 | VH-VL | 6 BM, I(L83)F | Да | 4,26 × $10^5$ | 1,21 × $10^{-3}$ | 2,83 |
| F3'-1300 | VH-VL | BM отсутствует | Нет | Сигнал связывания < 5 RU | | |
| F3'-1301 | VL-VH | 7 BM | Да | Сигнал связывания < 5 RU | | |
| F3'-1302 | VL-VH | 6 BM, K(H71)V | Да | Сигнал связывания < 5 RU | | |

| **Тестируемый образец** | **Ориентации scFv** | **Количество обратных мутаций и остатков, ревертированных в человеческие** | **Потенциальный участок неблагоприятной модификации в последовательности, представляющей собой N-гликозилирование** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **KD (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1303 | VL-VH | 6 BM, Q(H83)T | Да | Сигнал связывания < 5 RU | | |
| F3'-1304 | VL-VH | 6 BM, N(H85)A | Нет | $4{,}80 \times 10^5$ | $1{,}30 \times 10^{-3}$ | 2,70 |
| F3'-1305 | VL-VH | 6 BM, K(H94)R | Да | Сигнал связывания < 5 RU | | |
| F3'-1306 | VL-VH | 6 BM, I(L43)A | Да | $9{,}48 \times 10^6$ | $4{,}89 \times 10^{-2}$ | 5,16 |
| F3'-1307 | VL-VH | 6 BM, R(L70)D | Да | $9{,}14 \times 10^5$ | $1{,}00 \times 10^{-3}$ | 1,10 |
| F3'-1308 | VL-VH | 6 BM, I(L83)F | Да | Сигнал связывания < 5 RU | | |
| F3'-1309 | VL-VH | BM отсутствует | Нет | Сигнал связывания < 5 RU | | |
| m16B8.C8** | Мышиное mAb | | Да | $3{,}03 \times 10^6$ | $2{,}35 \times 10^{-5}$ | 0,008 |

*В обозначении "остатков, ревертированных в человеческие" первая буква представляет собой мышиный остаток, буква и цифра в скобках указывают на положение ревертированных остатков в тяжелой и легкой цепях, а последняя буква представляет собой человеческий остаток, например, в K(H71)V мышиный K в положении 71 тяжелой цепи заменен человеческим остатком V.

** Мышиное родительское mAb 16B8.C8 было полностью очищенным.

**[0638]** TriNKET F3'-1295 и F3'-1304 тестировали в отношении связывания с изогенными клетками RMA hCLEC12A+, как показано на **фиг. 23**, и с применением

способов, описанных в примерах 5 или 6. Связывание F3'-1295 с hCLEC12A, экспрессируемым на клеточной поверхности, было сопоставимо со связыванием контрольным TriNKET hcFAE-A49.CLL1-Merus, полученным из антитела Merus, описанного выше в примере 1, тогда как связывание F3'-1304 с hCLEC12A, экспрессируемым на клеточной поверхности, было хуже по сравнению с контрольным мультиспецифическим связывающим белком hcFAE-A49.CLL1-Merus.

**[0639]** Активность F3'-1295 оценивали в анализе цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками, с использованием клеток HL-60 AML, как показано **фиг. 24**, и с применением способов, описанных в примере 8. F3'-1295 индуцировало активный лизис клеток HL60 AML. Значение EC50 уничтожения клеток было сходным, а максимальный процент лизиса клеток был выше, чем у контрольного TriNKET hcFAE-A49.CLL1-Merus (**таблица 18**).

**Таблица 18**. Активность F3'-1295 в анализе цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками

| **Тестируемые образцы** | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис (%)** |
|---|---|---|
| F3'-1295 | 1,1 | 59 |
| hcFAE-A49.CLL1-Merus | 1,1 | 43 |

**[0640]** Термостабильность F3'-1295 оценивали посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Если вкратце, для выполнения DSC TriNKET разводили до 0,5 мг/мл посредством PBS. Добавляли 325 мкл в 96-луночный планшет с глубокими лунками вместе с соответствующей холостой пробой с буфером. Термограммы получали с использованием MicroCal PEAQ DSC (Малверн, Пенсильвания). Температуру линейно повышали от 20 до 100°C со скоростью повышения 90°C/час. Исходные термограммы подвергали вычитанию фонового значения, модель базовой линии подвергали сплайн-интерполяции и данные аппроксимировали с использованием модели с промежуточными состояниями.

**[0641]** Температура плавления перехода первого рода ($T_{m1}$) для F3'-1295 составляла 60,9°C, что на 4°C ниже предварительно заданного критерия $\geq$ 65°C $T_m$ перехода первого рода для TriNKET. В процессе гуманизации возможно, что введение мышиного остатка в человеческую каркасную область (обратная мутация) могло повлиять на термическую стабильность. Поэтому путем ревертирования обратных мутаций в человеческие остатки можно улучшить термическую стабильность F3'-1295. Таким образом, термическую стабильность десяти вариантов F3' оценивали посредством DSC независимо от наличия или отсутствия потенциального участка неблагоприятной модификации в последовательности, представляющей собой N-гликозилирование, как показано в **таблице**

**19**. $T_m$ перехода первого рода (приписываемая домену scFv) для TriNKET F3'-1297 и F3'-1306 была значительно выше (от 66,5°C до 67,5°C), чем у других TriNKET F3'. Более того, $T_{начала}$ для данных двух молекул была значительно лучше по сравнению с другими протестированными TriNKET F3'. Единственное отличие между этими двумя F3'-TriNKET заключается в ориентации scFv; F3'-1297 (ориентация VH-VL) и F3'-1306 (ориентация VL-VH).

**[0642]** Чтобы определить, являлся ли человеческий остаток в положении (L43) ответственным за повышение термостабильности, как в F3'-1306, так и в F3'-1297 мышиный остаток I(L43) ревертировали в остаток A(L43) исходной человеческой каркасной области. Кроме того, мышиный Ile в положении L43 F3'-1295 заменяли человеческим Ala, а затем получали рекомбинантным способом. Новому второму поколению гуманизированного TriNKET, полученному из F3'-1295, присвоили название F3'-1602 или TriNKET F3'-1602.

**Таблица 19**. Результаты DSC-анализа очищенных F3'-TriNKET в PBS

| **Тестируемые образцы** | **Ориентация scFv** | **Мышиные остатки, замененные на человеческие** | **$T_{начала}$** (°C) | **$T_{m1}$** (°C) | **$T_{m2}$** (°C) | **$T_{m3}$** (°C) | **$T_{m4}$** (°C) | **$T_{m5}$** (°C) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1292 | VH-VL | Отсутствуют | 51,4 | 60,0 | 67,6 | 76,4 | 81,6 | 83,7 |
| F3'-1293 | VH-VL | K(H71)V [#] | 51,2 | 59,8 | 66,9 | 76,5 | 81,6 | 83,7 |
| F3'-1295 | VH-VL | N(H85)A | 52,5 | 60,9 | 67,1 | 76,6 | 81,6 | 83,4 |
| F3'-1296 | VH-VL | K(H94)R | 50,5 | 59,7 | 67,1 | 76,3 | 81,6 | 83,7 |
| F3'-1297 | VH-VL | I(L43)A | 56,4 | 66,5* | | 76,0 | 81,5 | 83,6 |
| F3'-1298 | VH-VL | R(L70)D | 48,7 | 59,2 | 66,5 | 76,0 | 81,7 | 83,8 |
| F3'-1299 | VH-VL | I(L83)F | 49,6 | 59,8 | 66,1 | 76,0 | 81,8 | 83,8 |
| F3'-1304 | VL-VH | N(H85)A | 50,5 | 60,1 | 65,5 | 76,3 | 81,7 | 83,5 |
| F3'-1306 | VL-VH | I(L43)A | 58,5 | 67,5 | | 76,2 | 81,6 | 83,7 |
| F3'-1307 | VL-VH | R(L70)D | 50,5 | 60,2 | 66,0 | 76,0 | 81,8 | 83,9 |

№ положения согласно Chothia (от мышиного остатка к человеческому остатку)

* Перекрывается с $Tm_2$

**[0643]** Термостабильность F3'-1295 и TriNKET второго поколения – F3'-1602 оценивали посредством DSC в PBS (**фиг. 25**). Исходя из $T_m$ перехода первого рода, пришли к выводу, что scFv F3'-1602 был термически стабилизирован на 7,5°C по сравнению с F3'-1295, что показано в **таблице 20**. Данную стабилизацию приписывают

мутациям Ile/Ala. Таким образом, F3'-1602 соответствовал пороговому значению $T_{m1}$ при ≥ 65°C.

**Таблица 20**. Результаты DSC-анализа TriNKET F3'-1295 и F3'-1602 в PBS

| **Тестируемый образец** | **$T_{начала}$ (°C)** | **$T_{m1}$ (°C)** | **$T_{m2}$ (°C)** | **$T_{m3}$ (°C)** | **$T_{m4}$ (°C)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1295 | 52,5 | 60,9 | 67,1 | 76,6 | 81,6 |
| F3'-1602 | 58,5 | 66,8 | 76,0 | 81,5 | 83,3 |

**[0644]** Чтобы выяснить, оказывает ли влияние замена I(L43)A на аффинность TriNKET в отношении hCLEC12A, связывание hCLEC12A с F3'-1295 и F3'-1602 определяли посредством SPR (Biacore) при 37°C (**фиг. 26**) и с использованием способов, описанных в примере 1. Кинетические константы и значения равновесной аффинности связывания перечислены в **таблице 21**. Оба TriNKET характеризуются очень сходными значениями скорости диссоциации, однако F3'-1602 демонстрирует в приблизительно 2 раза более низкую $K_D$ ввиду его более высокой скорости ассоциации. Следовательно, замена I(L43)A оказывала влияние на $K_D$.

**Таблица 21**. Кинетические параметры и значения аффинности связывания F3'-1295 и F3'-1602 с hCLEC12A, определенные посредством SPR

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|
| F3'1295 | hCLEC12A-His | $4{,}11 \times 10^5$ | $5{,}87 \times 10^{-4}$ | 1,43 |
| | hCLEC12A-His | $4{,}15 \times 10^5$ | $5{,}89 \times 10^{-4}$ | 1,42 |
| | hCLEC12A-His | $4{,}19 \times 10^5$ | $6{,}05 \times 10^{-4}$ | 1,44 |
| | hCLEC12A-His | $4{,}16 \times 10^5$ | $5{,}96 \times 10^{-4}$ | 1,43 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | | $(4{,}15 \pm 0{,}03) \times 10^5$ | $(5{,}94 \pm 0{,}09) \times 10^{-4}$ | 1,43 ± 0,01 |
| F3'1602 | hCLEC12A-His | $8{,}54 \times 10^5$ | $4{,}94 \times 10^{-4}$ | 0,58 |
| | hCLEC12A-His | $8{,}33 \times 10^5$ | $4{,}94 \times 10^{-4}$ | 0,59 |
| | hCLEC12A-His | $8{,}63 \times 10^5$ | $4{,}89 \times 10^{-4}$ | 0,57 |
| | hCLEC12A-His | $8{,}26 \times 10^5$ | $4{,}99 \times 10^{-4}$ | 0,60 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | | $(8{,}44 \pm 0{,}17) \times 10^5$ | $(4{,}94 \pm 0{,}04) \times 10^{-4}$ | 0,57 ± 0,01 |

**[0645]** F3'-1295 и F3'-1602 тестировали в отношении их способности связывать изогенные клетки Ba/F3, экспрессирующие CLEC12A человека, по сравнению с родительскими клетками Ba/F3 (как показано на **фиг. 27A** и в данных, приведенных в **таблице 22**) с использованием способов, описанных в примерах 5 или 6. F3'-1602 было

способно связывать Ba/F3 hCLEC12A+ с приблизительно в 2 раза более низким значением EC50, но со сходным максимальным MFI связывания по сравнению с F3'-1295. Связывание с родительской клеткой Ba/F3, у которой отсутствует экспрессия CLEC12A, не выявили для F3'-1295, ни для F3'-1602 (**фиг. 27B**), что свидетельствует о высокой специфичности связывания TriNKET с hCLEC12A.

**Таблица 22**. EC50 и максимальный MFI связывания F3'-TriNKET в отношении изогенной клеточной линии Ba/F3 hCLEC12A+

| | **Клеточная линия Ba/F3 hCLEC12A+** | | **Родительская клеточная линия Ba/F3** | |
|---|---|---|---|---|
| **Тестируемый образец** | **EC50 (нМ)** | **Макс. MFI** | **EC50 (нМ)** | **Макс. MFI** |
| F3'-1295 | 26,1 | 48040 | Связывание отсутствует | |
| F3'-1602 | 14,4 | 50160 | Связывание отсутствует | |
| hcFAE-A49.CLL-Merus | 14,3 | 39740 | Связывание отсутствует | |

**[0646]** F3'-1295 и F3'-1602 дополнительно тестировали в отношении их способности связывать раковые клеточные линии HL60 (**фиг. 27C**) и PL21 (**фиг. 27D**) AML с использованием способов, описанных в примерах 5 или 6. F3'-1602 было способно связываться с обеими клеточными линиями с более низкими значениями EC50, но со сходными максимальным MFI связывания по сравнению с F3'-1295, как показано в **таблице 23**.

**[0647]** Активность TriNKET F3'-1295 и F3'-1602 оценивали в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV, результаты которого показаны на **фиг. 28**. Как F3'-1602, так и F3'-1295 индуцировали активный лизис раковых клеток PL21 (**фиг. 28A)** и HL60 (**фиг. 28B**) AML, и при этом оба демонстрируют сходные значения EC50 и % макс. лизиса, показанные в **таблице 23**.

**Таблица 23**. Активность F3'-1294 и F3'1602 в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1CD16aV

| | **Раковая клеточная линия PL21** | | **Раковая клеточная линия HL60** | |
|---|---|---|---|---|
| **Тестируемые образцы** | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис клеток (%)** | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис клеток (%)** |
| F3'-1295 | 1,23 | 22 | 1,15 | 48 |
| F3'-1602 | 1,87 | 25 | 0,90 | 49 |

| | Раковая клеточная линия PL21 | | Раковая клеточная линия HL60 | |
|---|---|---|---|---|
| **Тестируемые образцы** | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис клеток (%)** | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис клеток (%)** |
| hcFAE-A49.CLL-Merus | 2,97 | 10 | 1,83 | 27 |

**[0648]** Гидрофобные свойства TriNKET F3'-1295 и F3'-1602 оценивали посредством аналитической хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC), результаты которой показаны в **таблице 24**. Трастузумаб (Roche) использовали в качестве репрезентативного контроля для терапевтического антитела. Значения времени удерживания (RT) для обоих TriNKET было сходными с RT для трастузумаба, указывая на то, что прогнозируемая склонность к агрегации обоих TriNKET является низкой.

**Таблица 24**. Значения времени удерживания в HIC-анализе для TriNKET F3'-1295 и F3'-1602 по сравнению с трастузумабом

| **Тестируемый образец** | **Абсолютное время удерживания (мин)** | **ΔRT относительно трастузумаба (мин)** |
|---|---|---|
| F3'-1295 | 9,7 | +0,6 |
| F3'-1602 | 9,4 | +0,3 |
| Трастузумаб | 9,1 | 0,0 |

**[0649]** Экспериментальную изоэлектрическую точку (pI) F3'-1295 (**фиг. 29A**) и F3'-1602 (**фиг. 29B**) оценивали посредством капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF), описанного в примере 15. Обе конструкции продемонстрировали практически идентичные pI. Основной пик для F3'-1295 характеризуется pI 8,73, а основной пик для F3'-1602 характеризуется pI 8,81 (**таблица 25**).

**Таблица 25**. pI F3'-1295 и F3'-1602, определенная посредством cIEF

| **Тестируемый образец** | **pI (главный пик)** |
|---|---|
| F3'-1295 | 8,73 |
| F3'-1602 | 8,81 |

**[0650]** Нецелевые эффекты лекарственного средства должны оцениваться при разработке белковых терапевтических средств. Анализ с использованием полиспецифического реагента (PSR) на основе проточной цитометрии позволяет определять антитела, которые обладают более высокой вероятностью к неспецифическому связыванию. F3'-1295 и F3'-1602 тестировали в отношении неспецифического связывания с препаратом на основе мембранных белков клеток CHO, солюбилизированных детергентом, в анализе с использованием PSR, применяя способы,

описанные в примере 12. Оба гуманизированных F3'-1602 и F3'-1295 не связывались с PSR (отсутствовал сдвиг сигнала вправо), и они проявляли очень сходные профили трастузумабом, контролем для PSR, показанные на **фиг. 30**, что свидетельствует о высокой специфичности TriNKET. В данном анализе ритуксимаб использовали в качестве положительного контроля. Для дальнейшего сравнения с описанными дополнительными TriNKET выбрали F3'-1602.

**[0651]** Влияние разных форматов TriNKET на изменение эффективности было протестировано экспериментально. Для получения TriNKET CLEC12A в формате F3 гуманизированное 16B8.C8 преобразовывали с использованием того же варианта гуманизации, который использовали для F3'-1602, в цепи VH-CH1-Fc и VL-CL, тогда как mAb NKG2D A49M-I было преобразовано в VH-VL-Fc. Данному белку присвоили обозначение AB0010 или F3-1602.

**[0652]** Значения аффинности связывания AB0010 (формат TriNKET F3) и F3'-1602 (формат TriNKET F3') в отношении CLEC12A-His человека оценивали посредством SPR (Biacore) при 37°C. Кинетические константы и значения равновесной аффинности связывания показаны в **таблице 26**, а исходные данные и модели аппроксимации показаны на **фиг. 31**. Суммарные значения аффинности связывания для обеих конструкций различалась в 2 раза, при этом AB0010 образовывало несколько более сильный комплекс с CLEC12A по сравнению с F3'-1602, на что указывает $K_D$.

**Таблица 26**. Кинетические параметры и значения аффинности связывания CLEC12A с TriNKET F3' (F3'-1602) и F3 (AB0010)

| **Формат** | **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | $k_d$ **($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3' | F3'1602 | hCLEC12A-His | $7{,}91 \times 10^5$ | $9{,}52 \times 10^{-4}$ | 1,20 |
| F3' | F3'1602 | hCLEC12A-His | $7{,}68 \times 10^5$ | $9{,}13 \times 10^{-4}$ | 1,19 |
| **F3'** | **Среднее значение** | | $\mathbf{7{,}79 \times 10^5}$ | $\mathbf{9{,}33 \times 10^{-4}}$ | **1,20** |
| F3 | AB0010 | hCLEC12A-His | $7{,}15 \times 10^5$ | $5{,}08 \times 10^{-4}$ | 0,71 |
| F3 | AB0010 | hCLEC12A-His | $7{,}04 \times 10^5$ | $5{,}41 \times 10^{-4}$ | 0,77 |
| **F3** | **Среднее значение** | | $\mathbf{7{,}10 \times 10^5}$ | $\mathbf{5{,}25 \times 10^{-4}}$ | **0,74** |

**[0653]** TriNKET различных форматов, F3'-1602 (F3') и AB0010 (F3), тестировали в отношении их способности связывать клетки Ba/F3, экспрессирующие CLEC12A человека (**фиг. 32A**), и раковую клеточную линию AML (**фиг. 32B**). Значение EC50 для F3'-1602 превышало данное значение для AB0010 в отношении клеток HL-60, которое было ниже в приблизительно 2 раза (**таблица 27**). Ни AB0010, ни F3'-1602 не проявили какое-либо

связывание с родительскими клетками Ba/F3, демонстрируя высокую специфичность связывания с CLEC12A (**фиг. 32C**).

**Таблица 27**. EC50 связывания и макс. MFI F3'-1602 и AB0010 в отношении клеток Ba/F3 и HL60 hCLEC12A+ AML

| **Формат** | **Тестируемый образец** | **Ba/F3 hCLEC12A+ Клеточная линия** | | **HL60** | | **Ba/F3 Родительская клеточная линия** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Макс. MFI** | **EC50 (нМ)** | **Макс. MFI** | **EC50 (нМ)** | **Макс. MFI** | **EC50 (нМ)** |
| F3' | F3'-1602 | 36920 | 3,20 | 3820 | 1,1 | Связывание отсутствует | |
| F3 | AB0010 | 54827 | 6,13 | 6064 | 4,2 | Связывание отсутствует | |

**[0654]** Активность TriNKET AB0010 и F3'-1602 оценивали в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV, результаты которого показаны на **фиг. 33A**. F3'-1602 индуцировало лизис раковых клеток HL60 и PL21 AML со значением EC50, которое в 2 раза лучше, чем у AB0010 (**таблица 28**). TriNKET, как F3 (AB0010), так и F3' (F3'-1602), продемонстрировали превосходство над соответствующими гуманизированными родительскими mAb (AB0037-001).

**Таблица 28**. Активность F3'-1602 и AB0010 в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV

| **Формат** | **Тестируемые образцы** | **Раковая клеточная линия PL21 AML** | |
|---|---|---|---|
| | | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис клеток (%)** |
| F3 | AB0010 | 2,99 | 21,75 |
| F3' | F3'-1602 | 1,16 | 20,97 |
| mAb | AB0037-001 | N/A | N/A |

**[0655]** Активность TriNKET AB0010 и F3'-1602 оценивали в анализе цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками человека (**фиг. 33B**). F3'-1602 (формат F3') индуцировало лизис раковых клеток PL21 AML со значением EC50, которое было в 2 раза более низким, чем у AB0010 (формат F3) (**таблица 29**).

**Таблица 29**. Активность F3'1602 и AB0010 в анализе цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками.

| **Формат** | **Тестируемый образец** | **Раковые клеточные линии PL21** | |
|---|---|---|---|
| | | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис клеток (%)** |
| F3' | F3'-1602 | 0,13 | 45,85 |
| F3 | AB0010 | 0,30 | 43,82 |

**[0656]** В анализе цитотоксичности, опосредованной как KHYG-1, так и первичными NK-клетками, выявили, что F3'-1602 (формат F3') продемонстрировало в приблизительно 2 раза лучшее значение EC50, чем AB0010 (формат F3), тогда как суммарный максимальный процент уничтожения не изменился. В испытаниях стабильности методом ускоренного старения и при принудительном разложении AB0010 оказалось в меньшей степени структурно стабильным по сравнению с F3'-1602 (F3'-1602) (см. пример 16). Поэтому для дальнейшего исследования выбрали TriNKET CLEC12A в формате F3' (F3'-1602).

**[0657]** Для получения TriNKET 9F11.B7 все 12 scFv-вариантов 9F11.B7 объединяли с Fab-плечом A49M-I NKG2D с получением гуманизированных TriNKET F3'. Значения аффинности для 10 полуочищенных (белок A) TriNKET в отношении hCLEC12A оценивали посредством SPR в режиме скрининга, показанном в **таблице 30**. Три (AB0190, AB0193 и AB0196) F3'-TriNKET на основе 9F11.B7 продемонстрировали гетерогенное связывание, и полученные для них данные невозможно было аппроксимировать к кинетической модели 1:1 с высокой достоверностью. Кинетические параметры связывания для 7 остальных TriNKET были сходны с кинетическими параметрами химерного родительского мышиного mAb 9F11.B7, что свидетельствует о том, что ни гуманизация, ни преобразование Fab в scFv не влияли на аффинность в отношении hCLEC12A.

**Таблица 30**. Кинетические параметры и значения аффинности связывания hCLEC12A с полуочищенными гуманизированными TriNKET F3'

| **Тестируемый образец** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** | **Комментарии** |
|---|---|---|---|---|
| AB0185 | $7{,}26 \times 10^5$ | $1{,}01 \times 10^{-3}$ | 1,40 | |

| **Тестируемый образец** | $k_a$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | $k_d$ **($c^{-1}$)** | **KD (нМ)** | **Комментарии** |
|---|---|---|---|---|
| AB0186 | $1,12 \times 10^6$ | $1,17 \times 10^{-3}$ | 1,04 | |
| AB0188 | $5,69 \times 10^5$ | $9,01 \times 10^{-4}$ | 1,58 | Низкий уровень образования гетеродимеров |
| AB0189 | $1,04 \times 10^6$ | $1,27 \times 10^{-3}$ | 1,21 | |
| AB0190 | $1,55 \times 10^7$ | $1,77 \times 10^{-2}$ | 1,14 | Расчетное/гетерогенное связывание |
| AB0191 | $7,28 \times 10^5$ | $1,26 \times 10^{-3}$ | 1,73 | |
| AB0192 | $1,09 \times 10^6$ | $1,38 \times 10^{-3}$ | 1,26 | |
| AB0193 | $1,97\times 10^7$ | $2,07\times 10^{-2}$ | 1,04 | Расчетное/гетерогенное связывание |
| AB0195 | $7,66 \times 10^5$ | $1,29 \times 10^{-3}$ | 1,68 | |
| AB0196 | Слабое гетерогенное связывание; данных для оценки недостаточно | | | |
| m9F11-hIgG1 | $9,50 \times 10^5$ | $1,02 \times 10^{-3}$ | 1,07 | |

**[0658]** Связывание 9 полностью очищенных гуманизированных TriNKET 9F11.B7 с раковыми клеточными линиями Ba/F3 и HL60 hCLEC12A+ AML, показанное на **фиг. 34A и фиг. 34B**, тестировали посредством FACS. AB0190, AB0193 и AB0196 продемонстрировали более низкие значения EC50 связывания в отношении обеих клеточных линий (**таблица 31**), что коррелирует с неудовлетворительными характеристиками, полученными в SPR-анализе, описанными в **таблице 30**. Значения EC50 для 6 остальных клонов были сходными, демонстрируя корреляцию с данными SPR.

**Таблица 31**. EC50 связывания и макс. MFI для F3'-TriNKET на основе 9F11.B7 в отношении изогенных клеточных линий Ba/F3 и HL60 hCLEC12A+ AML

| **Тестируемый образец** | **Изогенная клеточная линия Ba/F3 hCLEC12A+** | | **Раковая клеточная линия HL60** | |
|---|---|---|---|---|
| | EC50 (нМ) | Макс. связывание, MFI | EC50 (нМ) | Макс. связывание, MFI |
| AB0185 | 0,7 | 8025 | 0,4 | 372 |
| AB0186 | 0,7 | 8160 | 0,5 | 412 |
| AB0189 | 1,3 | 8760 | 0,7 | 420 |
| AB0190 | 2,9 | 5139 | N/A | n/a |
| AB0191 | 0,6 | 7941 | 0,6 | 420 |
| AB0192 | 0,7 | 10158 | 0,6 | 503 |
| AB0193 | 2,9 | 7732 | 19 | 345 |
| AB0195 | 0,6 | 10775 | 0,7 | 551 |
| AB0196 | 2,7 | 7427 | 135 | 650 |
| F3'-1602 | 2,0 | 14712 | 1,6 | 924 |

**[0659]** Значения активности TriNKET на основе 9F11.B7 оценивали в анализе цитотоксичности, опосредованной клетками KHYG-1-CD16aV (**фиг. 35** и **таблица 32**). AB0190, AB0193 и AB0196 проявляли минимальную активность. AB0189 и AB0192 продемонстрировали наивысшую активность среди других кандидатов TriNKET. В результате выполненных работ по гуманизации 9F11.B7 антитело TriNKET AB0192 стало основным TriNKET.

**Таблица 32**. Активность гуманизированных F3'-TriNKET 9F11.B7 в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1CD16aV.

| | **Раковая клеточная линия HL60 AML** | |
|---|---|---|
| **Тестируемый образец** | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис клеток (%)** |
| AB0185 | 2,0 | 25 |
| AB0186 | 2,7 | 19 |
| AB0189 | 0,6 | 18 |
| AB0190 | n/a | n/a |
| AB0191 | 3,1 | 22 |
| AB0192 | 1,3 | 22 |
| AB0193 | n/a | n/a |
| AB0195 | 2,2 | 20 |
| AB0196 | n/a | n/a |

**[0660]** Активность AB0192 оценивали в анализе цитотоксичности, опосредованной клетками KHYG-1-CD16aV, по сравнению с F3'-1602 (**фиг. 36A**). F3'-1602 продемонстрировало улучшенную эффективность по сравнению с AB0192 как по показателю EC50 (0,4 нМ и 1,3 нМ соответственно), так и по проценту максимального лизиса клеток HL-60 (41% и 22% соответственно).

**[0661]** Активность TriNKET AB0192 и F3'-1602 дополнительно оценивали в анализе цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками человека (**фиг. 36B**). F3'-1602 и AB0192 индуцировали лизис раковых клеток HL60 AML со сходными EC50 и % макс. уничтожения клеток (**таблица 33**).

**[0662]** AB0192 удовлетворяет критериям предварительной реализуемости TriNKET: высокая аффинность в отношении hCLEC12A, эффективное связывание с клетками AML, высокая активность в уничтожении клеток AML в анализе цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками, высокая термостабильность, $T_{m1} \geq 65°C$, низкая гидрофобность, $8,0 < PI < 9,0$, уровень экспрессии при временной трансфекции, подобный моноклональному антителу, чистый профиль PSR (**таблица 33**).

**[0663]** F3'-1602 продемонстрировало лучшую активность, более высокий показатель гуманизации и меньшее количество потенциальных участков неблагоприятных модификаций в последовательности по сравнению с AB0192. Структурная стабильность F3'-1602 была подтверждена в обширной панели испытаний стабильности методом ускоренного старения и при принудительном разложении, описанных в примере 15. Поэтому для дальнейшей разработки выбрали F3'-1602.

**Таблица 33**. Сводные данные по определению биохимических свойств F3'-1602 (F3'-1602) и AB0192

| **Свойства** | **F3'-1602** | **AB0192** |
|---|---|---|
| Количество обратных мутаций | 5 | 7 |
| Показатель гуманизации в %, полученный с использованием анализатора T20 score | 80,09 (VH), 84,67 (VK) | 82,3 (VH), 81,2 (VK) |

| **Свойства** | **F3'-1602** | **AB0192** |
|---|---|---|
| Потенциальные участки неблагоприятных модификаций в последовательности | DS (участок изомеризации) в CDRH3 | M (участок окисления) в CDRH3<br>DG (участок изомеризации) в CDRH3<br>NS (участок дезамидирования) в CDRH1 |
| Время удерживания в HIC-анализе по сравнению с Humira (мин) | +0,91 | +0,97 |
| pI (cIEF, основной пик) | 8,81 | N/A |
| Термическая стабильность в PBS, определенная посредством DSC (Tm1, °C) | 66,8 | 65,0 |
| Титр экспрессии (ExpiCHO, мг/л) | 73,3<br>50,2 | 64,4 |
| EC50 (нМ): активность (опосредованная KHYG-CD16a, линия клеток HL60) | 0,4 | 1,3 |
| EC50 (нМ): активность (опосредованная первичными NK-клетками, линия клеток HL60) | 0,29 | 0,25 |

| Свойства | F3'-1602 | AB0192 |
|---|---|---|
| Аффинность с hCLEC12A, определенная посредством SPR ($K_D$ в нМ) | 0,80 | 1,2 |
| Специфичность в анализе с использованием PSR | Чистый профиль | Чистый профиль |

**[0664]** F3'-1602 и соответствующее ему гуманизированное mAb (h16B8.C8) оценивали в отношении уничтожения клеток за счет цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками. F3'-1602 продемонстрировало активное уничтожение раковых клеточных линий PL21 (**фиг. 37A**) и THP-1 (**фиг. 37B**) AML, тогда как соответствующее моноклональное антитело проявляло заметно сниженную активность (**таблица 34**).

**Таблица 34**. Активность F3'-1602 по сравнению с родительским mAb в анализе цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками

| **Клеточная линия** | **F3'-1602** | | **Родительское mAb** | |
|---|---|---|---|---|
| | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис (%)** | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис (%)** |
| PL21 | 0,07 | 35 | 0,5 | 18 |
| THP-1 | 0,7 | 30 | NA | NA |

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

**[0665]** Изогенные клетки Ba/F3, экспрессирующие hCLEC12A, и человеческие раковые клеточные линии HL60 и PL21, экспрессирующие CLEC12A человека, использовали для оценки связывания опухолевого антигена посредством TriNKET и mAb, нацеливающихся на CLEC12A.

**[0666]** AB0089 представляет собой TriNKET F3', полученное из того же связывающего домена, что и родительское mAb AB0305. AB0192 представляет собой TriNKET F3', полученное из того же связывающего домена, что и родительское mAb AB0192. AB0237 представляет собой TriNKET F3', также обозначенное в данном документе как TriNKET

hF3'-1602 или F3'-1602, и оно получено из scFv-1602. AB0300 (также обозначенное как F3'-1602si или AB0237si) также представляет собой TriNKET F3' из той же последовательности, что и AB0237, однако несет мутации в домене CH2, устраняющие связывание Fc-гамма рецептора. TriNKET F3' обычно демонстрировали более слабое связывание по сравнению с родительским mAb.

**[0667]** Два варианта TriNKET сконструировали для того, чтобы оценить, вовлечены ли антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, и эффекторная функция Fc в цитотоксичность AB0237. Первый вариант содержит мутации в вариабельном домене легкой цепи антигенсвязывающего участка A49, который связывает NKG2D. Как результат, этот вариант не связывает NKG2D человека. Аминокислотная последовательность мутантного вариабельного домена легкой цепи представляет собой DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASNSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASSTKSGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDDLPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:282). Аминокислотные последовательности этого первого варианта в остальном идентичны последовательностям AB0237. Второй вариант содержит мутации в Fc-домене. В частности, каждая полипептидная цепь Fc-домена содержит замены L234A/L235A/P329G (пронумерованные по системе нумерации EU), которые, как сообщалось, снижают связывание Fc с Fcγ-рецепторами. Аминокислотные последовательности этого второго варианта в остальном идентичны последовательностям AB0237. F3'-паливизумаб содержит те же последовательности, которые являются молекулами, связывающими NKG2D и CD16, что и в F3'-1602, и scFv, который связывает неспецифическую мишень, которая не экспрессируется ни в одной из двух протестированных раковых клеточных линий. Значения EC50 представлены в **таблице 35**.

**Таблица 35**. Значения EC50 и % макс. лизиса клеток в анализе активности, опосредованной KHYG-1-CD16aV

| | **PL-21** | | **HL-60** | |
|---|---|---|---|---|
| **Тестируемый образец** | **EC50, нМ** | **% макс. лизиса** | **EC50, нМ** | **% макс. лизиса** |
| F3'-1602 | 0,7 | 33 | 0,27 | 87 |
| F3'-1602-Dead-2D | NA | 2 | 2,5 | 33 |
| F3'-1602 si | NA | NA | NA | 12 |
| F3'-паливизумаб | NA | NA | NA | NA |

**[0668]** Далее клетки инкубировали со вторичным антителом к IgG человека, конъюгированным с флуорофором, и анализировали посредством проточной цитометрии. Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) были нормализованы к контролям, представляющим собой только вторичные антитела, с получением значений кратности изменения по сравнению с фоном (FOB).

**[0669]** AB0237 демонстрирует высокую аффинность связывания с двумя протестированными клеточными линиями AML, а именно HL60 (**фиг. 38A**) и PL21 (**фиг. 38B**). Значение EC50 для HL60 составляло 2,2 нМ, и значение EC50 для PL21 составляло 1,2 нМ.

**[0670]** В случае двух из трех связывающих молекул TriNKET F3' продемонстрировали более высокую загрузку на клетках-мишенях по сравнению с родительским mAb. Мутированные варианты AB0237, AB0300 и AB0237 NKG2D с "мертвым" плечом продемонстрировали такое же связывание, как и их родительское TriNKET AB0237, с Ba/F3-hCLEC12A (**фиг. 39A**), HL-60 (**фиг. 39B**) и PL-21 (**фиг. 39C**).

**Пример 7. Оценка удерживания TriNKET на поверхности клеток, экспрессирующих человеческие раковые антигена**

**[0671]** Линии человеческих раковых клеток HL60 и PL21, экспрессирующие CLEC12A человека, использовали для оценки удерживания CLEC12A-TriNKET на поверхности после инкубации с клетками. Клетки PL21 или HL60 в параллельных планшетах инкубировали с TriNKET или mAb в соответствии с указанным. Первый планшет инкубировали при 37°C в течение двух часов, тогда как второй планшет инкубировали на льду в течение 20 минут. После соответствующих инкубаций клетки промывали. TriNKET или mAb, связавшиеся с поверхностью, выявляли с использованием флуоресцентного вторичного антитела для проточной цитометрии.

Удерживание на поверхности рассчитывали следующим образом:

% удерживания на поверхности = (MFI образца 2 ч/MFI образца 20 мин)) * 100%.

**[0672]** На **фиг. 40A** и **фиг. 40B** показано удерживание на клеточной поверхности TriNKET, связавшихся с CLEC12A+ клеточными линиями PL21 и HL60 соответственно. Моновалентные связывающие TriNKET AB0089, AB0147, AB0192 и AB0237 продемонстрировали высокое удерживание на поверхности через два часа на клеточных линиях PL21 и HL60. Как в отношении PL21, так и в отношении HL60 двухвалентное связывающее mAb AB0037 продемонстрировало более низкое удерживание на поверхности через два часа по сравнению с TriNKET.

**Пример 8. Анализ цитотоксичности с использованием человеческих NK-клеток**

**[0673]** Лизис клеток-мишеней измеряли посредством анализа цитотоксичности DELFIA. Если вкратце, человеческие раковые клеточные линии, экспрессирующие CLEC12A, собирали из культуры, промывали посредством HBS и ресуспендировали в ростовых средах при концентрации $10^6$/мл с целью мечения реагентом BATDA (Perkin Elmer AD0116). Мечение клеток-мишеней осуществляли согласно инструкциям производителя. После мечения клетки промывали трижды посредством HBS и ресуспендировали при 0,5-1,0 x $10^5$/мл в средах для культивирования. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 100 мкл клеток, меченных BATDA. Моноклональные антитела или TriNKET к CLEC12A разводили в средах для культивирования и в каждую лунку добавляли по 50 мкл разведенных mAb или TriNKET.

**[0674]** Для получения NK-клеток PBMC выделяли из лейкоцитарных пленок периферической крови человека посредством центрифугирования в градиенте плотности, промывали и готовили для выделения NK-клеток. NK-клетки выделяли посредством отрицательного отбора с использованием магнитных микроносителей. Чистота выделенных NK-клеток обычно составляла > 90% CD3-CD56+. Выделенные NK-клетки оставляли на ночь для отдыха и собирали из культуры. Затем клетки промывали и ресуспендировали при концентрациях от $10^5$ до 2,0 x $10^6$/мл в средах для культивирования с получением соотношения эффектора и мишени (E:T), составляющего 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.

**[0675]** После инкубации планшет удаляли из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200 x g в течение 5 минут. Переносили 20 мкл культурального супернатанта в чистый микропланшет и в каждую лунку добавляли по 200 мкл раствора европия комнатной температуры (Perkin Elmer, C135-100). Планшет защищали от воздействия света и инкубировали на шейкере для планшетов при 250 об/мин в течение 15 минут, затем считывали результаты с использованием приборов SpectraMax i3X.

**[0676]** Спонтанное высвобождение вещества, способного образовывать флуоресцентный хелат с европием, измеряли в клетках-мишенях, инкубированных в отсутствие NK-клеток. Максимальное высвобождение такого вещества измеряли в клетках-мишенях, лизированных посредством 1% Triton-X. % специфического лизиса рассчитывали следующим образом:

% специфического лизиса = ((экспериментальное высвобождение – спонтанное высвобождение) /

(максимальное высвобождение – спонтанное высвобождение)) * 100%.

**[0677]** На **фиг. 41A** и **фиг. 41B** показано опосредованное CLEC12A-TriNKET уничтожение клеток-мишеней PL21 и HL60 соответственно человеческими NK-клетками, находящимися в состоянии покоя. AB0037, моноклональное антитело, нацеливающееся на CLEC12A, продемонстрировало незначительное усиление опосредованного NK-клетками лизиса клеток-мишеней PL21 и HL60. Все три TriNKET, нацеливающиеся на CLEC12A (AB0237, AB0192 и AB0089), продемонстрировали превосходный лизис клеток-мишеней по сравнению с моноклональным антителом, нацеливающимся на CLEC12A. Значения EC50 показаны в **таблице 36**.

**Таблица 36**. Активность F3'-1602 по сравнению с родительским mAb в анализе цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками

| **Клеточная линия** | **F3'-1602** | | **Родительское mAb** | |
|---|---|---|---|---|
| | EC50 (нМ) | Макс. лизис (%) | EC50 (нМ) | Макс. лизис (%) |
| PL-21 | 0,07 | 35 | 0,5 | 18 |
| THP-1 | 0,7 | 30 | NA | NA |

**[0678]** Для подтверждения результатов анализа цитотоксичности была сконструирована вторая линия NK-клеток, KHYG-1-CD16aV, для стабильной экспрессии CD16aV и NKG2D и анализ был выполнен так, как это описано выше. Цитотоксичность PL21 показана на **фиг. 42A**; цитотоксичность HL60 показана на **фиг. 42B**. Значения EC50 и значения максимального лизиса получали из кривых лизиса клеток посредством программного обеспечения GraphPad Prism с использованием четырехпараметрической логистической нелинейной регрессионной модели аппроксимации кривой (**таблица 37**). F3'-1602 демонстрирует EC50 в субнаномолярном диапазоне и высокую эффективность максимального лизиса в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16A.

**Таблица 37**. Активность F3'-1602 в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV

| **Тестируемые образцы** | **Клеточная линия** | **EC50** | **% макс. лизиса** |
|---|---|---|---|
| F3'-1602 № 1 | PL21 | 0,3 | 66 |
| F3'-1602 № 2 | HL60 | 0,2 | 77 |

**Пример 9. Анализ цитотоксичности с использованием первичных человеческих CD8+ Т-клеток**

**[0679]** Лизис клеток-мишеней измеряли посредством анализа цитотоксичности DELFIA, описанного в примере 8, за исключением того, что в качестве иммунных эффекторных клеток использовали CD8+ Т-клетки. CD8+ Т-клетки получали следующим образом: человеческие PBMC выделяли из лейкоцитарных пленок периферической крови человека посредством центрифугирования в градиенте плотности с Lymphoprep и SepMate 50 в соответствии с инструкциями производителя. Выделенные PBMC стимулировали посредством 1 мкг/мл ConA (добавка на основе IL-2 для культивирования) в средах для культивирования при 37°C в течение 18 часов. Затем удаляли ConA и PBMC культивировали с добавлением 25 единиц/мл IL-2 при 37°C в течение 4 дней. CD8+ Т-клетки очищали с использованием методики отрицательного отбора магнитными микроносителями (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.

**[0680]** Как показано на **фиг. 43**, TriNKET AB0237, но не родительское mAb AB0037, значительно повышало способность CD8 Т-клеток к лизису клеток-мишеней. TriNKET AB0237 дозозависимым образом повышало лизис клеток, опосредованный CD8+ Т-клетками.

**[0681]** Один вариант TriNKET сконструировали для того, чтобы оценить, вовлечены ли антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, и эффекторная функция Fc в цитотоксичность TriNKET AB0237. Данный вариант содержит мутации в вариабельном домене легкой цепи антигенсвязывающего участка A49, который связывает NKG2D. Как результат, этот вариант не связывает NKG2D человека. Аминокислотная последовательность мутантного вариабельного домена легкой цепи представляет собой DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASNSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASSTKSGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDDLPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:282). Аминокислотные последовательности этого первого варианта в остальном идентичны последовательностям TriNKET AB0237.

**[0682]** Способность варианта индуцировать лизис клеток-мишеней, опосредованный NK-клетками, оценивали с использованием описанного выше анализа цитотоксичности DELFIA. Как показано на **фиг. 43**, мутации в домене, нацеливающемся на NKG2D, существенно снижали цитотоксичность. Данный результат свидетельствует о том, что связывание с NKG2D и связывание с Fcγ-рецепторами вовлечены в цитотоксическую активность TriNKET AB0237.

**Пример 10. Оценка связывания TriNKET или mAb с клетками человеческой цельной крови**

**[0683]** Оценивали способность AB0237 и mAb AB0037 связывать различные типы клеток крови. Если вкратце, человеческую цельную кровь инкубировали с AB0237 (серым), mAb AB0037 (белым) или человеческим изотипическим контрольным антителом IgG1 (черным). Клетки крови анализировали посредством проточной цитометрии, и связывание с AB0237, mAb AB0037 или изотипическим контрольным антителом определяли с использованием вторичного антитела к IgG человека, конъюгированного с флуорофором.

**[0684]** Как показано на **фиг. 44**, окрашивание было выявлено на моноцитах, гранулоцитах и доле дендритных клеток в цельной крови в отношении AB0237 и его родительского mAb AB0037.

**Пример 11. Связывание TriNKET F3'-1602 с Fc-рецепторами: определение характеристик посредством безмаркерного поверхностного плазмонного резонанса**

**[0685]** Определяли значения аффинность связывания TriNKET F3'-1602 в отношении рекомбинантных Fcγ-рецепторов человека и яванского макака и сравнивали с аффинностью связывания изотипического контрольного IgG1 и трастузумаба. Также определяли аффинность связывания TriNKET F3'-1602 с FcRn человека и яванского макака (cyno) при pH 6,0 и pH 7,4.

*Связывание FcγR*

**[0686]** CD64 человека и яванского макака, высоко- и низкоаффинные аллели CD16a (V158 и F158 соответственно), два аллеля CD32a (H131 и R131), CD16b, CD32b и CD16 яванского макака иммобилизовали посредством биотина на активированном чипе Biacore, подготовленном в соответствии с инструкциями производителя. Перед экспериментом по связыванию FcγR, требующим высокой исходной концентрации, образцы TriNKET F3'-1602 и трастузумаба подвергали замене буфера на 1x подвижный буфер HBS-EP+ SPR путем трех последовательных циклов разведения и концентрирования с применением концентратора объемом 0,5 мл, что давало в результате > 300-кратное разведение исходных буферных компонентов с сохранением высокой концентрации белка. Концентрацию белка измеряли по поглощению при длине волны 280 на приборе NanoDrop с использованием соответствующих теоретических молярных коэффициентов экстинкции (198405 $M^{-1}см^{-1}$ для TriNKET F3'-1602 и стандартных параметров IgG для трастузумаба).

**[0687]** Каждый эксперимент по связыванию FcγR выполняли в виде нескольких циклов с использованием 2-кратно серийно разведенного TriNKET F3'-1602 или трастузумаба. Для контроля, не дающего сигнал, использовали холостой цикл при 0 нМ в начале каждой серии концентрирования и чип с поверхностью без рецептора. Каждый

экспериментальный цикл включал стадии ассоциации, диссоциации и регенерации. Все стадии выполняли при скорости потока 30 мкл/мин и при 25°C. Концентрации аналита (TriNKET F3'-1602 или трастузумаб), время ассоциации и диссоциации и параметры регенерации были специфическими для FcγR (**таблица 38**).

**Таблица 38**. Параметры, использованные в экспериментах по связыванию FcγR с применением Biacore

| **Параметр** | **hCD64, CD64 яванского макака** | **hCD16a V158** | **hCD16a F158** | **CD16 яванского макака** | **hCD32a H131, R131** | **hCD16b** | **hCD32b** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Тип чипа | Чип CAP | Чип SA типа S | | | | | |
| Уровень захвата FcγR, RU | 35-50 | 34-37 | 24-27 | | 5-15 | 10-15 | |
| Диапазон концентраций, нМ | 400-1,56 | 1500-0,023 | 6000 – 0,023 | | 16000-125 | 24000 -188 | |
| Время ассоциации, с | 240 | 150 | | | 60 | 60 | |
| Время диссоциации, с | 600 | 300 | | | 60 | 150 | |
| Регенерация поверхности | Регенерация с использованием набора CAPture | 5-сек впрыскивание 1-2 мМ NaOH | | | | 5-сек введение 10 мМ Gly, pH 3,0 | |

**[0688]** Форма исходных сенсограмм, представляющих TriNKET F3'-1602 и трастузумаб, связывающих рекомбинантный CD64 человека, обеспечивала возможность аппроксимации данных с использованием модели аппроксимации данных кинетики 1:1.

Черные кривые, представляющие аппроксимацию данных кинетики 1:1, точно соответствуют фактическим сенсограммам, изображенным в цвете на **фиг. 45**.

**[0689]** Значение $\chi^2$ погрешности, рассчитанное с использованием оценочного программного обеспечения Biacore Insight, составило ≤ 1,9% от расчетного $R_{max}$, что является точной аппроксимацией. В **таблице 39** сведены кинетические константы скоростей и значения аффинности для TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении CD64 человека.

**Таблица 39**. Кинетические параметры и значения аффинности связывания TriNKET F3'-1602 с CD64 человека

| **Образец** | **$k_a$ (1/M c)** | **$k_d$ (1/c)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|
| TriNKET F3'-1602 | $5,3 \times 10^4$ | $2,7 \times 10^{-4}$ | 5,2 |
| | $5,2 \times 10^4$ | $2,8 \times 10^{-4}$ | 5,3 |
| | $5,1 \times 10^4$ | $2,6 \times 10^{-4}$ | 5,2 |
| | $5,2 \times 10^4$ | $2,7 \times 10^{-4}$ | 5,3 |
| **Среднее значение ± SD** | **$(5,2 \pm 0,1) \times 10^4$** | **$(2,7 \pm 0,1) \times 10^{-4}$** | **5,2 ± 0,1** |
| Трастузумаб | $9,6 \times 10^4$ | $2,3 \times 10^{-4}$ | 2,4 |
| | $9,6 \times 10^4$ | $2,3 \times 10^{-4}$ | 2,5 |
| | $9,6 \times 10^4$ | $2,3 \times 10^{-4}$ | 2,5 |
| | $9,2 \times 10^4$ | $2,3 \times 10^{-4}$ | 2,5 |
| **Среднее значение ± SD** | **$(9,3 \pm 0,1) \times 10^4$** | **$(2,3 \pm 0,0) \times 10^{-4}$** | **2,5 ± 0,1** |

**[0690]** Связывание TriNKET F3'-1602 с H131 CD32a определяли так, как это описано выше, и результаты показаны на **фиг. 46**. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии; значения аффинности сведены в **таблице 40**.

**Таблица 40**. Значения аффинности для TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении человеческого CD32a H131

| **Образец** | **Репликат $K_D$ (мкМ)** | **Репликат $K_D$ (мкМ)** | **Репликат $K_D$ (мкМ)** | **Репликат $K_D$ (мкМ)** | **$K_D$ (мкМ) Среднее значение ± SD** |
|---|---|---|---|---|---|
| **TriNKET F3'-1602** | 0,9 | 0,8 | 0,9 | 0,9 | 0,9 ± 0,0 |

| **Образец** | **Репликат $K_D$ (мкМ)** | **Репликат $K_D$ (мкМ)** | **Репликат $K_D$ (мкМ)** | **Репликат $K_D$ (мкМ)** | **$K_D$ (мкМ) Среднее значение ± SD** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Трастузумаб** | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,1 ± 0,1 |

**[0691]** Связывание TriNKET F3'-1602 с аллелем R131 человеческого CD32a (FcγRIIa R131) определяли так, как это описано выше, и результаты показаны на **фиг. 47**. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии; значения аффинности сведены в **таблице 41**.

**Таблица 41**. Значения аффинности для TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении человеческого CD32a R131

| **Образец** | **Репликат $K_D$ (нМ)** | **Репликат $K_D$ (нМ)** | **Репликат** $K_D$ (нМ) | **Репликат $K_D$ (нМ)** | **$K_D$ (нМ) Среднее значение ± SD** |
|---|---|---|---|---|---|
| **TriNKET F3'-1602** | 1,4 | 1,3 | 1,7 | 1,2 | 1,4 ± 0,2 |
| **Трастузумаб** | 1,7 | 1,6 | 1,9 | 1,6 | 1,7 ± 0,2 |

**[0692]** Связывание TriNKET F3'-1602 с высокоаффинным аллелем V158 человеческого CD16a (FcγRIIa V158) определяли так, как это описано выше, и результаты показаны на **фиг. 48**. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации данных кинетики 1:1; кинетические параметры и значения аффинности сведены в **таблице 42**. Аффинность TriNKET F3'-1602 в отношении обоих аллелей сопоставима (трехкратная разница или меньше) с аффинностью трастузумаба в отношении тех же рецепторов.

**Таблица 42**. Кинетические параметры и значения аффинности для TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении человеческого CD16a V158

| **Образец** | **$k_a$ (1/М с)** | **$k_d$ (1/с)** | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики** |
|---|---|---|---|
| TriNKET F3'-1602 | $9,6 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^{-2}$ | 234,0 |
| | $9,5 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^{-2}$ | 235,0 |
| | $9,3 \times 10^4$ | $2,3 \times 10^{-2}$ | 243,0 |
| | $9,3 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^{-2}$ | 241,0 |

| **Образец** | **$k_a$ (1/M c)** | **$k_d$ (1/c)** | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики** |
|---|---|---|---|
| **Среднее значение ± SD** | **(9,4 ± 0,2) x $10^4$** | **(2,2 ± 0,0) x $10^{-2}$** | **238,3 ± 4,4** |
| Трастузумаб | 1,7 x $10^5$ | 1,3 x $10^{-2}$ | 76,5 |
| | 1,7 x $10^5$ | 1,3 x $10^{-2}$ | 76,0 |
| | 1,3 x $10^5$ | 1,0 x $10^{-2}$ | 80,3 |
| | 1,3 x $10^5$ | 1,0 x $10^{-2}$ | 77,7 |
| **Среднее значение ± SD** | **(1,5 ± 0,2) x $10^5$** | **(1,1 ± 0,1) x $10^{-2}$** | **77,6 ± 1,9** |

**[0693]** Связывание TriNKET F3'-1602 с низкоаффинным аллелем F158 человеческого CD16a (FcγRIIIa F158) определяли так, как это описано выше, и результаты показаны на **фиг. 49**. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии; значения аффинности сведены в **таблице 43**.

**Таблица 43**. Аффинность TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении человеческого CD16a F158

| **Образец** | **Репликат $K_D$ (нМ)** | **Репликат $K_D$ (нМ)** | **Репликат $K_D$ (нМ)** | **Репликат $K_D$ (нМ)** | **$K_D$ (нМ) Среднее значение ± SD** |
|---|---|---|---|---|---|
| **TriNKET F3'-1602** | 1130,0 | 1120,0 | 1090,0 | 1090,0 | 1107,5 ± 20,6 |
| **Трастузумаб** | 436,0 | 430,0 | 445,0 | 448,0 | 439,8 ± 8,3 |

**[0694]** Связывание TriNKET F3'-1602 с человеческим CD32b (FcγRIIb) определяли так, как это описано выше, и результаты показаны на **фиг. 50**. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии; значения аффинности сведены в **таблице 44**.

**Таблица 44**. Аффинность TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении человеческого CD32b

| Образец | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | $K_D$ (мкМ) Среднее значение ± SD |
|---|---|---|---|---|---|
| **TriNKET F3'-1602** | 7,2 | 6,1 | 6,9 | 6,1 | 6,6 ± 0,6 |
| **Трастузумаб** | 7,0 | 6,7 | 7,2 | 6,6 | 6,9 ± 0,3 |

**[0695]** Связывание TriNKET F3'-1602 с человеческим CD16b (FcγRIIIb) определяли так, как это описано выше и показано на **фиг. 51**. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии; значения аффинности сведены в **таблице 45**.

**Таблица 45**. Аффинность TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении человеческого CD16b

| Образец | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | $K_D$ (мкМ) Среднее значение ± SD |
|---|---|---|---|---|---|
| **TriNKET F3'-1602** | 7,6 | 7,2 | 8,6 | 6,5 | 7,5 ± 0,8 |
| **Трастузумаб** | 4,2 | 4,0 | 4,8 | 3,8 | 4,2 ± 0,4 |

**[0696]** Связывание TriNKET F3'-1602 с CD16 яванского макака измеряли так, как это описано выше, и результаты показаны на **фиг. 52**. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии; значения аффинности сведены в **таблице 46**.

**Таблица 46**. Значения аффинности для TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении CD16 яванского макака

| Образец | Репликат $K_D$ (нМ) | Репликат $K_D$ (нМ) | Репликат $K_D$ (нМ) | Репликат $K_D$ (нМ) | $K_D$ (нМ) Среднее значение ± SD |
|---|---|---|---|---|---|
| **TriNKET F3'-1602** | 315,0 | 315,0 | 294,0 | 302,0 | 306,5 ± 10,3 |

| Образец | Репликат $K_D$ (нМ) | Репликат $K_D$ (нМ) | Репликат $K_D$ (нМ) | Репликат $K_D$ (нМ) | $K_D$ (нМ) Среднее значение ± SD |
|---|---|---|---|---|---|
| Трастузумаб | 148,0 | 141,0 | 164,0 | 149,0 | 150,5 ± 9,7 |

**[0697]** Связывание TriNKET F3'-1602 с человеческим FcRn измеряли при pH 6,0 так, как это описано выше, и результаты показаны на **фиг. 53**. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии; значения аффинности сведены в **таблице 47**.

**Таблица 47**. Значения аффинности для TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении человеческого FcRn при pH 6,0

| Образец | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | $K_D$ (мкМ) Среднее значение ± SD |
|---|---|---|---|---|---|
| TriNKET F3'-1602 | 1,3 | 1,1 | 1,5 | 1,6 | 1,4 ± 0,2 |
| Трастузумаб | 1,8 | 1,3 | 1,3 | 1,2 | 1,4 ± 0,2 |

**[0698]** Связывание TriNKET F3'-1602 с FcRn яванского макака измеряли при pH 6,0 так, как это описано выше, и результаты показаны на **фиг. 54**. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии; значения аффинности сведены в **таблице 48**.

**Таблица 48**. Значения аффинности для TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении FcRn яванского макака при pH 6,0

| Образец | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | $K_D$ (мкМ) Среднее значение ± SD |
|---|---|---|---|---|---|
| TriNKET F3'-1602 | 1,1 | 1,1 | 1,4 | 1,5 | 1,3 ± 0,2 |

| Образец | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | Репликат $K_D$ (мкМ) | $K_D$ (мкМ) Среднее значение ± SD |
|---|---|---|---|---|---|
| **Трастузумаб** | 1,6 | 1,6 | 1,2 | 1,3 | 1,4 ± 0,2 |

**[0699]** Связывание TriNKET F3'-1602 с FcRn человека и яванского макака измеряли при pH 7,4 так, как это описано выше. Поддающееся количественному определению связывание не выявили.

**[0700]** TriNKET F3'-1602 и изотипический контрольный IgG1 трастузумаб не демонстрируют физиологически значимых отличий (отличие в менее чем 3 раза), и они сопоставимы по своему связыванию с тестируемыми рекомбинантными рецепторами CD64 (FcγRI), CD16 (FcγRIII) человека и яванского макака (**таблица 49**). TriNKET F3'-1602 и трастузумаб сходны (отличие в менее чем 1,2 раза) по своему связыванию с рецепторами (FcγRII) человеческого CD32 (**таблица 49**). TriNKET F3'-1602 идентично трастузумабу по своей аффинности в отношении FcRn человека и яванского макака при pH 6,0. TriNKET F3'-1602 и трастузумаб не продемонстрировали какого-либо выявляемого связывания в концентрациях, тестируемых при pH 7,4 (**таблица 50**).

**Таблица 49**. Сводные данные по значениям аффинности TriNKET F3'-1602 и трастузумаба в отношении FcγR

| Образец | Человеческий CD64 $K_D$, нМ | $K_D$ CD64 яванского макака, нМ | Человеческий CD32a $K_D$, мкМ | | Человеческий CD16a $K_D$, нМ | | Человеческий CD32b $K_D$, мкМ | Человеческий CD16b $K_D$, мкМ | CD16 яванского макака $K_D$, нМ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | H131 | R131 | V158 | F158 | | | |
| **TriNKET F3'-1602** | 5,2 ± 0,1 | 2,0 ± 0,0 | 0,9 ± 0,0 | 1,4 ± 0,2 | 238,2 ± 4,4 | 1107,5 ± 20,6 | 6,6 ± 0,6 | 7,5 ± 0,8 | 306,5 ± 10,3 |
| **Трастузумаб** | 2,5 ± 0,1 | 0,9 ± 0,0 | 1,1 ± 0,1 | 1,7 ± 0,2 | 77,6 ± 1,9 | 439,8 ± 8,3 | 6,9 ± 0,3 | 4,2 ± 0,4 | 150,5 ± 9,7 |

**Таблица 50**. Сводные данные по связыванию TriNKET F3'-1602 и трастузумаба с FcRn человека и яванского макака

| **Образец** | **Человеческий FcRn, pH 6,0 $K_D$, мкМ** | **Человеческий FcRn, pH 7,4 $K_D$, мкМ** | **FcRn яванского макака, pH 6,0 $K_D$, мкМ** | **FcRn яванского макака, pH 7,4 $K_D$, мкМ** |
|---|---|---|---|---|
| **TriNKET F3'-1602** | **1,4 ± 0,2** | Поддающееся количественному определению связывание отсутствует | **1,3 ± 0,2** | Поддающееся количественному определению связывание отсутствует |
| **Трастузумаб** | **1,4 ± 0,2** | Поддающееся количественному определению связывание отсутствует | **1,4 ± 0,2** | Поддающееся количественному определению связывание отсутствует |

*Связывание FcRn*

**[0701]** Рекомбинантный FcRn человека или яванского макака (cyno) непосредственно иммобилизовали по аминогруппе при плотности 169-216 RU. TriNKET F3'-1602 и коммерческое антитело трастузумаб в качестве контрольного IgG1 в анализе подвергали процедуре замена буфера на MBS-EP+, pH 6,0, как это описано выше, перед экспериментом по связыванию, определяемому посредством SPR. Каждый эксперимент по связыванию FcRn состоял из нескольких циклов с использованием разных концентраций аналитов. Использовали серию двукратных разведений (от 12 мкМ до 0,023 мкМ) TriNKET F3'-1602 и трастузумаба. В качестве отрицательных контролей, не дающих сигнал, в начале каждой серии концентраций добавляли холостой цикл при 0 нМ, и при этом использовался пустой чип с поверхностью без FcRn, модифицированной посредством иммобилизации по аминогруппе. Каждый экспериментальный цикл включал стадии ассоциации, диссоциации и регенерации. Стадия ассоциации состояла из 60-секундного введения аналита, после чего следовала 60-секундная стадия диссоциации. Каждый кинетический цикл завершала регенерация поверхности (60-секундное введение буфера HBS-EP+, pH 7,4). Все стадии выполняли при скорости потока 30 мкл/мин и при 25°C. В качестве подвижного буфера использовали буфер MBS-EP+, pH 6,0. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии посредством оценочного программного обеспечения Biacore

Insight. Для оценки точности аппроксимации использовали $Chi^2$ (рассчитанный с помощью программного обеспечения) в сопоставлении с рассчитанным $R_{max}$.

**Пример 12. Анализ молекулярного формата и дизайна, структуры, аффинности, активности, специфичности и перекрестной реактивности TriNKET F3'-1602**

*Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)*

**[0702]** Значения аффинности связывания TriNKET F3'-1602 в отношении рекомбинантного CLEC12A человека (hCLEC12A) или CLEC12A (cCLEC12A) яванского макака измеряли посредством SPR с использованием прибора Biacore 8K при физиологической температуре 37°C. Если вкратце, антитела, специфические к человеческому Fc, ковалентно иммобилизовали при плотности приблизительно 8000-10000 резонансных единиц (RU) на карбоксиметилдекстрановой матрице биосенсорного чипа CM5 с получением чипа с IgG к hFc. Образцы TriNKET F3'-1602 вводили на чип с IgG к hFc со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 60 секунд с достижением уровня захвата приблизительно 250 RU. hCLEC12A-His или cCLEC12A-His серийно разводили (от 100 нМ до 0,14 нМ) в трехкратных разведениях посредством подвижного буфера и вводили при скорости потока 30 мкл/мин поверх захваченных тестируемых образцов. Ассоциацию отслеживали в течение 300 секунд, а диссоциацию отслеживали в течение 900 секунд. Поверхности регенерировали между циклами посредством трех впрыскиваний 10 мМ глицина-HCl (pH 1,7) продолжительностью 20 секунд при 100 мкл/мин.

**[0703]** Кинетические константы и значения равновесной аффинности связывания представлены в **таблице 51**, а исходные данные и модели аппроксимации показаны на **фиг. 55**. Молекула прочно связывается с CLEC12A и слабо с NKG2D и CD16a. Комплекс между TriNKET F3'-1602 и CLEC12A человека является прочным, о чем свидетельствует низкая константа скорости диссоциации, составляющая $4,94 \pm 0,09 \times 10^{-4}$ $c^{-1}$. Равновесная аффинность связывания $K_D$ для TriNKET F3'-1602 составляла $0,59 \pm 0,01$ нМ.

**Таблица 51**. Сравнение кинетических параметров TriNKET F3'-1602 в отношении CLEC12A человека при pH 7,4 и pH 6,0

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($s^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|
| TriNKET F3'-1602 № 1 | hCLEC12A-His | $8,54 \times 10^5$ | $4,94 \times 10^{-4}$ | 0,58 |
| TriNKET F3'-1602 № 2 | hCLEC12A-His | $8,33 \times 10^5$ | $4,94 \times 10^{-4}$ | 0,59 |
| TriNKET F3'-1602 № 3 | hCLEC12A-His | $8,63 \times 10^5$ | $4,89 \times 10^{-4}$ | 0,57 |

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($s^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|
| TriNKET F3'-1602 № 4 | hCLEC12A-His | 8,26 x $10^5$ | 4,99 x $10^{-4}$ | 0,60 |
| **Среднее значение ± станд. откл.** | **hCLEC12A-His** | **(8,44 ± 0,03) x $10^5$** | **(4,94 ± 0,09) x $10^{-4}$** | **0,59 ± 0,01** |

**[0704]** Кроме того, полиморфный вариант CLEC12A-K244Q преобладает у приблизительно 30% населения. Связывание TriNKET F3'-1602 с CLEC12A-K244Q оценивали посредством SPR и сравнивали его аффинность с аффинностью CLEC12A дикого типа. Как показано в **таблице 52**, параметры кинетики связывания TriNKET F3'-1602 в отношении дикого типа и варианта K244Q CLEC12A являются идентичными.

**Таблица 52**. Кинетические параметры и значения аффинности TriNKET F3'-1602 в отношении CLEC12A-K244Q человека

| **Тестируемые образцы** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|
| TriNKET F3'-1602 | hCLEC12A WT | 8,26 x $10^5$ | 4,96 x $10^{-4}$ | 0,60 |
| TriNKET F3'-1602 | hCLEC12A-K244Q | 5,65 x $10^5$ | 4,36 x $10^{-4}$ | 0,77 |

**[0705]** Значения аффинности связывания TriNKET F3'-1602 в отношении рекомбинантного NKG2D человека измеряли посредством SPR с использованием прибора Biacore 8K при физиологической температуре 37°C. Если вкратце, антитела, специфические к мышиному Fc (mFc), ковалентно иммобилизовали при плотности приблизительно 8000-10000 RU на карбоксиметилдекстрановой матрице биосенсорного чипа CM5 с получением чипа с IgG к mFc. Обеспечивали захват NKG2D человека, меченного mFc, на чипе с IgG к mFc при скорости потока 10 мкл/мин в течение 60 секунд с достижением уровня захвата приблизительно 35 RU. TriNKET F3'-1602 подвергали замене буфера на подвижный буфер и серийно разводили (от 5000 нМ до 9,78 нМ) в двукратных разведениях посредством 1x HBS-EP+. TriNKET F3'-1602 вводили со скоростью потока 30 мкл/мин поверх захваченных тестируемых образцов. Ассоциацию отслеживали в течение 60 секунд, а диссоциацию отслеживали в течение 60 секунд. Поверхности регенерировали между циклами посредством трех впрыскиваний 10 мМ глицина-HCl (pH 1,7) продолжительностью 20 секунд при 100 мкл/мин.

**[0706]** На **фиг. 56** показаны сенсограммы связывания TriNKET F3'-1602 с NKG2D человека. Для получения данных равновесной аффинности использовали два разных типа

моделей аппроксимации: аппроксимация с использованием аффинности в стационарном состоянии и аппроксимация данных кинетики. Кинетические константы и равновесные константы аффинности показаны в **таблице 54**. Константа скорости диссоциации составляла (1,30 ± 0,03) x $10^{-1}$ $c^{-1}$. Равновесные константы аффинности ($K_D$), полученные посредством аппроксимации данных кинетики и аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии, составляли 721 ± 21 нМ и 727 ± 22 нМ соответственно.

**Таблица 54**. Кинетические параметры и значения аффинности TriNKET F3'-1602 в отношении NKG2D человека, измеренные посредством SPR

| **Тестируемые образцы** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **Аппроксимация данных кинетики $K_D$ (нМ)** | **Аппроксимация с использованием аффинности в стационарном состоянии $K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|
| TriNKET F3'-1602 № 1 | hNKG2D | 1,80 x $10^5$ | 1,26 x $10^{-1}$ | 703 | 709 |
| TriNKET F3'-1602 № 2 | hNKG2D | 1,84 x $10^5$ | 1,30x $10^{-1}$ | 705 | 709 |
| TriNKET F3'-1602 № 3 | hNKG2D | 1,75 x $10^5$ | 1,31 x $10^{-1}$ | 745 | 751 |
| TriNKET F3'-1602 № 4 | hNKG2D | 1,80 x $10^5$ | 1,32 x $10^{-1}$ | 732 | 740 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **hNKG2D** | **(1,80±0,04)x $10^5$** | **(1,30±0,03)x10$^{-1}$** | **721 ± 21** | **727 ± 22** |

**[0707]** Перекрестную реактивность TriNKET F3'-1602 с NKG2D яванского макака дополнительно исследовали посредством SPR, как это описано в примерах 5 или 6. TriNKET F3'-1602 тестировали в отношении связывания с внеклеточным доменом (ECD) рекомбинантного NKG2D яванского макака (cNKG2D) посредством SPR (Biacore) при

37°C (**фиг. 57**). NKG2D по своей природе является димером, поэтому для данного эксперимента использовали рекомбинантный димер NKG2D яванского макака, меченный mFc. Значения аффинности связывания показаны в **таблице 55**. Значения аффинности связывания получали посредством аппроксимации данных кинетики ($K_D$ 839 ± 67 нМ) и аппроксимации с использованием модели в стационарном состоянии ($K_D$ 828 ± 88 нМ), и они были подобны аффинности связывания, наблюдаемой в отношении hCLEC12A ($K_D$ 721 ± 21 нМ, полученная посредством аппроксимации данных кинетики).

**Таблица 55**. Кинетические параметры и значения аффинности связывания TriNKET F3'-1602 с NKG2D яванского макака, измеренные посредством SPR

| **Тестируемые образцы** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **Аппроксимация данных кинетики $K_D$ (нМ)** | **Аппроксимация с использованием аффинности в стационарном состоянии $K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|
| TriNKET F3'-1602 № 1 | cNKG2D | 1,77 X $10^5$ | 1,47 X $10^{-1}$ | 831 | 829 |
| TriNKET F3'-1602 № 2 | cNKG2D | 1,64 X $10^5$ | 1,36 X $10^{-1}$ | 825 | 828 |
| TriNKET F3'-1602 № 3 | cNKG2D | 1,56 X $10^5$ | 1,45 X $10^{-1}$ | 931 | 935 |
| TriNKET F3'-1602 № 4 | cNKG2D | 1,76 X $10^5$ | 1,35 X $10^{-1}$ | 769 | 719 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **cNKG2D** | **(1,68 ± 0,1) x $10^5$** | **(1,41 ± 0,06) x $10^{-1}$** | **839 ± 67** | **828 ± 88** |

*Одновременное вовлечение во взаимодействие CLEC12A и NKG2D*

**[0708]** TriNKET F3'-1602 разводили в 1x буфере HBS-EP+, содержащем 0,1 мг/мл BSA, и осуществляли его захват на поверхности чипа CM5 с антителом к Fc человека при скорости потока 5 мкл/мин в течение 60 с с достижением уровня захвата 150-250 RU. Регистрировали чистую разницу между базовым сигналом и сигналом после завершения

введения TriNKET F3'-1602, представляющую количество захваченного F3'-1602. Вводили hCLEC12A-His (100 нМ) или mFc-hNKG2D (7 мкМ) поверх захваченного TriNKET F3'-1602 со скоростью 30 мкл/мин в течение 90 с с достижением насыщения. После этого введения немедленно следовало введение предварительно инкубированной смеси hCLEC12A-His (100 нМ) и mFc-hNKG2D (7 мкМ) со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 90 с с использованием команды введения A-B-A в управляющем программном обеспечении Biacore 8K (вторая мишень была предварительно смешана с первой мишенью, чтобы гарантировать, что все участки связывания для первой мишени заняты). Чип регенерировали посредством двух 20-секундных впрыскиваний 10 мМ глицина (pH 1,7) при 100 мкл/мин. Эксперимент выполняли при температуре 37°C для имитации физиологической температуры. Среднее значение относительной стехиометрии связывания каждой мишени, связанной с захваченным TriNKET F3'-1602, которое уже насыщено другой мишенью (введенной второй), выражали в виде доли связывания с полной загрузкой с незанятым TriNKET F3'-1602.

**[0709]** Сенсограммы связывания мишени, показанные на **фиг. 58**, демонстрируют, что состояние занятости домена CLEC12A не препятствует связыванию NKG2D, а состояние занятости домена NKG2D не препятствует связыванию CLEC12A. Сходство форм соответствующих участков сенсограммы, изображающих связывание каждой мишени со свободным TriNKET F3'-1602 и TriNKET F3'-1602, который был насыщен другой мишенью, свидетельствует о том, что статус занятости мишенью молекулы TriNKET F3'-1602 не оказывал значимого влияния на кинетические параметры. Например, форма участка, соответствующего связыванию CLEC12A, на сенсограммах является сходной на обеих панелях. Насыщающая концентрация NKG2D поддерживалась на протяжении всего эксперимента, представленного на нижней панели, ввиду высокой скорости диссоциации мишени. Кроме того, отсутствие какого-либо влияния на относительную стехиометрию связывания каждой мишени (по сравнению со связыванием с незанятым F3'-1602) означает полную независимость участков связывания NKG2D и CLEC12A на TriNKET F3'-1602 (**таблица 56**).

**Таблица 56**. Значения относительной стехиометрии связывания TriNKET F3'-1602 с CLEC12A и NKG2D, выраженные относительно связывания каждой мишени с незанятым захваченным TriNKET F3'-1602

| | **CLEC12A, относительная стехиометрия связывания** | **NKG2D, относительная стехиометрия связывания** |
|---|---|---|
| Мишень связана с TriNKET F3'-1602, которое незанято другой мишенью (вводили первой) | 1,00 | 1,00 |
| Мишень связана с TriNKET F3'-1602, которое насыщено другой мишенью (вводили второй) | 1,21 ± 0,06 | 1,19 ± 0,04 |

*Синергизм в отношении NKG2D-CD16a*

**[0710]** Синергическое связывание NKG2D и CD16a оценивали посредством SPR. 233 RU только hNKG2D, 618 RU только аллеля F158 CD16a и 797 RU смеси hNKG2D и CD16a (F158) иммобилизовали по аминогруппе с поверхностью чипа CM5 серии S от Biacore. 2,8 мкМ TriNKET F3'-1602 или трастузумаба вводили в течение 150 с при 10 мкл/мин. Фазу диссоциации контролировали в течение 180 секунд, в случае если регенерация не требовалась, и 1500 секунд, в случае если требовалась естественная регенерация поверхности (практически полная диссоциация аналита) между циклами при одинаковой скорости потока.

**[0711]** Как показано на **фиг. 59**, в то время как TriNKET F3'-1602 связывается с низкой аффинностью только с CD16a или NKG2D, TriNKET F3'-1602, введенный на смешанную поверхность, проявляет авидность одновременного связывания CD16a и NKG2D за счет более медленной скорости диссоциации (**фиг. 59A**). Трастузумаб, используемый в качестве контроля в эксперименте, не связывает иммобилизованный NKG2D и демонстрирует одинаковую кажущуюся скорость диссоциации в случае введения как на смешанные поверхности (CD16a + NKG2D), так и на поверхности, содержащие только CD16a (**фиг. 59B**). Данные указывают на то, что TriNKET F3'-1602 авидно вовлекает во взаимодействие как CD16a, так и NKG2D.

*Связывание неродственных рекомбинантных белков и специфичность связывания клеток*

**[0712]** Посредством SPR тестировали специфичность к CLEC12A в сравнении со специфичностью к пяти разным неродственным белкам при концентрациях, не

превышающих до 500 нМ, и ее результаты показаны на **фиг. 60**. Неспецифического связывания ни с одной из неспецифичных рекомбинантных мишеней не выявили (**фиг. 60B**, **фиг. 60C**), тогда как положительный контроль (CLEC12A) продемонстрировал связывание 50 RU при концентрации 100 нМ (**фиг. 60A**). Также тестировали специфичность в отношении белков, экспрессируемых на поверхности клеточной линии Ba/F3. Неспецифического связывания F3'-1602 в концентрации 333 нМ с родительской клеточной линией Ba/F3 не выявили (**фиг. 60E**), тогда как клеточные линии Ba/F3, сконструированные для экспрессии CLEC12A, используемые в качестве положительного контроля, продемонстрировали значительный сдвиг, определенный посредством проточной цитометрии (**фиг. 60D**).

*Неспецифическое связывание с полиспецифическим реагентом (PSR)*

**[0713]** Анализ с использованием PSR на основе проточной цитометрии позволяет отсеивать антитела, которые обладают более высокой вероятностью к неспецифическому связыванию с неродственными белками. В рамках оценки реализуемости F3'-1602 тестировали в отношении неспецифического связывания с препаратом на основе мембранных белков, солюбилизированных детергентом, в анализе с использованием PSR (**фиг. 61**). Анализ с использованием PSR положительно коррелирует с хроматографией перекрестного взаимодействия, суррогатным методом анализа растворимости антител, а также с твердофазным иммуноферментным анализом с использованием бакуловирусных частиц, суррогатным методом анализа клиренса *in vivo* (Xu *et. al* (2013). Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. *Protein engineering design and selection*, 26, 663-670).

**[0714]** 50 мкл TriNKET или контрольного mAb в концентрации 100 нМ в PBSF инкубировали с 5 мкл суспензии предварительно промытых гранул Dynabeads Protein A (Invitrogen, № по каталогу 10001D) в течение 30 минут при комнатной температуре. Магнитные микроносители, связанные с TriNKET или mAb, отстаивали на магнитной подставке в течение 60 секунд и удаляли супернатант. Связанные гранулы промывали посредством 100 мкл PBSF. Гранулы инкубировали в течение 20 минут на льду с 50 мкл биотинилированного реагента PSR, который представлял собой 25-кратное разведение исходного раствора (Xu *et. al.*, (2013) *Protein engineering design and selection*, 26, 663-670). Образцы помещали на магнитную подставку, удаляли супернатант и промывали посредством 100 мкл PBSF. Вторичный реагент для FACS, предназначенный для выявления связывания биотинилированного реагента PSR с TriNKET или контрольными mAb, готовили следующим образом: 1:250 мкл стрептавидина-PE (Biolegend, № по

каталогу 405204) и 1:100 ослиного антитела к Fc человека смешивали в PBSF. К каждому образцу добавляли 100 мкл вторичных реагентов и инкубировали в течение 20 минут на льду. Гранулы дважды промывали посредством 100 мкл PBSF и образцы анализировали на FACS Celesta (BD). В анализе использовали два контроля PSR, ритуксимаб (положительный в PSR) и трастузумаб (чистый профиль в PSR).

*Анализ перекрестной реактивности High-Spec® с использованием микрочипов протеома человека HuProt™*

**[0715]** Для исследования специфичности TriNKET F3'-1602 использовали технологию на основе белкового микрочипа. Микрочип протеома человека HuProt™ представляет собой самую большую базу данных индивидуально очищенных полноразмерных человеческих белков на одном предметном стекле. Массив, состоящий из 22000 полноразмерных человеческих белков, экспрессировали в дрожжах *S. cerevisiae*, очищали и затем наносили в двух параллелях на предметное стекло в виде микрочипа, что дает возможность определять профили тысяч взаимодействий посредством высокопроизводительного способа.

**[0716]** Специфичность TriNKET F3'-1602 тестировали при концентрации 0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл в отношении нативного протеома человека на микрочипе Huprot, нанесенного на предметные стекла, в CDI Laboratories (Балтимор, Мэриленд) в соответствии с их стандартной процедурой.

**[0717]** На **фиг. 62** показано относительное связывание (Z-показатель) TriNKET F3'-1602 при 1 мкг/мл с CLEC12A человека по сравнению с микрочипом полного протеома человека. Z-показатель представляет собой средний показатель связывания данного белка в двух повторах. В целях сравнения 24 основных белка с остаточным фоновым связыванием с TriNKET F3'-1602 также представлены на **фиг. 62**. В **таблице 57** представлены Z- и S-показатели для TriNKET F3'-1602 в отношении CLEC12A человека и 6 основных белков из микрочипа. S-показатель представляет собой разницу между Z-показателем для указанного белка и для следующего в одном ряду с ним. Если S-показатель для основного хита составляет > 3, то антитело считают высокоспецифичным по отношению к его мишени. Основываясь на критериях Z- и S-показателей, TriNKET F3'-1602 продемонстрировало высокую специфичность к человеку и отсутствие нецелевого связывания в анализе с использованием протеома человека HuProt™.

**Таблица 57**. Z- и S-показатели для TriNKET F3'-1602 в анализе с использованием микрочипа протеома человека HuProt™

**[0718]**

| Название | Место в ряду | ID белка | Z-показатель | S-показатель |
|---|---|---|---|---|
| hCLEC12A | 1 | | 150,21 | 144,62 |
| MFF | 2 | JHU15965.P1168B06 | 5,60 | 0,59 |
| RPLP0 | 3 | JHU16464.P173H05 | 5,01 | 0,12 |
| PARS2 | 4 | JHU06781.P071H01 | 4,89 | 0,062 |
| HMGA1_frag | 5 | JHU16418.P173B08 | 4,83 | 0,27 |
| THEMIS2_frag | 6 | JHU15201.P160B01 | 4,56 | 0,37 |
| HAGHL | 7 | JHU08774.P092D12 | 4,19 | 0,01 |

*Молекулярное моделирование*

**[0719]** Плечи TriNKET F3'-1602, связывающие CLEC12A и NKG2D, сравнивали с 377 биотерапевтическими молекулами, прошедшими фазу I, с использованием вычислительного инструмента для определения профилей терапевтических антител (TAP), доступной на веб-сайте SAbPred. В TAP использовали ABodyBuilder для построения модели для TriNKET F3'-1602 с боковыми цепями с помощью PEARS. CDRH3 построили с помощью MODELLER ввиду его разнообразия.

**[0720]** Оценивали следующие пять различных параметров.

Общая длина CDR

Зоны поверхностной гидрофобности (PSH) в непосредственной близости от CDR

Зоны положительного заряда (PPC) в непосредственной близости от CDR

Зоны отрицательного заряда (PNC) в непосредственной близости от CDR

Структура, симметрия заряда, параметр заряда Fv (sFvCSP)

**[0721]** Эти параметры TriNKET F3'-1602 затем сравнивали с распределениями профилей терапевтических антител для прогнозирования реализуемости и любых потенциальных проблем, которые могут привести к последующим трудностям.

**[0722]** На **фиг. 63** демонстрируется ленточная диаграмма модели scFv, связывающего CLEC12A, в трех различных ориентациях (верхняя панель) и их соответствующее распределение поверхностного заряда с той же ориентацией (нижняя панель). Распределение заряда scFv антитела к CLEC12A является поляризованным ("вид сверху", нижняя панель) с отрицательно заряженными остатками, находящимися преимущественно в CDRH3 и CDRL2. Неравномерное распределение электростатических

зон на паратопе очевидно связано с мишенью и отражает комплементарность распределения заряда на его родственном эпитопе, что вероятно может способствовать высокоаффинному взаимодействию между CLEC12A и scFv TriNKET F3'-1602.

**[0723]** На **фиг. 64**показаны результаты анализов длины CDR и поверхностной гидрофобности scFv CLEC12A-нацеливающего плеча TriNKET F3'-1602. Длина CDR для плеча TriNKET F3'-1602, связывающего CLEC12A, является типичной для терапевтических антител на поздней стадии их испытания.

**[0724]** Гидрофобность моноклонального антитела является важным биофизическим свойством, определяющим его реализуемость в терапевтическое средство. Анализ гидрофобных участков в CDR антител дает возможность прогнозировать его характеристики. Плечо CLEC12A в TriNKET F3'-1602 характеризуется гораздо более низкой гидрофобностью по сравнению с другими референтными молекулами. На основании моделирования обнаружили, что на поверхности CLEC12A-связывающего плеча TriNKET F3'-1602 отсутствует гидрофобная зона значительного размера.

**[0725]** Распределение заряда scFv антитела к CLEC12A является поляризованным с отрицательно заряженными остатками, включенными преимущественно в CDRH3 и CDRL2 (как показано на **фиг. 63**). Хотя положительно заряженные зоны и симметрия заряда находятся в пределах нормы, без ограничения какой-либо теорией предполагается, что различные отрицательно заряженные зоны на паратопе связаны с мишенью и отражают комплементарность распределения заряда на его родственном эпитопе, что может способствовать его высокоаффинному взаимодействию с CLEC12A.

**[0726]** NKG2D-связывающее плечо Fab TriNKET F3'-1602 показано на ленточных диаграммах с тремя разными ориентациями (**фиг. 65**), а их соответствующее распределение поверхностного заряда одинаковой ориентации представлено на **фиг. 65** (нижняя панель). В отличие от CLEC12A-связывающего плеча распределение поверхностного заряда на плече A49M-I, связывающем NKG2D, является более равномерным.

**[0727]** На **фиг. 66** показаны результаты анализов длины CDR и зон поверхностной гидрофобности NKG2D-нацеливающегося плеча TriNKET F3'-1602. Анализ осуществляли с использованием TAP и сравнивали с 377 терапевтическими антителами на поздней стадии их испытания. Очевидно, длина CDR, гидрофобные свойства, распределения положительных/отрицательных зарядов и симметрия заряда Fc NKG2D-нацеливающегося плеча TriNKET F3'-1602 находятся в пределах нормы существующих терапевтических антител. Моделирование свидетельствует о том, что в ходе процессов производства сложности с реализуемостью TriNKET F3'-1602 будут отсутствовать.

*Хроматография с гидрофобным взаимодействием*

**[0728]** Данные прогнозирования гидрофобности подтверждали посредством исследования характеристик TriNKET F3'-1602 с помощью аналитической хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC), методики, основанной на белках со значительными зонами экспонированных гидрофобных зон, которые проявляют большую склонность к агрегации. Если вкратце, для выполнения HIC образцы TriNKET (5 мкг белка) для введения готовили с высокосолевым буфером (100 мМ фосфата натрия, 1,8 М сульфата аммония, pH 6,5) в соотношении 5:4. Образцы анализировали посредством HPLC с использованием Agilent 1260 Infinity II, оснащенного колонкой Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5 5 мкм, с поддержанием температуры 25°C. Осуществляли элюирование градиентом от 0% низкосолевого буфера (100 мМ фосфата натрия, pH 6,5) до 100% низкосолевого буфера в течение 6,5 минут при скорости потока 1,0 мл/минута. Хроматограммы регистрировали при 280 нм. Значения времени удерживания для TriNKET F3'-1602 на аналитической колонке для HIC показаны в **таблице 58** и HIC-профиль на **фиг. 67**. Коммерческий трастузумаб (Roche) использовали в качестве примера биологического препарата с надлежащими характеристиками, при этом его использовали в качестве внутреннего контроля для анализа. TriNKET F3'-1602 характеризуется временем удерживания 9,8 минуты по сравнению с 9,6 минуты для трастузумаба. Таким образом, экспериментальный анализ гидрофобности свидетельствует о том, что гидрофобные свойства TriNKET F3'-1602 приемлемы для дальнейшей разработок.

**Таблица 58**. Время удерживания в HIC-анализе для TriNKET F3'-1602 по сравнению с трастузумабом

| **Тестируемый образец** | **Время удерживания в HIC-анализе (мин)** |
|---|---|
| TriNKET F3'-1602 | 9,8 |
| Трастузумаб | 9,6 |

*Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF)*

**[0729]** Экспериментальную pI для F3'-1602 определяли посредством cIEF, как это описано в примере 15 (**фиг. 68**). Коммерчески изготовленное антитело трастузумаб включили в анализ в качестве внутреннего контроля. cIEF-профиль для TriNKET F3'-1602 был типичным для моноклонального антитела с главным пиком при pI 8,80 (**таблица 59**). Также наблюдали присутствие незначительных количеств кислых и основных фракций.

**Таблица 59**. pI F3' scFv-1602, определенная посредством cIEF, при сравнении с трастузумабом

| Тестируемый образец | pI (основной пик) |
|---|---|
| scFv-1602 F3' | 8,80 |
| Трастузумаб | 8,91 |

*Оценка иммуногенности*

**[0730]** Оценку иммуногенности выполняли с применением алгоритма EpiMatrix от EpiVax согласно описанному в Cohen et al. (2010) A method for individualizing the prediction of immunogenicity of protein vaccines and biologic therapeutics: individualized T cell epitope measure (iTEM). *J.Biomed. Biotechnol*. 961752. Показатель иммуногенности белка по шкале Epimatrix с поправкой на $T_{reg}$, который варьирует в диапазоне от -80 (отсутствие иммуногенности) до 80 (высокая иммуногенность), для последовательностей трех цепей из F3' scFv-1602 составил для VH-CH1-Fc: -33,39, для VH-VL-Fc: -26,4 и для VL-CL: -27,4. Таким образом, прогнозируемый риск иммуногенности для F3' scFv-1602 оценивают как низкий.

**Пример 13. Анализ TriNKET F3'-1602 на потенциальные участки неблагоприятных модификаций в последовательности**

**[0731]** Аминокислотные последовательности трех полипептидных цепей TriNKET F3'-1602 анализировали в отношении потенциальных участков неблагоприятных модификаций в последовательности, описанных в примере 3. Потенциальные участки неблагоприятных модификаций в последовательности показаны в **таблице 60**.

**Таблица 60**. Потенциальные участки неблагоприятных модификаций в последовательности в TriNKET F3'-1602 CDR пронумерованы согласно Chothia.

| VL-CL | VH-CH1-Fc | VH-VL-Fc |
|---|---|---|
| Отсутствуют | **DP** в CDRH3 (потенциальная химическая нестабильность) | **DS** в CDRH3 (потенциальная изомеризация аспартата) |

**[0732]** Чтобы оценить потенциальные участки неблагоприятных модификаций осуществляли испытания стабильности методом ускоренного старения (4 недели при 40°C) и испытания стабильности при принудительном разложении. DP в CDRH3 VH-CH1-Fc не поддавался модификации при испытаниях стабильности методом ускоренного старения или при испытаниях стабильности при принудительном разложении, поэтому дальнейший анализ не требовался. Однако было отмечено, что модификация DS в CDRH3 в scFv приводила к уменьшению связывания CLEC12A и снижению эффективности

TriNKET F3'-1602 в испытаниях стабильности методом ускоренного старения, описанных в примере 14.

**[0733]** Для замены DS в CDRH3 использовали технологию дрожжевого дисплея для идентификации альтернативных мотивов последовательности без участка DS. Три варианта, а именно YDYD**DA**LDY (SEQ ID NO:283) YDYD**DI**LDY (SEQ ID NO:284) и YDYD**DL**LDY (SEQ ID NO:285), идентифицировали как демонстрирующие связывание с hCLEC12A, хотя и с более слабым сигналом связывания по сравнению с родительским scFv (YDYD**DS**LDY) (SEQ ID NO:139), тогда как варианты YDYD**DV**LDY (SEQ ID NO:290), YDYD**DT**LDY (SEQ ID NO:291) и YDYD**ES**LDY (SEQ ID NO:292) были идентифицированы как несвязывающие молекулы. На основании анализа связывания только варианты YDYD**DA**LDY ((SEQ ID NO:283), AB0053) и YDYD**DI**LDY ((SEQ ID NO:284), AB0085) рассматривались для продуцирования в млекопитающих и дальнейшего определения характеристик. Определяли характеристики связывания AB0053 и AB0085 с hCLEC12A-His с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37°C. Обе мутации, введенные для устранения неблагоприятной модификации DS, оказывали влияние на связывание с hCLEC12A-His (**таблица 61**). На **фиг. 69** представлены результаты FACS-анализа связывания с hCLEC12A-his с использованием дрожжевых библиотек, полученных для устранения потенциальных участков неблагоприятных модификаций последовательности в CDRH3. Данные показали полную потерю связывания в DS по сравнению со сконструированным вариантом DI (AB0085). Введение DA вместо DS (AB0053) не устраняло связывание полностью, однако приводило к кажущейся гетерогенности на сенсограмме связывания. После анализа посредством SPR активность вариантов с устраненными потенциальными участками неблагоприятных модификаций последовательности (AB0053 и AB0085) тестировали в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV (**фиг. 70**, **таблица 62**). AB0085 утратило способность к уничтожению клеток AML, что определяли по значительно сниженному проценту максимального уничтожения. EC50 для конструкции AB0053 повышалась в приблизительно 3 раза по сравнению с контролем TriNKET F3'-1602 (AB0237), тогда как процент максимального уничтожения не изменился. Эти данные согласуются с изменением в 3 раза общей аффинности к hCLEC12A, установленным в эксперименте с использованием SPR-анализа (**таблица 61**).

**[0734]** Значения аффинности связывания TriNKET F3'-1602 с рекомбинантным CLEC12A человека измеряли посредством SPR при 37°C с использованием прибора Biacore 8K. Если вкратце, антитела, специфические к Fc человека, ковалентно иммобилизовали при плотности ~8000-10000 резонансных единиц (RU) на

карбоксиметилдекстрановой матрице биосенсорного чипа CM5 посредством химической иммобилизации по аминогруппе с получением чипа с IgG к hFc. Образцы TriNKET F3'-1602 захватывали на чипе с IgG к hFc при концентрации 1,5 мкг/мл со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 60 секунд с достижением уровня захвата ~150-250 RU. Серийно разводили hCLEC12A-His (от 100 нМ до 0,046 нМ) в трехкратных разведениях посредством буфера HBS-EP+ (1X; 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% P20, pH 7,4) с 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA) и вводили при скорости потока 30 мкл/мин поверх захваченных тестируемых образцов. Ассоциацию отслеживали в течение 300 секунд, а диссоциацию отслеживали в течение 600 секунд. Поверхности регенерировали между циклами посредством трех впрыскиваний 10 мМ глицина-HCl, pH 1,7, продолжительностью 20 секунд при 100 мкл/мин. В ходе всего эксперимента использовали буфер HBS-EP+ (1X) с 0,1 мг/мл BSA. Данные анализировали с использованием оценочного программного обеспечения Biacore 8K Insight Evaluation (GE Healthcare).

**Таблица 61**. Кинетические параметры и значения аффинности DS-модифицированных клонов в отношении к hCLEC12A и CLEC12A

| **Тестируемый образец** | $k_a$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | $k_d$ **($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** | **Примечания** |
|---|---|---|---|---|
| AB0053 | $1{,}63 \times 10^{6}$ * | $k_{d1} = 1{,}57 \times 10^{-2}$ и $k_{d2} = 9{,}49 \times 10^{-4}$ | 2,41 | Аппроксимация к модели с двумя состояниями |
| AB0085 | Связывание отсутствует | | | |
| F3'-1602 (AB0237) | $1{,}11 \times 10^{6}$ | $8{,}95 \times 10^{-4}$ | 0,80 | Аппроксимация к классической модели 1:1 |

*Значение $k_{a2}$ было незначимым по сравнению со значением $k_{a1}$. Поэтому показано только значение $k_{a1}$.

**Таблица 62**. Сравнение активности DS-модифицированных TriNKET в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV

| Тестируемый образец | Клетки PL-21 | |
|---|---|---|
| | EC50 (нМ) | Макс. лизис (%) |
| **TriNKET F3'-1602** (AB0237) | 0,12 | 98,96 |
| AB0053 | 0,39 | 105,10 |
| AB0085 | N/D* | N/D |

*N/D: не определено

**[0735]** Поскольку при подходе с использованием библиотеки получали AB0053 в виде единственного хита и данный хит продемонстрировал кинетику связывания с hCLEC12A, значительно отличающуюся от такой у TriNKET F3'-1602, а также более низкую активность в анализе цитотоксичности, было сделано заключение о том, что мотив DS необходим для поддержания структуры CDRH3 и поэтому, по сути, не может быть удален. Вместо этого активность участка потенциально неблагоприятной модификации DS контролировали посредством состава, как описано в примере 14.

**Пример 14. Составы для F3'-1602**

**[0736]** В примере 13 было обнаружено, что потенциальные участки неблагоприятных модификаций являются критическими для способности F3'-1602 связывать CLEC12A, поэтому их нельзя удалять. Данный пример был предназначен для оценки составов, которые могут поддерживать стабильность F3'-1602, несмотря на присутствие потенциальных участков неблагоприятных модификаций.

**[0737]** Если вкратце, тестировали три состава для F3'-1602:

(1) 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы и 0,01% полисорбата 80 при pH 6,0, которому в данном документе присвоили название "состав HST". F3'-1602 подвергали диафильтрации в буфер HST, и выделенный образец пропускали через фильтр 0,2 мкм. Конечная концентрация F3'-1602 составила 19,7 мг/мл, что было измерено по поглощению при длине волны 280 нм (A280).

(2) 20 мМ фосфата калия, 10 мМ цитрата натрия и 125 мМ хлорида натрия при pH 7,8, которому в данном документе присвоили название "состав на основе фосфата/цитрата/NaCl". F3'-1602 подвергали замене буфера на буфер основе фосфата/цитрата/NaCl для составления с использованием блока Amicon Ultra 0,5 мл 30K и колонок для обессоливания Zeba Desalting Column, и выделенный образец пропускали через фильтр 0,2 мкм. Конечная концентрация F3'-1602 составила 20,6 мг/мл, что измерено по поглощению при длине волны 280.

(3) 20 мМ цитрата, 250 мМ сахарозы и 0,01% полисорбата 80 при pH 7,0, которому в

данном документе присвоили название "состав CST". F3'-1602 подвергали диафильтрации в буфер для составления CST, и выделенный образец пропускали через фильтр 0,2 мкм. Конечная концентрация F3'-1602 составила 20 мг/мл, что измерено по поглощению при длине волны 280.

Стабильность F3'-1602 в составе HST

**[0738]** Испытание стабильности методом ускоренного старения выполняли в буфере HST при 40°C в течение четырех недель. Эксклюзионную хроматографию (SEC) использовали для отслеживания образования высокомолекулярных фракций (HMWS) и низкомолекулярных фракций (LMWS) в зависимости от условий хранения. Если вкратце, 50 мкг тестируемого вещества вводили в прибор для жидкостной хроматографии при высоком давлении (HPLC) Agilent 1260 Infinity II с насосом для четырехкомпонетных смесей 1260 Quat, пробоотборником 1260 Vialsampler, 1260 VWD. Образец разделяли на колонке с гелем Tosoh TSKgel G3000SWxl, внутренний диаметр 7,8 мм x 30 см, 5 мкм. Буфер подвижной фазы для SEC представлял собой PBS, pH 7,0, пропускаемый со скоростью потока 0,50 мл/мин. Поглощение считывали как при 214, так и при 280 нм, площади пиков интегрировали вручную и регистрировали процентное содержание HMWS, LMWS и мономера.

**[0739]** В начале исследования антитело F3'-1602 анализировали посредством SEC и оно характеризовалось 99,6%-ным содержанием мономера. Через четыре недели при 40°C содержание мономера снизилось до 93,1%. LMWS не выявили в контроле и их содержание возросло до 5,4% через четыре недели при 40°C. HMWS присутствовали в контроле в количестве 0,4% и их содержание возросло до 1,5% через четыре недели при 40°C (**таблица 63**). Эти данные свидетельствуют о том, что F3'-1602 разлагается главным образом за счет образования LMW-агрегатов (фрагментация).

**Таблица 63. Сводные данные SEC-анализа: %-ое содержание мономера, HMW и LMW (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе HST)**

| **Тестируемый образец** | **Мономер (%)** | **HMW (%)** | **LMW (%)** |
|---|---|---|---|
| Контроль | 99,6 | 0,4 | ND |
| 1 неделя | 99,0 | 0,7 | 0,3 |
| 2 недели | 98,5 | 1,0 | 0,5 |
| 3 недели | 97,8 | 1,5 | 0,8 |
| 4 недели | 93,1 | 1,5 | 5,4 |

ND: не выявлено

**[0740]** Значения аффинности связывания F3'-1602 с рекомбинантным CLEC12A человека измеряли посредством SPR при 37°C с использованием прибора Biacore 8K. Если вкратце, антитела, специфические к Fc человека, ковалентно иммобилизовали при плотности ~8000-10000 резонансных единиц (RU) на карбоксиметилдекстрановой матрице биосенсорного чипа CM5 посредством химической иммобилизации по аминогруппе с получением чипа с IgG к hFc. Образцы F3'-1602 захватывали на чипе с IgG к hFc при концентрации 1,5 мкг/мл со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 60 секунд с достижением уровня захвата ~150-250 RU. Серийно разводили hCLEC12A-His (от 100 нМ до 0,046 нМ) в трехкратных разведениях посредством буфера HBS-EP+ (1X) с 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA) и вводили при скорости потока 30 мкл/мин поверх захваченных тестируемых образцов. Ассоциацию отслеживали в течение 300 секунд, а диссоциацию отслеживали в течение 600 секунд. Поверхности регенерировали между циклами посредством трех впрыскиваний 10 мМ глицина-HCl, pH 1,7, продолжительностью 20 секунд при 100 мкл/мин. В ходе всего эксперимента использовали буфер HBS-EP+ (1X) с 0,1 мг/мл BSA. Данные анализировали с использованием оценочного программного обеспечения Biacore 8K Insight Evaluation (GE Healthcare). Кинетические константы скорости и общая аффинность были получены с использованием модели связывания 1:1 с аппроксимацией данных кинетики.

**[0741]** После четырех недель инкубации при 40°C в составе HST связывание F3'-1602 с CLEC12A человека снижалось (**фиг. 71**). Разница в константах скорости ассоциации и диссоциации между контролем и образцом, подвергнутым стрессовому условию 40°C, находится в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа (**таблица 64**); однако ответ при максимальном связывании, выраженный в резонансных единицах (RU), уменьшился в более чем пять раз после инкубации при 40°C (**фиг. 71**). Номинальный захват белка F3'-1602 был одинаковым как для подвергнутых стрессовому условию, так и для контрольных образцов. При таких обстоятельствах $R_{max}$ приблизительно пропорционален активной концентрации F3'-1602, захваченного на чипе Biacore. Этот результат в свою очередь указывает на то, что после воздействия тепловым стрессовым условием в составе HST более 80% молекул F3'-1602 утратили способность к связыванию CLEC12A (**таблица 64**).

**Таблица 64. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hCLEC12A (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе HST)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | **KD (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hCLEC12A | $7{,}91x10^{5}$ | $8{,}73x10^{-4}$ | 1,11 | 83,8 |
| F3'-1602 в составе HST 40°C, 4 недели | hCLEC12A | $1{,}24x10^{6}$ | $2{,}14x10^{-3}$ | 1,69 | 84,2 |

Результаты представляют среднее значение для n = 2 повторов

**[0742]** Значения аффинности связывания F3'-1602 с рекомбинантным NKG2D человека измеряли посредством SPR при 37°C с использованием прибора Biacore 8K. Если вкратце, антитела, специфические к mFc, ковалентно иммобилизовали при плотности ~8000-10000 RU на карбоксиметилдекстрановой матрице биосенсорных чипов CM5 посредством химической иммобилизации по аминогруппе с получением чипа с IgG к mFc. Обеспечивали захват NKG2D человека, меченного mFc, на чипе с IgG к mFc при концентрации 0,2 мкг/мл, при скорости потока 10 мкл/мин в течение 60 секунд с достижением уровня захвата ~35 RU. F3'-1602 подвергали замене буфера на буфер HBS-EP+ (1X) и серийно разводили (от 5000 нМ до 9,78 нМ) в двукратных разведениях посредством HBS-EP+. Аналит (F3'-1602) вводили со скоростью потока 30 мкл/мин поверх захваченных тестируемых образцов. Ассоциацию отслеживали в течение 60 секунд, а диссоциацию отслеживали в течение 60 секунд. Поверхности регенерировали между циклами посредством трех впрыскиваний 10 мМ глицина-HCl, pH 1,7, продолжительностью 20 секунд при 100 мкл/мин. В ходе всего эксперимента использовали буфер HBS-EP+ (1X). Данные анализировали с использованием оценочного программного обеспечения Biacore 8K Insight Evaluation (GE Healthcare). Аффинность связывания и кинетические скорости были получены с использованием как модели аппроксимации данных кинетики 1:1, так и модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии.

**[0743]** После четырех недель инкубации при 40°C в составе HST связывание F3'-1602 с NKG2D человека не изменилось (**фиг. 72, таблица 65**). Разница в константах скорости ассоциации и диссоциации, а также в общей аффинности к NKG2D между контролем и образцом, подвергнутым стрессовому условию 40°C, находились в пределах

экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Ответ при максимальном связывании значимо не изменился. Результаты указывают на то, что F3'-1602 сохраняет способность к связыванию NKG2D при воздействии данными тепловыми стрессовыми условиями.

**Таблица 65. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hNKG2D (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе HST)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики 1:1** | **Стационарное состояние, $K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hNKG2D | $1{,}70x10^5$ | $1{,}29x10^{-1}$ | 760 | 771 | 50,1 |
| F3'-1602 в составе HST, 40°C, 4 недели | hNKG2D | $1{,}29x10^5$ | $9{,}86x10^{-2}$ | 762 | 776 | 47,4 |

**[0744]** Значения аффинности связывания F3'-1602 с биотинилированным рекомбинантным рецептором CD16a V158 (FcγRIIIa V158) измеряли посредством SPR. Если вкратце, обеспечивали захват FcγRIIIa V158 на чипе SA серии S Biacore перед экспериментом по оценке кинетических параметров с достижением захвата ~10-25 RU. Трастузумаб, биологическое лекарственное средство на основе IgG1 с хорошо изученными свойствами, использовали в эксперименте в качестве контроля. При оценке выполняли введения разных концентраций лиганда (F3'-1602 или трастузумаба), титруемых над захваченным рецептором (от 1500 нМ до 11,7 нМ в серийном разведении 1:1 и 0 нМ). Каждый цикл введения состоял из стадий ассоциации, диссоциации и регенерации. Ассоциация состояла из введения лиганда в течение 150 секунд, при этом диссоциацию отслеживали в течение 300 секунд, а затем поверхность регенерировали между циклами с помощью 2 мМ гидроксида натрия, вводимого в течение 5 секунд. Все стадии выполняли при скорости потока 30 мкл/мин. В качестве подвижного буфера/буфера для разведения образца использовали 1x буферный раствор HBS-EP+. Данные анализировали с использованием оценочного программного обеспечения Biacore

8K Insight Evaluation (GE Healthcare). Данные аппроксимировали к кинетической модели 1:1.

**[0745]** После четырех недель инкубации при 20 мг/мл, 40°C, в составе HST связывание F3'-1602 с CD16a V158 человека не изменилось (**фиг. 73 и таблица 66**). Разница в аффинности связывания между контролем и образцом, подвергнутым стрессовому условию 40°C, а также разница в ответе при максимальном связывании ($R_{max}$) находились в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Результаты показывают, что F3'-1602 сохраняло аффинность к CD16a человека при данных условиях испытания стабильности методом ускоренного старения.

**Таблица 66. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hNKG2D (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе HST)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | **$K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hCD16aV | $(1,13\pm0,04)x10^{5}$ | $(2,40\pm0,09)x10^{-2}$ | 212±1 | 13,7 |
| F3'-1602 в составе HST, 40°C, 4 недели | hCD16aV | $(8,24\pm0,78)x10^{4}$ | $(1,65\pm0,06)x10^{-2}$ | 201±12 | 14,2 |

Результаты представляют среднее значение для n = 3 повторов

**[0746]** Влияние условий испытания стабильности методом ускоренного старения на функциональность F3'-1602 также оценивали в анализе цитотоксичности с использованием клеток KHYG-1-CD16a, сконструированных для экспрессии CD16a в дополнение к NKG2D. Человеческие раковые клеточные линии (PL-21) $CLEC12A^{+}$ метили реагентом BATDA. После мечения клетки промывали и ресуспендировали в средах для культивирования первичных клеток. Клетки, меченные BATDA, F3'-1602 и находящиеся в состоянии покоя клетки KHYG-1-CD16V вносили в лунки 96-луночного планшета. Готовили дополнительные лунки для максимального лизиса клеток-мишеней путем добавления 1% Triton-X. Спонтанное высвобождение отслеживали в лунках, содержащих только клетки, меченные BATDA. После трех часов культивирования клетки осаждали, супернатант клеточной культуры переносили в чистый микропланшет и в каждую лунку добавляли раствор европия комнатной температуры. Планшет защищали от воздействия света и инкубировали на шейкере для планшетов при 250 об/мин в течение 15 минут. Реакции в планшетах считывали с помощью прибора SpectraMax i3X. % специфического лизиса рассчитывали следующим образом:

% специфического лизиса = ((экспериментальное высвобождение – спонтанное высвобождение) / (максимальное высвобождение – спонтанное высвобождение)) * 100%

**[0747]** Как показано на **фиг. 74** и в **таблице 67** способность F3'-1602 к уничтожению раковых клеток PL21 CLEC12A$^{+}$ уменьшилась в примерно 7 раз после 4 недель при 40°C в составе HST, тогда как макс. % лизиса снижался лишь незначительно (5%).

**Таблица 67. EC50 и максимальный лизис клеток PL21 CLEC12A+ посредством F3'-1602 (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе HST)**

| **Тестируемый образец** | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис (%)** |
|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 0,17 | 63 |
| F3'-1602 в составе HST, 40°C, 4 недели | 1,21 | 58 |

**[0748]** Значительная потеря связывания с hCLEC12A после инкубации при 40°C и соответствующая потеря активности приводили к исследованию основной причины возникновения таких свойств. Пептидное картирование посредством UHPLC-MS/MS продемонстрировало, что аспарагиновая кислота в scFv антитела к CLEC12A (CDR-H3) подвергалась изомеризации (**фиг. 75**).

**[0749]** CDRH3 F3'-1602, как определено согласно Chothia, содержит четыре аспарагиновые кислоты (DYDDSLDY [SEQ ID NO:293]). Для определения того, какие из них подвергались изомеризации, использовали MS/MS путем отслеживания сукцинимидного промежуточного соединения. Превращение в изоаспарагиновую кислоту не приводит в результате к различию по массам, тогда как промежуточное сукцинимидное соединение соответствует потере воды (примерно 18 Да). Этот сдвиг масс можно использовать для идентификации аспарагиновой кислоты, которая изомеризуется. MS/MS-спектры немодифицированного химотриптического пептида и соответствующего сукцинимидного варианта показали, что аспарагиновая кислота в положении H99 (Chothia) в VH scFv (DYDDSLDY [SEQ ID NO:293]) была ответственной за изомеризацию.

Стабильность F3'-1602 в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl

**[0750]** Попытки устранить потенциальный участок неблагоприятных модификаций путем мутагенеза показали, что аспарагиновая кислота в положении H99 CLEC12A-связывающего scFv является важной детерминантой структуры CDR и ее нельзя просто заменить без потери связывания с мишенью. Поэтому осуществляли ограниченную предварительную разработку состава для определения состава с более щелочным pH, поскольку скорость изомеризации является pH-зависимой. Зависимость от pH была подтверждена посредством воздействия стрессовым условием на F3'-1602 в цитратно-

фосфатном буфере, охватывающем pH 5,5-7,5. Через 4 недели при 40°C в фосфатном буфере (pH 6,5/7,0/7,5) F3'-1602 продемонстрировало pH-зависимую потерю связывания с CLEC12A. Интересно отметить, что в цитратном буфере (pH 5,5/6,0/6,5) такой тенденции не выявили. На основании данных результатов были разработаны дополнительные составы, а традиционные вспомогательные вещества (NaCl, сахароза, EDTA) подвергали скринингу в отношении их способности стабилизировать связывание CLEC12A (**таблица 68**). Данный скрининг показал, что высокие значения pH и NaCl оказывали защитный эффект в отношении связывания CLEC12A.

**Таблица 68. Составы на основе фосфатных/цитратных буферов**

| % буфера | Цитрат (мМ) | Фосфат (мМ) | EDTA (мМ) | Сахароза (мМ) | NaCl (мМ) | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7,0 |
| 2 | 20 | 50 | 0 | 0 | 0 | 7,0 |
| 3 | 20 | 50 | 0 | 0 | 0 | 7,5 |
| 4 | 20 | 50 | 0 | 0 | 0 | 8,0 |
| 5 | 0 | 50 | 10 | 0 | 0 | 7,0 |
| 6 | 0 | 50 | 10 | 0 | 0 | 7,5 |
| 7 | 0 | 50 | 10 | 0 | 0 | 8,0 |
| 8 | 50 | 0 | 0 | 250 | 0 | 7,0 |
| 9 | 50 | 0 | 0 | 0 | 250 | 7,0 |

**[0751]** На основании данных результатов F3'-1602 составляли в 20 мМ фосфата калия, 10 мМ цитрата натрия, 125 мМ хлорида натрия, pH 7,8 (состав на основе фосфата/цитрата/NaCl).

**[0752]** Образование HMWS и LMWS оценивали посредством SEC, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST". F3'-1602 инкубировали при 40°C в течение 4 недель. В начале исследования F3'-1602 анализировали посредством SEC и оно характеризовался 97,9%-ным содержанием мономера. Через четыре недели при 40ºC содержание мономера снизилось до 91,4%. Содержание LMWS увеличилось от 1,8 до 5,0% после четырех недель при 40°C. HMWS присутствовали в контроле в количестве 0,3% и их содержание возросло до 3,6% через четыре недели при 40ºC (**таблица 69**). Эти данные свидетельствуют о том, что в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl F3'-1602 разлагалось посредством как агрегации (HMWS), так и фрагментации (LMWS).

**Таблица 69. Сводные данные SEC-анализа: %-ое содержание мономера, HMW и LMW (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl)**

| Тестируемый образец | Мономер (%) | HMW (%) | LMW (%) |
|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 97,9 | 0,3 | 1,8 |
| F3'-1602, 4 недели, 40°C | 91,4 | 3,6 | 5,0 |

**[0753]** Фрагментацию и агрегацию интактного F3'-1602 оценивали в испытании стабильности методом ускоренного старения посредством капиллярного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-CE) в невосстанавливающих условиях. Если вкратце, F3'-1602 разводили до 0,5 мг/мл 1X буфером для нанесения образцов с получением конечного объема образца 50 мкл. К образцам добавляли внутренний стандарт и йодацетамид, которые затем инкубировали при 70ºC в течение 10 минут в термостате, а затем в ледяной бане в течение 5 минут. Образцы переносили в 96-луночный планшет, центрифугировали и загружали в прибор. Каждый образец загружали в капилляр в течение 40 секунд при 4600 вольт и разделяли в течение 35 минут при 5750 вольт на приборе Maurice (ProteinSimple, Сан-Хосе, Калифорния).

**[0754]** Чистота главного пика F3'-1602 снижалась с 97,0% до 91,2% к концу 4-недельной инкубации. Наблюдали соответствующее увеличение содержания LMWS от 3,0% до 8,4% (**таблица 70**). Наблюдали незначительное увеличение содержания HMWS (не выявлялось до 0,4%) в ходе всего исследования, что определяли посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях. Разница во времени миграции главного пика в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 70. Сводные данные определения чистоты посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl)**

| Тестируемый образец | LMW (%) | Главный пик (%) | HMW (%) |
|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 3,0 | 97,0 | ND |
| F3'-1602, 4 недели, 40°C | 8,4 | 91,2 | 0,4 |

ND: не выявлено

**[0755]** Посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях в каждый момент времени испытания стабильности методом ускоренного старения оценивали фрагментацию трех отдельных полипептидных цепей F3'-1602. В данном анализе чистоту определяли по сумме данных для трех цепей. В ходе исследования чистота снижалась с

97,4% до 95,2% (**таблица 71**). Такое снижение чистоты было результатом увеличения содержания LMWS, что согласуется с результатами SEC и SDS-CE в невосстанавливающих условиях. Разница в значениях времени миграции главных пиков в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 71. Сводные данные определения чистоты посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl)**

| **Тестируемый образец** | **Легкая цепь (%)** | **Тяжелая цепь (%)** | **Цепь scFv-Fc (%)** | **Чистота (%)** |
|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 17,9 | 39,2 | 40,3 | 97,4 |
| F3'-1602, 4 недели, 40°C | 20,3 | 39,4 | 35,5 | 95,2 |

**[0756]** Значения аффинности связывания F3'-1602 с рекомбинантным CLEC12A человека измеряли посредством SPR так, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST". После четырех недель инкубации в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl связывание CLEC12A человека снижалось до некоторой степени (**фиг. 76**). Разница в константах скорости ассоциации и диссоциации между контролем и образцом, подвергнутым стрессовому условию 40°C, находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа (**таблица 72**), тогда как ответ при максимальном связывании (Rmax), скорректированный с учетом отличий в захвате, уменьшился на примерно 10% после инкубации при 40°C. Такая потеря была значительно меньшей по сравнению с более чем 80%, которую наблюдали после 4 недель инкубации в составе HST, что указывает на то, что состав на основе фосфата/цитрата/NaCl способен стабилизировать F3'-1602 в условиях испытания стабильности методом ускоренного (40°C) старения. Следовательно, изомеризация H99, описанная в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST", была значительно снижена за счет разработки состава.

**Таблица 72. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hCLEC12A (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hCLEC12A | $7{,}79x10^{5}$ | $9{,}33x10^{-4}$ | 1,20 | 160,6 |
| F3'-1602 в составе на основе фосфата/ цитрата/NaCl, 40°C, 4 недели | hCLEC12A | $8{,}29x10^{5}$ | $9{,}48x10^{-4}$ | 1,14 | 146,7 |

Результаты представляют среднее значение для n = 2 повторов

**[0757]** Значения аффинности связывания F3'-1602 с рекомбинантным NKG2D человека измеряли посредством SPR так, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST". После четырех недель инкубации при 20 мг/мл, 40°C, в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl связывание F3'-1602 с NKG2D человека не изменилось (**фиг. 77 и таблица 73**). Разница в равновесной аффинности связывания, а также в Rmax между контролем и образцом, подвергнутым стрессовому условию 40°C, находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняло аффинность к NKG2D человека при данных условиях испытания стабильности методом ускоренного старения.

**Таблица 73. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hNKG2D (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики 1:1** | **Стационарное состояние, $K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hNKG2D | $1{,}93x10^{5}$ | $1{,}53x10^{-1}$ | 790 | 791 | 34,5 |

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики 1:1** | **Стационарное состояние, $K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602 в составе на основе фосфата/ цитрата/NaCl, 40°C, 4 недели | hNKG2D | $1,53x10^5$ | $1,33x10^{-1}$ | 869 | 872[a] | 31,4 |

Результаты представляют среднее значение для n = 2 повторов

**[0758]** Значения аффинности связывания F3'-1602 с биотинилированным рекомбинантным рецептором CD16a V158 (FcγRIIIa V158) измеряли посредством SPR так, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST". После четырех недель инкубации при 20 мг/мл, 40°C, в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl связывание F3'-1602 с CD16a V158 человека не изменилось (**фиг. 78 и таблица 74**). Разница в аффинности связывания, а также разница в кажущемся ответе при максимальном связывании между контролем и образцом, подвергнутым стрессовому условию 40°C, находились в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняет аффинность к CD16a человека при данных условиях испытания стабильности методом ускоренного старения.

**Таблица 74. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hCD16a V158 (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | **$K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль[a] | hCD16aV | $(1,13\pm0,04)x10^5$ | $(2,40\pm0,09)x10^{-2}$ | 212±1 | 13,7 |

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | **KD (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602 в составе на основе фосфата/цитрата/ NaCl, 40°C, 4 недели | hCD16aV | $9,67x10^4$ | $2,09x10^{-2}$ | 216 | 14,0 |

**[0759]** Влияние условий испытания стабильности методом ускоренного старения на функциональность F3'-1602 также оценивали в анализе цитотоксичности с использованием клеток KHYG-1-CD16a, экспрессирующих NKG2D и CD16a, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST". Способность F3'-1602 к уничтожению раковых клеток PL-21 CLEC12A+ не изменилась после 4 недель инкубации при 40°C в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl при концентрации 20 мг/мл (**фиг. 79 и таблица 75**). Данный результат резко отличался от того, который получили после инкубации в составе HST, и указывает на то, что F3'-1602 стабилизировался в 20 мМ фосфата, 10 мМ цитрата, 125 мМ NaCl, pH 7,8.

**Таблица 75. EC50 и максимальный лизис клеток PL-21 CLEC12A+ посредством F3'-1602 (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl)**

| **Тестируемый образец** | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис (%)** |
|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 0,26 | 90 |
| F3'-1602 в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl, 40°C, 4 недели | 0,29 | 93 |

Стабильность F3'-1602 в составе CST

**[0760]** На основании данных о стабильности в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl сделали заключение о том, что потеря активности при 40°C может быть сведена к минимуму в жидком составе. Далее стабильность F3'-1602 анализировали в подходящем для лиофилизации жидком составе, содержащем сахарозу в качестве лиопротектора.

**[0761]** Испытание стабильности методом ускоренного старения при концентрации 20 мг/мл выполняли в 20 мМ цитрата, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0 (состав

CST), при охлаждении (2-8°C) и при условиях ускоренного (25 и 40°C) старения в течение четырех недель. Полный набор анализов выполняли с образцами, подвергнутыми стрессовому условию 40°C, при этом для плеч отслеживали только связывание с CLEC12A (SPR) и активность при 2-8°C и 25°C.

**[0762]** Образование HMWS и LMWS оценивали посредством SEC, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST". В начале исследования антитело F3'-1602 анализировали посредством SEC и оно характеризовалось 99,6%-ным содержанием мономера. Через четыре недели при 40ºC содержание мономера снизилось до 98,6%. LMWS не выявили в контроле и их содержание возросло до 0,5% через четыре недели при 40ºC. HMWS присутствовали в контроле в количестве 0,4% и их содержание возросло до 1,0% через четыре недели при 40ºC (**таблица 76**). Эти данные свидетельствуют о том, что F3'-1602 было устойчивым как к агрегации, так и к фрагментации в условиях испытания стабильности методом ускоренного старения в составе CST.

**Таблица 76. Сводные данные SEC-анализа: %-ое содержание мономера, HMW и LMW (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе CST)**

| **Тестируемый образец** | **Мономер (%)** | **HMW (%)** | **LMW (%)** |
|---|---|---|---|
| Контроль | 99,6 | 0,4 | ND |
| 1 неделя | 99,3 | 0,5 | 0,2 |
| 2 недели | 99,0 | 0,7 | 0,3 |
| 3 недели | 98,7 | 0,9 | 0,4 |
| 4 недели | 98,6 | 1,0 | 0,5 |

ND: не выявлено

**[0763]** Посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях в каждый момент времени испытания стабильности методом ускоренного старения оценивали фрагментацию интактного F3'-1602, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl". Чистота главного пика F3'-1602 снижалась с 96,1% до 91,0% к концу 4-недельной инкубации. Наблюдали соответствующее увеличение содержания LMWS от 3,9% до 9,0% (**таблица 77**). Наблюдали отсутствие увеличения содержания HMWS в ходе всего исследования, что определяли посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях. Разница во времени миграции главного пика в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 77. Сводные данные определения чистоты посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе CST)**

| **Тестируемый образец** | **LMW (%)** | **Главный пик (%)** | **HMW (%)** |
|---|---|---|---|
| Контроль | 3,9 | 96,1 | ND |
| 1 неделя | 4,8 | 95,2 | ND |
| 2 недели | 6,6 | 93,4 | ND |
| 3 недели | 5,3 | 94,7 | ND |
| 4 недели | 9,0 | 91,0 | ND |

ND: не выявлено

**[0764]** Посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях в каждый момент времени испытания стабильности методом ускоренного старения оценивали фрагментацию трех отдельных полипептидных цепей F3'-1602, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе на основе фосфата/цитрата/NaCl". В данном анализе чистоту определяли по сумме данных для трех цепей. В ходе исследования чистота снижалась с 98,3% до 97,7% (**таблица 78**). Разница в значениях времени миграции главных пиков в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 78. Сводные данные определения чистоты посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе CST)**

| **Тестируемый образец** | **Чистота (%)** |
|---|---|
| Контроль | 98,3 |
| | |
| 1 неделя | 98,0 |
| 2 недели | 98,0 |
| 3 недели | 97,8 |
| 4 недели | 97,7 |

Чистота представляла собой сумму площадей пиков в % цепей L, H и S.

**[0765]** Значения аффинности связывания F3'-1602 с рекомбинантным CLEC12A человека измеряли посредством SPR так, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST". После четырех недель инкубации при 20 мг/мл, 40°C, в составе CST связывание с CLEC12A человека снизилось (**фиг. 80 и таблица 79**). Разница в константах

скорости ассоциации и диссоциации между контролем и образцом, подвергнутым стрессу 40ºC, находится в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа, однако кажущееся связывание снижается на приблизительно 15-17% после воздействия стрессом 40°C. Это указывает на то, что 15-17% F3'-1602 теряли способность к связыванию CLEC12A через 4 недели при воздействии данными тепловыми стрессовыми условиями. Хотя результаты анализа связывания, получаемые посредством классического SPR, являются надежными показателями потенциальной потери активности, если речь идет о резких отличиях в связывании (20% или больше), они не является достаточно надежными, чтобы учесть влияние незначительных изменений в активности образца (особенно при низком количестве репликатов); при необходимости для объяснения изменений с большей научной достоверностью используют другие аналитические методики.

**Таблица 79. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hCLEC12A (40°C, испытание стабильности методом ускоренного старения в составе CST)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | ***ka* ($M^{-1}c^{-1}$)** | ***kd* ($c^{-1}$)** | **KD (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hCLEC12A | $7,50x10^{5}$ | $7,35x10^{-4}$ | 0,98 | 221,3 |
| F3'-1602 в составе CST, 40°C, 4 недели | hCLEC12A | $7,84x10^{5}$ | $6,74x10^{-4}$ | 0,86 | 211,5 |

Результаты представляют среднее значение для n = 2 повторов

**[0766]** При более низких температурах (охлаждение и 25°C) через 4 недели в составе CST не наблюдали разницы в аффинности в отношении hCLEC12A или кажущемся связывании, скорректированном с учетом отличий в уровнях захвата (**фиг. 81, таблица 80 и таблица 81**).

**Таблица 80. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hCLEC12A (2-8ºC, стабильность в составе CST)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | ***ka* ($M^{-1}c^{-1}$)** | ***kd* ($c^{-1}$)** | **KD (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hCLEC12A | $7,50x10^{5}$ | $7,35x10^{-4}$ | 0,98 | 221,3 |
| F3'-1602 в составе CST, 2-8ºC, 2 недели | hCLEC12A | $6,72x10^{5}$ | $6,00x10^{-4}$ | 0,89 | 352,4 |

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602 в составе CST, 2-8ºC, 4 недели | hCLEC12A | $7{,}76x10^{5}$ | $7{,}08x10^{-4}$ | 0,91 | 222,8 |

Результаты представляют среднее значение для n = 2 повторов

**Таблица 81. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hCLEC12A (25ºC, стабильность в составе CST)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hCLEC12A | $7{,}50x10^{5}$ | $7{,}35x10^{-4}$ | 0,98 | 221,3 |
| F3'-1602 в составе CST, 25ºC, 2 недели | hCLEC12A | $8{,}24x10^{5}$ | $7{,}65x10^{-4}$ | 0,93 | 187,6 |
| F3'-1602 в составе CST, 25ºC, 4 недели | hCLEC12A | $7{,}88x10^{5}$ | $7{,}19x10^{-4}$ | 0,91 | 179,9 |

Результаты представляют среднее значение для n = 2 повторов

**[0767]** Значения аффинности связывания F3'-1602 с рекомбинантным NKG2D человека измеряли посредством SPR так, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST". После четырех недель инкубации при 20 мг/мл, 40°C, в составе CST связывание F3'-1602 с NKG2D человека не изменилось (**фиг. 82 и таблица 82**). Разница в равновесной аффинности связывания, а также в кажущемся Rmax между контролем и образцом, подвергнутым стрессовому условию 40ºC, находились в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняло аффинность к NKG2D человека при данных условиях испытания стабильности методом ускоренного старения.

**Таблица 82. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hNKG2D (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе CST)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики 1:1** | **Стационарное состояние, $K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hNKG2D | (2,11±0,06) x$10^5$ | (1,39±0,03) x$10^{-1}$ | 661±9 | 664±10 | 34,5 |
| F3'-1602 в составе CST, 40°C, 4 недели | hNKG2D | (1,98±0,11) x$10^5$ | (1,40±0,08) x$10^{-1}$ | 708±45 | 711±45 | 33,2 |

Результаты представляют среднее значение для n = 3 измерений

**[0768]** Значения аффинности связывания F3'-1602 с биотинилированным рекомбинантным рецептором CD16a V158 (FcγRIIIa V158) измеряли посредством SPR так, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST". После четырех недель инкубации при 20 мг/мл, 40°C, в составе CST связывание F3'-1602 с CD16a V158 человека не изменилось (**фиг. 83 и таблица 83**). Разница в аффинности связывания и в кажущемся $R_{max}$ между контролем и образцом, подвергнутым стрессовому условию 40°C, находились в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняет аффинность к CD16a человека при данных условиях испытания стабильности методом ускоренного старения.

**Таблица 83. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hCD16a V158 (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе CST)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | ***$k_a$* ($M^{-1}c^{-1}$)** | ***$k_d$* ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hCD16aV | (1,13±0,04)x$10^5$ | (2,40±0,09)x$10^{-2}$ | 212±1 | 13,7 |
| F3'-1602, CST, pH 7,0, 40°C, 4 недели | hCD16aV | (1,05±0,04)x$10^5$ | (2,25±0,09)x$10^{-2}$ | 213±3 | 13,6 |

Результаты представляют среднее значение для n = 3 повторов

**[0769]** Влияние условий испытания стабильности методом ускоренного старения на функциональность F3'-1602 также оценивали в анализе цитотоксичности с использованием клеток KHYG-1-CD16a, экспрессирующих NKG2D и CD16a, как это описано в подразделе "Стабильность F3'-1602 в составе HST". Способность F3'-1602 к уничтожению раковых клеток PL-21 CLEC12A+ не изменилась после 4 недель инкубации при 40°C в составе CST при концентрации 20 мг/мл (**фиг. 84 и таблица 84**).

**Таблица 84. EC50 и максимальный лизис клеток PL-21 CLEC12A+ посредством F3'-1602 (испытание стабильности методом ускоренного старения в составе CST, pH 7,0)**

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Макс. лизис (%) |
|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 0,51 | 78,6 |
| F3'-1602 в составе CST, 40°C, 1 неделя | 0,47 | 77,7 |
| F3'-1602 в составе CST, 40°C, 2 недели | 0,52 | 74,7 |
| F3'-1602 в составе CST, 40°C, 3 недели | 0,47 | 74,9 |
| F3'-1602 в составе CST, 40°C, 4 недели | 0,53 | 74,9 |

**Пример 15. Технологичность F3'-1602 составе CST**

**[0770]** Различные условия, возникающие в ходе изготовления F3'-1602, могут оказывать влияние на его стабильность. Данный пример был предназначен для оценки стабильности F3'-1602 в составе CST при замораживании/оттаивании, перемешивании, низком и высоком уровнях pH, принудительном окислении и выдерживании при низком уровне pH. Способы измерения целостности и функциональности белка, представленные в примере 14, не повторяют в данном примере.

Замораживание/оттаивание

**[0771]** Стабильность при воздействии циклов замораживания/оттаивания важна для биотерапевтических препаратов, поскольку промежуточные продукты и нерасфасованное лекарственное вещество могут замораживать для обеспечения стабильности между стадиями обработки. Для создания стрессового условия замораживания/оттаивания 8,0 мг F3'-1602 подвергали замене на буфер из 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0, с использованием устройств Amicon Ultra 15 мл 30K и доводили до 400 мкл с помощью того же буфера (~20 мг/мл F3'-1602, концентрацию подтверждали на спектрофотометре Nanodrop One по поглощению при длине волны 280). Концентрированный образец разделяли на аликвоты 4 x 100 мкл. Контроль немедленно помещали на хранение при -80°C. Оставшиеся три аликвоты подвергали циклам замораживания/оттаивания при -80°C в контейнере из пенополистирола для замедления процесса замораживания. В циклах 2, 4 и 6 отбирали аликвоту и помещали на хранение при -80°C до проведения анализа.

**[0772]** Стабильность F3'-1602 при замораживании/оттаивании оценивали путем измерения концентрации белка по поглощению при длине волны 280 по завершению исследования. Концентрация F3'-1602 составляла 20,4 мг/мл в контроле и 20,2 мг/мл после 6 циклов замораживания/оттаивания, что указывает на отсутствие снижения содержания белка вследствие воздействия стрессового условия замораживания/оттаивания.

**[0773]** Чтобы оценить, является ли F3'-1602 стабильным в циклах замораживания/оттаивания, тестируемый образец замораживали и оттаивали шесть раз и анализировали посредством SEC после циклов 2, 4 и 6. F3'-1602 в момент времени 0 характеризовался 99,5%-ным содержанием мономера, и при этом % содержания мономера оставался неизменным на протяжении всех шести циклов замораживания/оттаивания (**таблица 85**). Данный результат указывает на то, что F3'-1602 был устойчивым как к агрегации, так и к фрагментации в ходе воздействия замораживания/оттаивания.

**Таблица 85. Сводные данные SEC-анализа: %-ое содержание мономера, HMW и LMW (стабильность при замораживании/оттаивании)**

| **Тестируемый образец** | **Мономер (%)** | **HMW (%)** | **LMW (%)** |
|---|---|---|---|
| Контроль | 99,5 | 0,5 | ND |
| 2 цикла З/О | 99,8 | 0,2 | ND |
| 4 цикла З/О | 99,8 | 0,2 | ND |
| 6 циклов З/О | 99,8 | 0,2 | ND |

ND: не выявлено

**[0774]** Посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях оценивали фрагментацию интактного F3'-1602 в испытании стабильности при замораживании/оттаивании. Чистота главного пика F3'-1602 снижалась минимально (с 96,1% до 95,5%) после 6 циклов замораживания/оттаивания. Наблюдали соответствующее увеличение содержания LMWS от 3,9% до 4,5% (**таблица 86**). HMWS не выявляли на протяжении всего исследования. Данные результаты указывают на то, что F3'-1602 было устойчивым к фрагментации в 20 мМ цитрата, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0. Разница во времени миграции главного пика в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 86. Сводные данные по чистоте, определенной посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях (стабильность при замораживании/оттаивании)**

| **Тестируемый образец** | **LMW (%)** | **Главный пик (%)** | **HMW (%)** |
|---|---|---|---|
| Контроль | 3,9 | 96,1 | ND |
| 2 цикла З/О | 4,3 | 95,7 | ND |
| 4 цикла З/О | 4,4 | 95,6 | ND |
| 6 циклов З/О | 4,5 | 95,5 | ND |

ND: не выявлено

**[0775]** Посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях оценивали фрагментацию 3 отдельных полипептидных цепей F3'-1602 в испытании стабильности при замораживании/оттаивании. В данном анализе чистоту определяли по сумме данных для трех цепей. Чистота F3'-1602 не изменилась после 6 циклов замораживания/оттаивания (**таблица 87**). Данные результаты указывают на то, что F3'-1602 было устойчивым к фрагментации в 20 мМ цитрата, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0. Разница в значениях времени миграции главных пиков в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 87. Сводные данные по чистоте, определенной посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях (стабильность при замораживании/оттаивании)**

| **Тестируемый образец** | **Чистота (%)** |
|---|---|
| Контроль | 98,3 |
| 2 цикла З/О | 98,0 |
| 4 цикла З/О | 98,0 |
| 6 циклов З/О | 98,0 |

Чистота представляла собой сумму площадей пиков в процентах цепей L, H и S.

Перемешивание

**[0776]** Стабильность во время перемешивания важна для биотерапевтических препаратов, поскольку промежуточные продукты и нерасфасованное лекарственное вещество могут подвергаться воздействию сдвигового напряжения в ходе стадий обработки. Для создания стрессового условия, представляющего собой перемешивание, 8,0 мг F3'-1602 подвергали замене на буфер из 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0, с использованием устройств Amicon Ultra 15 мл 30K и доводили до 400 мкл с помощью того же буфера (~20 мг/мл F3'-1602, концентрацию подтверждали на спектрофотометре Nanodrop One по поглощению при длине волны 280). Концентрированный образец переносили в стеклянную колбу с магнитной мешалкой, помещали на плиту магнитной мешалки и перемешивали при 60 об/мин при 4°C в течение 18 часов. После перемешивания образец хранили при -80°C до анализа.

**[0777]** Оценивали стабильность F3'-1602 при перемешивании. После перемешивания наблюдали видимое осаждение белка. Образец осаждали центрифугированием и супернатант использовали во всех анализах для определения характеристик. Концентрацию белка в супернатанте оценивали по поглощению при длине волны 280. Концентрация F3'-1602 составила 20,4 мг/мл в контроле и 16,8 мг/мл после воздействия стрессового условия, представляющего собой перемешивание.

**[0778]** Чтобы определить, является ли F3'-1602 стабильным при воздействии стрессового условия, представляющего собой перемешивание, тестируемый образец анализировали посредством SEC до и после перемешивания. Антитело F3'-1602, контроль, характеризовалось 99,5%-ым содержанием мономера, при этом %-ое содержание мономера оставалось неизменным после перемешивания (**таблица 88**). Это указывает на то, что F3'-1602 был устойчивым как к агрегации, так и к фрагментации в ходе перемешивания.

**Таблица 88. Сводные данные SEC-анализа: %-ое содержание мономера, HMW и LMW (стабильность при перемешивании)**

| **Тестируемый образец** | **HMW (%)** | **Мономер (%)** | **LMW (%)** |
|---|---|---|---|
| Контроль | 0,5 | 99,5 | ND |
| После перемешивания | 0,7 | 99,3 | ND |

ND: не выявлено

**[0779]** Посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях оценивали фрагментацию интактного F3'-1602 после перемешивания. Чистота главного пика F3'-1602 снижалась минимально (с 96,1% до 95,5%) после перемешивания. Наблюдали соответствующее увеличение содержания LMWS от 3,9% до 4,5% (**таблица 89**). HMWS не выявляли на протяжении всего исследования. Данные результаты указывают на то, что F3'-1602 было устойчивым к фрагментации в 20 мМ цитрата, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0. Разница во времени миграции главного пика в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 89. Сводные данные SEC-анализа: %-ое содержание мономера, HMW и LMW (стабильность при перемешивании)**

| **Тестируемый образец** | **LMW (%)** | **Главный пик (%)** | **HMW (%)** |
|---|---|---|---|
| Контроль | 3,9 | 96,1 | ND |
| После перемешивания | 3,8 | 96,2 | ND |

ND: не выявлено

**[0780]** Посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях оценивали фрагментацию трех отдельных полипептидных цепей F3'-1602 в испытании с перемешиванием. В данном анализе чистоту определяли по сумме данных для трех цепей. Чистота F3'-1602 не изменилась после воздействия стрессового условия, представляющего собой

перемешивание (**таблица 90**). Данные результаты указывают на то, что F3'-1602 было устойчивым к фрагментации в 20 мМ цитрата, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0. Разница в значениях времени миграции главных пиков в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 90. Сводные данные по чистоте, определенной посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях (стабильность при перемешивании)**

| **Тестируемый образец** | **Чистота (%)** |
|---|---|
| Контроль | 98,3 |
| После перемешивания | 98,2 |

Чистота представляла собой сумму площадей пиков в процентах цепей L, H и S.

Низкий и высокий уровни pH

**[0781]** Для создания стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH, 1,0 мг F3'-1602 подвергали замене на буфер из 20 мМ ацетата натрия, pH 5,0, с использованием устройств Amicon Ultra 0,5 мл 10K и доводили до 1,0 мл с помощью того же буфера (~1 мг/мл F3'-1602, концентрацию подтверждали на спектрофотометре Nanodrop One по поглощению при длине волны 280). Образец разделяли. Половину хранили при -80°C в качестве контроля, а другую половину инкубировали при 40°C в течение 2 недель. После инкубации образец хранили при -80°C до анализа.

**[0782]** Для создания стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH, 1,0 мг F3'-1602 подвергали замене на буфер из 20 мМ Tris, pH 8,3, с использованием устройств Amicon Ultra 0,5 мл 10K и доводили до 1,0 мл с помощью того же буфера (~1 мг/мл F3'-1602, концентрацию подтверждали на Nanodrop One по поглощению при длине волны 280). Образец разделяли. Половину хранили при -80°C в качестве контроля, а другую половину инкубировали при 40°C в течение 2 недель. После инкубации образец хранили при -80°C до анализа. Значение pKa для Tris будет меняться в результате воздействия температуры. При 40°C значение pH 8,3 буфера изменялось на ~pH 8,0.

**[0783]** Для оценки химической стабильности F3'-1602 тестируемый образец выдерживали при pH 5,0 и pH 8,0 в течение двух недель при 40°C. При низком уровне pH типичными химическими модификациями являются изомеризация и фрагментация аспарагиновой кислоты, тогда как при высоком уровне pH основными путями разложения являются дезамидирование и окисление. Для подтверждения целостности F3'-1602 после инкубации контрольные и подвергнутые стрессовому условию образцы анализировали посредством SEC (**таблица 91**). Результаты указывают на то, что F3'-1602 оставалось в значительной степени интактным с низкими уровнями фрагментации, чего и следовало ожидать при данных жестких условиях.

**Таблица 91. Сводные данные SEC-анализа: %-ое содержание мономера, HMW и LMW (стрессовое условие, представляющее собой pH 5 и 8)**

| Тестируемый образец | Мономер (%) | HMW (%) | LMW (%) |
|---|---|---|---|
| F3'-1602, pH 5, контроль | 99,8 | 0,2 | ND |
| F3'-1602, подвергнутое стрессовому условию pH 5 | 99,4 | 0,2 | 0,3 |
| F3'-1602, pH 8, контроль | 99,0 | 1,0 | ND |
| F3'-1602, подвергнутое стрессовому условию pH 8 | 95,2 | 0,9 | 3,9 |

ND: не выявлено

**[0784]** Химическую модификацию боковых цепей аминокислот обычно можно определить экспериментально в общем масштабе посредством капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF). Для оценки модификации образцов F3'-1602, выдержанных при низком и высоком уровнях pH, F3'-1602 разводили до 1 мг/мл водой качества Milli-Q, 15 мкл образца добавляли к 60 мкл мастер-микса (вода, метилцеллюлоза, фармалит 3-10, аргинин, маркеры pI 4,05 и 9,99), встряхивали на вихревой мешалке и центрифугировали в течение непродолжительного времени. Аспирировали 60 мкл образца из верхнего слоя раствора, добавляли в 96-луночный планшет и центрифугировали перед тестированием. В ходе эксперимента образец разделяли в течение одной минуты при 1500 вольт, а затем в течение 8 минут при 3000 вольт на приборе Maurice (ProteinSimple, Сан-Хосе, Калифорния).

**[0785]** cIEF-профиль для F3'-1602 после выдерживания при pH 5,0 в течение двух недель продемонстрировал увеличение содержания основных фракций с 8,9 до 39,1% (**фиг. 85 и таблица 92**). Сходное увеличение содержания кислых фракций обнаружили посредством cIEF после того, как F3'-1602 выдерживали при pH 8,0. Также наблюдали соответствующее снижение интенсивности главного пика (с 51,4 до 29,0%) (**фиг. 86 и таблица 92**). Без ограничения какой-либо теорией, возможно, что дезамидирование всей последовательности F3'-1602 приводит к данному кислотному сдвигу.

**Таблица 92. Сводные данные по %-ому содержанию кислых фракций, фракций главного продукта и основных фракций F3'-1602 (стрессовое условие, представляющее собой pH 5 и 8)**

| Тестируемый образец | Кислые (%) | Главный пик (%) | Основные (%) |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| pH 5,0, контроль | 39,8 | 51,4 | 8,9 |
| pH 5,0, 2 недели, 40°C | 32,0 | 29,0 | 39,1 |
| pH 8,0, контроль | 39,6 | 52,2 | 8,4 |
| pH 8,0, 2 недели, 40°C | 66,7 | 24,6 | 8,8 |

**[0786]** Чтобы определить, являлись ли выявленные посредством cIEF изменения, вызванные стрессовым условием pH, следствием модификации в определяющих комплементарность областях (CDR), те же образцы, подвергнутые стрессовому условию, представляющему собой pH 5 и pH 8, анализировали с помощью пептидного картирования посредством LC-MS/MS. Если вкратце, 50 мкг F3'-1602 разводили посредством 6 M гидрохлорида гуанидина в 250 мМ Tris, pH 8,5, и восстановление дисульфидных связей осуществляли посредством 25 мМ дитиотреитола в течение 30 минут при 40°C в термомешалке. Восстановленные цистеины затем алкилировали посредством 50 мМ йодацетамида в течение 60 минут при комнатной температуре в темноте. Восстановленный и алкилированный белок подвергали замене буфера на буфер из 50 мМ Tris, pH 8,0, и его расщепляли трипсином (фермент:субстрат 1:25) в течение 1 часа при 37°C. LC-MS/MS осуществляли на устройстве Thermo Vanquish для UHPLC, соединенном с масс-спектрометром QExactive+. Если вкратце, 5 мкг гидролизата белка разделяли на колонке Waters UPLC BEH Peptide C18 (2,1 x 150 мм) в течение 150 минут с использованием градиента ацетонитрила от 2% до 40% со скоростью 0,3 мл/мин. Масс-спектры регистрировали в диапазоне 230-2000 масса/заряд в режиме детекции положительно заряженных ионов с разрешением 35000 для полного MS-сканирования и с разрешением 17500 для сканирований Top10 MS/MS. Файлы, полученные в UPLC-MS/MS, анализировали с использованием программного обеспечения Byos PTM (Protein Metrics). Пептиды идентифицировали с использованием точного поиска последовательности F3'-1602 по массам и в библиотеках масс-спектральных данных MS/MS.

**[0787]** На основе данных пептидной карты все CDR кроме одной в F3'-1602 были устойчивы к модификации при воздействии низким и высоким уровнями pH. Только CDRH3 из CLEC12A-связывающей цепи scFv-Fc продемонстрировала признаки модификации (изомеризации) после воздействия стрессового условия pH 5 (**таблица 93**). Эта модификация аналогична той, которая была идентифицирована при испытании стабильности методом ускоренного (40°C) старения.

**Таблица 93. Посттрансляционные модификации в CDR F3'-1602 (pH 5,0 и pH 8,0)**

| | | | | **Относительное содержание (%)** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **pH 5** | | **pH 8** | |
| **Мишень** | **CDR** | **Последовательность (Chothia)** | **Потенциальные участки неблагоприятных модификаций** | **Контроль** | **Подвергнутый стрессовому условию** | **Контроль** | **Подвергнутый стрессовому условию** |
| CLEC12A | H1 | GFSLTNY (SEQ ID NO:137) | Отсутствует | NA | NA | NA | NA |
| | H2 | WSGGK (SEQ ID NO:138) | Отсутствует | NA | NA | NA | NA |
| | H3 | YDYDDSLDY (SEQ ID NO:139) | Изомеризация | ND | Зарегистрировано | ND | ND |
| | L1 | HASQNINFWLS (SEQ ID NO:140) | Отсутствует | NA | NA | NA | NA |
| | L2 | EASNLHT (SEQ ID NO:141) | Отсутствует | NA | NA | NA | NA |
| | L3 | QQSHSYPLT (SEQ ID NO:142) | Отсутствует | NA | NA | NA | NA |
| NKG2D | H1 | GFTFSSY (SEQ ID NO:297) | Отсутствует | NA | NA | NA | NA |
| | H2 | SSSSSY (SEQ ID NO:298) | Отсутствует | NA | NA | NA | NA |
| | H3 | GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:97) | Усечение | ND | ND | ND | ND |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | L1 | RASQGISSWLA (SEQ ID NO:86) | Отсутствует | NA | NA | NA | NA |
| | L2 | AASSLQS (SEQ ID NO:77) | Отсутствует | NA | NA | NA | NA |
| | L3 | QQGVSFPRT (SEQ ID NO:87) | Отсутствует | NA | NA | NA | NA |

ND: не выявлено; NA: не применимо

**[0788]** Значения аффинности связывания F3'-1602 с рекомбинантным CLEC12A человека измеряли посредством SPR так, как это описано в примере 14. После двух недель инкубации при 40°C в 20 мМ ацетата натрия, pH 5,0, связывание F3'-1602 с CLEC12A человека снизилось (**фиг. 87 и таблица 94**). Разница в константах скорости ассоциации и диссоциации между контролем и образцом, подвергнутым стрессовому условию, представляющему собой низкий уровень pH и 40°C, находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа, однако кажущийся ответ при максимальном связывании для образца, подвергнутого стрессовому условию, составляло приблизительно половину от контроля после воздействия стрессового условия, представляющего собой pH 5. Это указывает на то, что F3'-1602 характеризовалось пониженной способностью к связыванию CLEC12A в данных условиях. После двух недель инкубации при 40°C в 20 мМ Tris, pH 8,0, связывание F3'-1602 с CLEC12A человека не изменилось (**фиг. 88 и таблица 94**). Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняло аффинность к CLEC12A при данных стрессовых условиях pH испытания стабильности методом ускоренного старения.

**Таблица 94. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hCLEC12A (стрессовые условия, представляющие собой pH 5,0 и pH 8,0)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hCLEC12A | $7{,}99x10^5$ | $8{,}53x10^{-4}$ | 1,07 | 76,2 |
| F3'-1602, pH 5,0, 40°C, 2 недели | hCLEC12A | $8{,}65x10^5$ | $8{,}71x10^{-4}$ | 1,01 | 87,4 |
| F3'-1602, контроль | hCLEC12A | 8,01x105 | 8,40x10-4 | 1,1 | 86,9 |
| F3'-1602, pH 8,0, | hCLEC12A | 8,35x105 | 8,45x10-4 | 1,0 | 82,8 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 40°C, 2 недели | | | | | |

Результаты представляют среднее значение для n = 2 повторов

**[0789]** Значения аффинности связывания образцов F3'-1602 с рекомбинантным NKG2D человека измеряли посредством SPR так, как это описано в примере 14. После двух недель инкубации при 40ºC в 20 мМ ацетата натрия, pH 5,0, связывание F3'-1602 с NKG2D человека не изменилось (**фиг. 89 и таблица 95**). Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняло аффинность к NKG2D при данных стрессовых условиях pH испытания стабильности методом ускоренного старения. После двух недель инкубации при 40ºC в 20 мМ Tris, pH 8,0, связывание F3'-1602 с NKG2D человека не изменилось (**фиг. 90 и таблица 95**). Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняло аффинность к NKG2D при данных стрессовых условиях pH испытания стабильности методом ускоренного старения.

**Таблица 95. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hNKG2D (стрессовые условия, представляющие собой pH 5,0 и pH 8,0)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики 1:1** | **Стационарное состояние, $K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hNKG2D | 1,89x10$^{5}$ | 1,28x10$^{-1}$ | 678 | 684 | 51,9 |
| F3'-1602, pH 5,0, 40°C, 2 недели | hNKG2D | 1,88x10$^{5}$ | 1,27x10$^{-1}$ | 675 | 677 | 46,2 |
| F3'-1602, контроль | hNKG2D | 1,80x10$^{5}$ | 1,25x10$^{-1}$ | 694 | 695 | 47,2 |
| F3'-1602, pH 8,0, 40°C, 2 недели | hNKG2D | 1,35x10$^{5}$ | 1,22x10$^{-1}$ | 905 | 919 | 51,0 |

**[0790]** Влияние стрессовых условий, представляющих собой низкий и высокий уровни pH, на функциональность F3'-1602 оценивали в анализе цитотоксичности с использованием клеток KHYG-1-CD16a, экспрессирующих NKG2D и CD16a, как это описано в примере 14. После воздействия стрессовыми условиями, представляющими

собой pH 5,0 и 8,0, активность F3'-1602 в отношении раковых клеток PL-21 CLEC12A+, выражаемая в EC50, и максимальный лизис снижались в ~2 раза после воздействия стрессового условия pH 5 (**фиг. 91 и таблица 96**) и не изменились после воздействия стрессового условия pH 8 (**фиг. 92 и таблица 96**). Без ограничения какой-либо теорией, возможно, что потеря активности после воздействия стрессового условия pH 5 была обусловлена такой же изомеризацией аспарагиновой кислоты CDR-H3 scFv, которая была выявлена в первичном испытании стабильности методом ускоренного старения. Отличия в результатах pH 5 и pH 8 дополнительно демонстрируют, что F3'-1602 было более стабильным при повышенном уровне pH.

**Таблица 96. EC50 и максимальный лизис клеток PL-21 CLEC12A+ посредством F3'-1602 (стрессовые условия, представляющие собой pH 5,0 и pH 8,0)**

| **Тестируемый образец** | **EC50 (нМ)** | **Максимальный лизис (%)** |
|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 0,18 | 91% |
| F3'-1602, pH 5,0, 2 недели, 40°C | 0,34 | 93% |
| F3'-1602, контроль | 0,19 | 95% |
| F3'-1602, pH 8,0, 2 недели, 40°C | 0,24 | 90% |

Принудительное окисление

**[0791]** Одним из наиболее распространенных показателей стабильности, указывающих на модификации белков, является окисление остатков метионина. Для выявления "горячих точек" окисления разводили 1,0 мг F3'-1602 до 1 мг/мл посредством забуференного фосфатом солевого раствора (PBS). Добавляли 3,3 мкл 3% пероксида водорода к аликвоте 0,5 мл F3'-1602 (0,02% пероксид водорода). Окисление F3'-1602 выполняли в течение 24 часов при комнатной температуре в темноте. Через 24 часа образец подвергали замене буфера на буфер PBS, pH 7,4, с использованием устройств Amicon Ultra 0,5 мл 10K MWCO в соответствии с инструкциями производителя. Не подвергнутый окислению контроль (0,5 мл) хранили при -80ºC.

**[0792]** После принудительного окисления какие-либо значимые отличия в %-ом содержании мономера, HMWS или LMWS в F3'-1602 отсутствовали (**таблица 97**).

**Таблица 97. Сводные данные SEC-анализа: %-ое содержание мономера, HMW и LMW (принудительное окисление)**

| **Тестируемый образец** | **Мономер (%)** | **HMW (%)** | **LMW (%)** |
|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 99,9 | 0,1 | ND |
| F3'-1602, 0,02% $H_2O_2$, 24 ч | 99,9 | 0,1 | ND |

ND: не выявлено

**[0793]** После принудительного окисления чистота F3'-1602, определенная посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях, снизилась менее чем на 1% (**таблица 98**). Это указывает на то, что F3'-1602 было устойчивым к фрагментации в ходе принудительного окисления. Новых фрагментов после принудительного окисления не выявили. Форма пика окисленного образца изменилась после воздействия стрессового условия, представляющего собой окисление. Без ограничения какой-либо теорией, это может указывать на то, что больше не существовало гомогенной популяции и что высокие уровни окисления приводили к конформационному изменению, отсутствовавшему в контрольном образце F3'-1602. Разница в значениях времени миграции главных пиков в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 98. Сводные данные по чистоте, определенной посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях (принудительное окисление)**

| **Тестируемый образец** | **LMW (%)** | **Главный пик (%)** | **HMW (%)** |
|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 3,9 | 96,1 | ND |
| F3'-1602, 0,02% $H_2O_2$, 24 ч | 4,7 | 95,2 | ND |

ND: не выявлено

**[0794]** После принудительного окисления чистота F3'-1602, определенная посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях, не изменилась (**таблица 99**). Это указывает на то, что F3'-1602 было устойчивым к фрагментации в ходе принудительного окисления. Новых фрагментов после принудительного окисления не выявили. Разница в значениях времени миграции главных пиков в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 99. Сводные данные по чистоте, определенной посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях (принудительное окисление)**

| **Тестируемый образец** | **Цепь L (%)** | **Цепь H(%)** | **Цепь S (%)** | **Чистота (%)** |
|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 17,7 | 40,1 | 40,5 | 98,3 |
| F3'-1602, 0,02% $H_2O_2$, 24 ч | 17,8 | 40,0 | 40,4 | 98,2 |

**[0795]** В дополнение к определению посредством SEC биофизических аспектов принудительного окисления важно понимать, какие аминокислоты наиболее подвержены окислению. В CDR F3'-1602 нет остатков метионина, однако несколько метионинов обнаружены в каркасном и константном доменах. Уровни окисления были низкими во

всех участках в контроле и только в двух участках наблюдали значительное увеличение окисления после воздействия пероксидом водорода (**таблица 100**). Низкие уровни окисления наблюдали и у других терапевтических mAb.

**Таблица 100. Сводные данные по проценту сайт-специфического окисления в F3'-1602 (принудительное окисление)**

| **Последовательность пептида** | **SEQ ID NO** | **Цепь** | **Положение** | **Относительное содержание (%)** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **Контроль** | **Окисленный** |
| LSCAASGFTFSSYS**M**NWVR | 299 | H | 34 | 0,6 | 0,8 |
| NSLYLQ**M**NSLR | 300 | H | 83 | 0,2 | 0,3 |
| DTL**M**ISR | 301 | H/S* | 257/283 | 2,3 | 71,3 |
| WQQGNVFSCSV**M**HEALHNHYTQK | 302 | H/S* | 433/454 | 1,5 | 47,4 |
| DIQ**M**TQSPSSVSASVGDR | 303 | L | 4 | 0,3 | 0,4 |
| YDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ**M**TQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPK | 304 | S | 141 | ND | ND |

* пептид выявлен в цепях H и S; ND: не выявлено

**[0796]** Аффинность связывания образцов F3'-1602, подвергнутых стрессовому условию принудительного окисления, с рекомбинантным CLEC12A человека измеряли посредством SPR, как это описано в примере 14. После 24 часов инкубации при комнатной температуре в присутствии 0,02% пероксида водорода кинетические параметры и аффинность связывания F3'-1602 с CLEC12A человека, а также кажущийся $R_{max}$ не изменились (**фиг. 93 и таблица 101**). Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняло связывание с CLEC12A после принудительного окисления, а модификации метионинов в константных областях и каркасной области не оказывали влияние на аффинность F3'-1602 в отношении hCLEC12A.

**Таблица 101. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hCLEC12A (принудительное окисление)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** | **Уровень** |
|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | **захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hCLEC12A | $7,99x10^5$ | $8,58x10^{-4}$ | 1,1 | 78,6 |
| F3'-1602, принудительно окисленное | hCLEC12A | $8,06x10^5$ | $8,70x10^{-4}$ | 1,1 | 76,8 |

Результаты представляют среднее значение для n = 2 повторов

**[0797]** Аффинность связывания образцов F3'-1602, подвергнутых стрессовому условию принудительного окисления, с рекомбинантным NKG2D человека измеряли посредством SPR, как это описано в примере 14. После 24 часов инкубации при комнатной температуре в присутствии 0,02% пероксида водорода кинетические параметры и аффинность связывания F3'-1602 с NKG2D человека не изменились (**фиг. 94 и таблица 102**). Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняет связывание с NKG2D после принудительного окисления, а модификации метионинов в константных областях и каркасной области не оказывают влияние на аффинность F3'-1602 в отношении hNKG2D.

**Таблица 102. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hNKG2D (принудительное окисление)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики 1:1** | **Стационарное состояние, $K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hNKG2D | $(1,43\pm0,03)x10^5$ | $(1,07\pm0,04)x10^{-1}$ | 750±23 | 759±23 | 44,1 |
| F3'-1602, 0,02% $H_2O_2$, 24 ч | hNKG2D | $(1,48\pm0,06)x10^5$ | $(1,07\pm0,04)x10^{-1}$ | 722±6 | 732±7 | 48,2 |

**[0798]** Влияние стрессового условия, представляющего собой принудительное окисление, на функциональность F3'-1602 оценивали в анализе цитотоксичности с использованием клеток KHYG-1-CD16a, экспрессирующих NKG2D и CD16a, как это описано в примере 14. Как показано на **фиг. 95 и в таблице 103**, после воздействия

стрессового условия, представляющего собой принудительное окисление, активность F3'-1602 (EC50 и максимальный лизис) не изменилась.

**Таблица 103. EC50 и максимальный лизис клеток PL-21 CLEC12A+ посредством F3'-1602 (принудительное окисление)**

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Максимальный лизис (%) |
|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 0,26 | 60% |
| F3'-1602, 0,02% $H_2O_2$, 24 ч | 0,28 | 63% |

Выдерживание при низком уровне pH

**[0799]** Вирусная инактивация посредством выдерживания при низком уровне pH является важной стадией в производстве биологических препаратов. Для оценки стабильности F3'-1602 при выдерживании при низком значении pH осуществляли захват F3'-1602 на колонке MabSelect Sure Protein A и элюировали посредством 100 мМ глицина, pH 3,0. Пиковые фракции объединяли и 12 мл элюата из колонки с иммобилизованным белком A доводили до pH 3,3 с использованием дополнительного 100 мМ глицинового буфера, pH 3,0. Элюат с откорректированным pH выдерживали при комнатной температуре. Через 1,5 часа pH элюата доводили до нейтрального значения с помощью 1,0 M Tris-HCl, pH 8,3. Образец, выдержанный при определенном pH, дополнительно очищали посредством катионообменной хроматографии. Для анализа конечный продукт подвергали замене буфера на PBS, pH 7,4.

**[0800]** После инкубации при низком уровне pH F3'-1602 анализировали посредством SEC, чтобы определить, вызывало ли выдерживание агрегацию. Увеличение содержания HMW и LMW в F3'-1602, которое могло быть обусловлено стадией выдерживания при низком уровне pH, отсутствовало (**таблица 104**).

**Таблица 104. Сводные данные SEC-анализа: %-ое содержание мономера, HMW и LMW (выдерживание при низком уровне pH)**

| Тестируемый образец | Мономер (%) | HMW (%) | LMW (%) |
|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль, элюат ProA | 77,4 | 11,5 | 11,1 |
| F3'-1602, выдерживание при низком уровне pH, элюат ProA | 86,4 | 3,4 | 10,2 |

**[0801]** После выдерживания при низком уровне pH чистота F3'-1602, определенная посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях, не изменилась (**таблица 105**). Это указывает на то, что F3'-1602 было устойчивым к фрагментации в ходе выдерживания при низком уровне pH. После выдерживания при низком уровне pH новых фрагментов не

выявили. Разница в значениях времени миграции главных пиков в наложении находилась в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа.

**Таблица 105. Сводные данные по чистоте, определенной посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях (выдерживание при низком уровне pH)**

| Тестируемый образец | LMW (%) | Главный пик (%) | HMW (%) |
|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 1,3 | 98,7 | ND |
| F3'-1602, выдерживание при низком уровне pH | 1,1 | 98,9 | ND |

ND: не выявлено

**[0802]** После выдерживания при низком уровне pH чистота F3'-1602, определенная посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях, не изменилась (**таблица 106**). Это указывает на то, что F3'-1602 было устойчивым к фрагментации в ходе выдерживания при низком уровне pH. После выдерживания при низком уровне pH новых фрагментов не выявили.

**Таблица 106. Сводные данные по чистоте, определенной посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях (выдерживание при низком уровне pH)**

| Тестируемый образец | Легкая цепь (%) | Тяжелая цепь (%) | Цепь scFv-Fc (%) | Чистота (%) |
|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 18,1 | 39,9 | 40,4 | 98,4 |
| F3'-1602, выдерживание при низком уровне pH | 17,6 | 39,7 | 41,1 | 98,4 |

**[0803]** Химическую модификацию боковых цепей аминокислот обычно можно определять экспериментально в общем масштабе посредством cIEF. cIEF-профили контрольного антитела F3'-1602 и партии, выдерживаемой при низком уровне pH, визуально были очень сходными, а результаты относительного количественного определения кислых фракций, фракций главного продукта и основных фракций находятся в пределах 1% друг от друга, что указывает на то, что выдерживание при низком уровне pH не оказывало поддающегося измерению влияния на профиль зарядов F3'-1602 (**таблица 107**).

**Таблица 107. Сводные данные по %-ому содержанию кислых фракций, фракций главного продукта и основных фракций F3'-1602 (выдерживание при низком уровне pH)**

| Тестируемый образец | pI | Кислые фракции (%) | Фракции главного продукта (%) | Основные фракции (%) |
|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 8,75 | 42,4 | 48,5 | 9,1 |
| F3'-1602, выдерживание при низком уровне pH | 8,80 | 42,7 | 49,1 | 8,2 |

**[0804]** Образцы F3'-1602 анализировали по массе интактного антитела для отслеживания модификации и фрагментации, как результат выдерживания при низком уровне pH. Выявляемая масса как для контроля, так и для образца, выдерживаемого при низком уровне pH, соответствовали друг другу и теоретической массе F3'-1602 (гликоформа G0F/G0F: 126360,4 Да). Выдерживание при низком уровне pH не влияло на массу F3'-1602 (**таблица 108**) и фрагментацию не выявили.

**Таблица 108. Теоретическая и наблюдаемая массы F3'-1602 (выдерживание при низком уровне pH)**

| Тестируемый образец | Теорет. масса (Да) | Набл. масса (Да) | Дельта массы (Да) | Точность определения масс (ppm) |
|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 126,360,4 | 126,360,8 | +0,4 | 3,2 |
| F3'-1602, выдерживание при низком уровне pH | 126,360,4 | 126,360,7 | +0,3 | 2,4 |

**[0805]** Выдерживание при низком уровне pH не вызывало каких-либо изменений в кинетических параметрах или аффинности связывания F3'-1602 с CLEC12A человека (**фиг. 96 и таблица 109**). Разница в константах скорости ассоциации и диссоциации, а также разница в кажущемся ответе при максимальном связывании (Rmax) между контролем и образцом, выдерживаемым при низком уровне pH, находились в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняло аффинность к CLEC12A после стадии выдерживания при низком уровне pH в ходе изготовления биотерапевтических препаратов.

**Таблица 109. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hCLEC12A (выдерживание при низком уровне pH)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | ***ka* ($M^{-1}c^{-1}$)** | ***kd* ($c^{-1}$)** | **KD (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602 Контроль | hCLEC12A | (6,78 ± 0,13) x $10^5$ | (4,33 ± 0,20) x $10^{-4}$ | 0,638 ± 0,028 | 176 ± 19 |
| F3'-1602, выдерживание при низком уровне pH | hCLEC12A | (7,15 ± 0,10) x $10^5$ | (4,61 ± 0,03) x $10^{-4}$ | 0,644 ± 0,008 | 157 ± 7 |

Результаты представляют среднее значение для n = 4 повторов

**[0806]** После выдерживания при низком уровне pH связывание с NKG2D человека не изменилось (**фиг. 97 и таблица 110**). Разница в аффинности в стационарном состоянии и разница в кажущемся ответе при максимальном связывании между контролем и образцом, подвергнутым стрессовому условию 40°C, находились в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняло аффинность к NKG2D человека после выдерживания при низком уровне pH.

**Таблица 110. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания F3'-1602 с hNKG2D (выдерживание при низком уровне pH)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | ***ka* ($M^{-1}c^{-1}$)** | ***kd* ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики 1:1** | **Стационарное состояние, $K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hNKG2D | (2,06 ± 0,09) x $10^5$ | (1,46 ± 0,08) x $10^{-1}$ | 714 ± 62 | 710 ± 63 | 34,0 |
| F3'-1602 Выдерживание при низком уровне pH | hNKG2D | (2,07 ± 0,08) x $10^5$ | (1,39 ± 0,02) x $10^{-1}$ | 671 ± 20 | 672 ± 18 | 33,7 |

Результаты представляют среднее значение для n = 3 измерений

**[0807]** После выдерживания при низком уровне pH связывание F3'-1602 с CD16a V158 человека не изменилось (**фиг. 98 и таблица 111**). Разница в аффинности связывания и разница в кажущемся ответе при максимальном связывании между контролем и образцом, выдерживаемым при низком уровне pH, находились в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Это указывает на то, что F3'-1602 сохраняло аффинность к CD16a человека при данных условиях испытания стабильности методом ускоренного старения.

**Таблица 111. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности F3'-1602 в отношении hCD16a V158 (выдерживание при низком уровне pH)**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** | **Уровень захвата (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | hCD16aV | (1,13 ± 0,04) x $10^5$ | (2,40 ± 0,09) x $10^{-2}$ | 212 ± 1 | 13,7 |
| F3'-1602 Выдерживание при низком уровне pH | hCD16aV | (1,09 ± 0,04) x $10^5$ | (2,29 ± 0,04) x $10^{-2}$ | 210 ± 3 | 14,1 |

Результаты представляют среднее значение для n = 3 повторов

**[0808]** В дополнение к нарушению биофизической стабильности и целостности низкий уровень pH мог вызывать химическое разложение боковых цепей аминокислот, в частности изомеризацию аспарагиновой кислоты. Химическое разложение F3'-1602 в областях, которые имеют исключительно важное значение для функциональности, если они имеются, должно проявляться в виде снижения эффективности в анализе активности. Таким образом, активность F3'-1602 в отношении раковых клеток PL-21 $CLEC12A^+$ тестировали после выдерживания при низком уровне pH в биологическом анализе с использованием KHYG1-CD16V. Активность F3'-1602 не изменилась при выдерживания при низком уровне pH (**фиг. 99 и таблица 112**).

**Таблица 112. EC50 и максимальный лизис клеток PL-21 CLEC12A+ посредством F3'-1602 (выдерживание при низком уровне pH)**

| **Тестируемый образец** | **EC50 (нМ)** | **Максимальный лизис (%)** |
|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 0,27 | 61 |
| F3'-1602, выдерживание при низком уровне pH | 0,15 | 54 |

Коллоидная стабильность

**[0809]** Осаждение посредством PEG использовали для оценки коллоидной стабильности F3'-1602. Если вкратце, концентрированное F3'-1602 (~20 мг/мл) разводили до 1 мг/мл в аликвотах по 100 мкл (10 мМ ацетата натрия, pH 5,0) с конечными концентрациями PEG-6000 в диапазоне от 0 до 30% (вес/объем). Аликвоты тщательно перемешивали и оставляли на ночь при 2-8°C. На следующий день пробирки центрифугировали с осаждением любого возможного осадка и измеряли концентрацию супернатанта на Lunatic по поглощению при длине волны 280 (Unchained Labs).

**[0810]** Растворимость F3'-1602 в ацетатном буфере с pH 5,0 с возрастающей концентрацией PEG-6000 (0-30%) отслеживали по поглощению при длине волны 280. Точка перехода (Cm) в 10 мМ ацетата натрия, pH 5,0, составила 24,5%, что указывает на высокую растворимость F3'-1602 в данном буфере (**фиг. 100**). Трастузумаб и адалимумаб в качестве препаратов сравнения также оценивали в анализе осаждения с использованием PEG в 10 мМ ацетата натрия, pH 5,0. Точки перехода для трастузумаба и адалимумаба, используемых в качестве контролей в анализе, составили > 30% и 11,7% PEG-6000 соответственно.

**[0811]** Затем F3'-1602 концентрировали с использованием центрифужных фильтров с отсечением по молекулярной массе 30 кДа в PBS, pH 7,4. Концентрацию определяли по поглощению при длине волны 280 на Nanodrop и качество продукта отслеживали посредством SEC. Тестируемый материал вводили в прибор для жидкостной хроматографии при высоком давлении Agilent 1260 Infinity II с насосом для четырехкомпонетных смесей 1260 Quat, пробоотборником 1260 Vialsampler, 1260 VWD. Образец разделяли на колонке Superdex200 Increase 10/300 GL. Буфер подвижной фазы для SEC представлял собой PBS, pH 7,4, пропускаемый со скоростью потока 0,60 мл/мин. Поглощение считывали как при 214, так и при 280 нм, площади пиков интегрировали вручную и регистрировали процентное содержание HMWS, LMWS и мономера.

**[0812]** F3'-1602 концентрировали до примерно 25, 50, 100 и 150 мг/мл в PBS, pH 7,4, и извлечение отслеживали посредством визуальной оценки, определения концентрации (по поглощению при длине волны 280) и SEC. Антитело F3'-1602 было способно выдержать концентрирование до > 150 мг/мл в PBS, pH 7,4, с минимальным снижением процентного содержания мономера и без видимого осаждения (**фиг. 101 и таблица 113**).

**Таблица 113. Содержание HMWS, мономера и LMWS в F3'-1602 в зависимости от концентрации**

| **Концентрация (мг/мл)** | **HMWS (%)** | **Мономер (%)** | **LMWS (%)** |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| 4,1 | ND | 98,3 | 1,7 |
| 26,0 | 0,1 | 97,7 | 2,3 |
| 58,4 | 0,1 | 97,7 | 2,2 |
| 89,2 | 0,2 | 97,0 | 2,9 |
| 158,8 | 0,2 | 96,6 | 3,2 |

**Пример 16. Стабильность и технологичность F3'-1602 и AB0010**

**[0813]** F3'-1602 и AB0010 представляют собой TriNKET в форматах F3' и F3 соответственно, которые имеют CLEC12A-связывание участки, полученные из одного и того же гуманизированного антитела к CLEC12A. Как описано в примерах 5 или 6, эти два TriNKET обладают сходной аффинностью связывания с CLEC12A. Данный пример был предназначен для сравнения стабильности и технологичности F3'-1602 и AB0010.

**[0814]** Если вкратце, F3'-1602 и AB0010 составляли в 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 125 мМ NaCl и 0,01% PS-80 при pH 7,8, как это описано в примере 14. Составленные белки подвергали тепловому стрессовому условию 40°C в течение четырех недель и их стабильность оценивали посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях, SDS-CE в восстанавливающих условиях, SEC и анализов цитотоксичности, как это описано в примере 14.

**[0815]** Данные, представленные в таблице 114, показывают, что доля LMW в образце AB0010, подвергнутом стрессовому условию, увеличивалась в значительно большей степени, чем доля LMW в образце F3'-1602, подвергнутом стрессовому условию. Данные, представленные в таблице 115, показывают, что чистота образца AB0010, подвергнутого стрессовому условию, снижалась в значительно большей степени, чем чистота образца F3'-1602, подвергнутого стрессовому условию. Эти результаты указывают на то, что AB0010 разлагалось в значительно большей степени, чем F3'-1602 при воздействии тепловым стрессовым условием.

**Таблица 114. Сводные данные по чистоте F3'-1602 и AB0010, определенной посредством SDS-CE в невосстанавливающих условиях**

| **Тестируемый образец** | **LMW (%)** | **Главный пик (%)** | **HMW (%)** |
|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 3,0 | 97,0 | ND |
| F3'-1602, 40°C, 4 недели | 8,4 | 91,2 | 0,4 |
| AB0010, контроль | 8,4 | 90,4 | 1,2 |
| AB0010, 40°C, 4 недели | 27,8 | 71,4 | 0,9 |

ND: не выявлено

**Таблица 115. Сводные данные по чистоте F3'-1602 и AB0010, определенной посредством SDS-CE в восстанавливающих условиях**

| Тестируемый образец | Чистота (%) |
|---|---|
| F3'-1602, контроль | 97,4 |
| F3'-1602, 40°C, 4 недели | 95,2 |
| AB0010, контроль | 95,0 |
| AB0010, 40°C, 4 недели | 89,3 |

**[0816]** Как показано в таблице 116, количество HMWS в образце AB0010, подвергнутом стрессовому условию, увеличивалось в значительно большей степени, чем количество HMWS в образце F3'-1602, подвергнутом стрессовому условию. Этот результат свидетельствует о том, что AB0010 агрегировалось в значительно большей степени, чем F3'-1602 при воздействии тепловым стрессовым условием.

**Таблица 116. Сводные данные SEC-анализа F3'-1602 и AB0010: %-ое содержание мономера, HMW и LMW**

| Тестируемый образец | HMWS (%) | Мономер (%) | LMWS (%) |
|---|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 0,3 | 97,9 | 1,8 |
| F3'-1602, 40°C, 4 недели | 3,6 | 91,4 | 5,0 |
| AB0010, контроль | 0,8 | 99,2 | 0,1 |
| AB0010, 40°C, 4 недели | 13,8 | 81,7 | 4,5 |

**[0817]** Как описано в примере 14, сахароза в большей степени совместима с лиофилизированной формой, чем NaCl. Следовательно, F3'-1602 и AB0010 также составляли в 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы и 0,01% полисорбата 80 при pH 7,8. Затем белки TriNKET в каждом составе подвергали тепловому стрессовому условию 40°C в течение четырех недель и их способность к опосредованию цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, оценивали посредством анализа цитотоксичности, как это описано в примере 14. Как показано на фиг. 102A и 102B и в таблице 117, способность F3'-1602 и AB0010 опосредовать уничтожение раковых клеток PL21 CLEC12A$^+$ клетками KHYG-1-CD16a, экспрессирующими NKG2D и CD16a, в значительной степени не изменилась под воздействием теплового стрессового условия.

**Таблица 117. EC50 и максимальный лизис клеток PL21 CLEC12A+ посредством F3'-1602 или AB0010**

| **Тестируемый образец** | **EC50 (нМ)** | **Макс. лизис (%)** |
|---|---|---|
| F3'-1602, контроль | 0,26 | 90 |
| F3'-1602, 40°C, 4 недели в 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы и 0,01% полисорбата 80 при pH 7,8. | 0,34 | 93 |
| F3'-1602, 40°C, 4 недели в 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 125 мМ NaCl и 0,01% полисорбата 80 при pH 7,8. | 0,29 | 93 |
| AB0010, контроль | 0,57 | 74 |
| AB0010, 40°C, 4 недели в 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы и 0,01% полисорбата 80 при pH 7,8. | 0,75 | 74 |
| AB0010, 40°C, 4 недели в 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 125 мМ NaCl и 0,01% полисорбата 80 при pH 7,8. | 0,58 | 78 |

**Пример 17. Молекулярный формат, дизайн, структура и характеристики TriNKET AB0089, специфического к CLEC12A**

**Цель исследования**

**[0818]** Цели данного исследования заключались в описании молекулярного формата, дизайна, структуры и характеристик TriNKET AB0089, специфического к CLEC12A. AB0089 представляет собой улучшенный вариант AB0237, в котором первичная последовательность CLEC12A-связывающего VH была оптимизирована с устранением потенциальных сайтов неблагоприятных модификаций в последовательности, представляющих собой сайты изомеризации, с сохранением аффинности в отношении CLEC12A и активности цитотоксического лизиса клеток AML CLEC12A+. Кроме того, авторы настоящего изобретения стремились уменьшить количество мышиных обратных мутаций в каркасных областях, что повышало показатель гуманизации молекулы. В частности, в данном отчете авторы настоящего изобретения a) описывают молекулярный формат и дизайн AB0089; b) вкратце излагают подходы на основе белковой инженерии для устранения потенциальных сайтов неблагоприятных модификаций в последовательности CDRH3; c) описывают подходы на основе белковой инженерии,

направленные на уменьшение количества мышиных обратных мутаций; d) представляют информацию об экспрессии и очистке AB0089; e) описывают основные биохимические и биофизические характеристики молекулы; f) определяют аффинность AB0089 в отношении рекомбинантных человеческих мишеней (CLEC12A, NKG2D и CD16a); g) демонстрируют связывание AB0089 с раковыми клеточными линиями AML, экспрессирующими CLEC12A человека; h) демонстрируют избирательность AB0089; i) определяют активность AB0089 в уничтожении раковых клеток AML; j) оценивают связываемый эпитоп; k) оценивают связывание с FcγR и FcR и сравнивают с контрольным mAb к IgG1; и l) описывают характеристики AB0089 в исследованиях реализуемости, включая испытание стабильности методом ускоренного старения, принудительное разложение и технологичность.

**План исследования**

**[0819]** В ходе оценки реализуемости TriNKET AB0237, специфического к CLEC12A, в CDRH3 выявили потенциальный сайт неблагоприятной модификации, сайт изомеризации, который приводил к снижению связывания с CLEC12A и активности в жестких стрессовых условиях. Дрожжевой дисплей использовали для устранения потенциального сайта неблагоприятной модификации в последовательности и оптимизации CMC-свойств молекулы. Кроме того, каркасную область молекулы дополнительно оптимизировали с удалением мышиных обратных мутаций и их заменой соответствующими человеческими остатками, за счет чего улучшается показатель гуманизации молекулы. Свойства AB0089 оценивали по связыванию с рекомбинантным hCLEC12A, связыванию с изогенными и раковыми клетками, экспрессирующими CLEC12A, а также по активности молекулы против раковых клеток AML CLEC12A+. Определяли биофизические и биохимические характеристики AB0089, включающие термическую стабильность (DSC), гидрофобность (HIC) и pI (cIEF). Молекулярное моделирование использовали для оценки распределения заряда и гидрофобных зон на поверхности AB0089 и для сравнения с моноклональными антителами, исследуемыми на стадии их клинического испытания. Специфичность связывания оценивали посредством PSR, связывания с клетками, не экспрессирующими представляющую интерес мишень, и посредством микрочипа HuProt™. AB0089 экспрессировали в двух разных клеточных линиях млекопитающих (Expi293 и ExpiCHO) и очищали с использованием 2-стадийного способа очистки посредством платформы Dragonfly Tx. В полном объеме определяли характеристики связывающих свойств AB0089, включающих CLEC12A, NKG2D, CD16a (V158 и F158), расширенную панель рецепторов Fcγ (CD32a (H131 и R131), CD16b, CD32b, CD16 яванского макака, CD64 человека и яванского макака) и FcRn (человека и яванского макака). И наконец, оценивали

AB0089 в полной панели анализов реализуемости, включающей испытание стабильности методом ускоренного (40°C) старения в базовых буферах для составления (20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 6,0) и 20 мМ цитрата, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0, принудительное разложение (длительное воздействие стрессового условия pH 5, pH 8, принудительное окисление) и технологичность (замораживание/оттаивание, перемешивание, выдерживание при низком уровне pH).

**Материалы и способы**

Материалы

*Тестируемые образцы*

Таблица 118. Сводные данные о тестируемых образцах

| **Название** | **Партия** | **Хозяин для экспрессии** |
|---|---|---|
| AB0237 | AB0237-002; 06Sep19AB | ExpiCHO |
| AB0089 | AB0089-001 | Expi293 |
| AB0089 | AB0089-002 (реализуемость) | ExpiCHO |
| AB0089 | AB0089-003 (выдерживание при низком уровне pH) | ExpiCHO |
| AB0089 | AB0089-004 (выдерживание при низком уровне pH) | ExpiCHO |
| AB0192 | AB0192-005 | ExpiCHO |

*Белковые реагенты*

Таблица 119. Сводные данные по белковым реагентам

| **Название** | **Изготовитель** | **Партия** |
|---|---|---|
| CLEC12A-His человека | Dragonfly Tx | 16Oct18GL |
| CLEC12A-K244Q-His человека | Dragonfly Tx | 30Apr18AC |
| CLEC12A-His яванского макака | Dragonfly Tx | 30May18AC |
| Биотинилированный CLEC12A-His | Dragonfly Tx | 17Apr19GL |
| mFc-hNKG2D | Dragonfly Tx | 01Dec17AB |
| mFc-cNKG2D | Dragonfly Tx | 28Sep18GL |
| Гуманизированное mAb 16B8.C8 | Dragonfly Tx | AB0037-001 |

| **Название** | **Изготовитель** | **Партия** |
|---|---|---|
| hcFAE-A49.CLL1-Merus (TriNKET DuoBody) | Dragonfly Tx | 10May18DF |
| hcFAE-A49.h6E7 (TriNKET DuoBody) | Dragonfly Tx | 05Feb19DF |
| hcFAE-A49.теподитамаб (TriNKET Duobody) | Dragonfly Tx | 27Aug19XL |
| Трастузумаб | Roche | N3017H05 |
| Адалимумаб | AbbVie | 83364XH07 |
| Ритуксимаб | Dragonfly Tx | 19Apr19 MH |

Таблица 120. Сводные данные о рекомбинантных белках, представляющих собой Fc-рецепторы

| **Реагент** | **Поставщик** | **Номер по каталогу** |
|---|---|---|
| Человеческий CD64 | ACRO Biosystems | FCA-H82E8 |
| CD64 яванского макака | ACRO Biosystems | FCA-C82E8 |
| CD32a H131 человека | ACRO Biosystems | CDA-H82E6 |
| CD32a R131 человека | ACRO Biosystems | CDA-H82E7 |
| CD32b человека | ACRO Biosystems | CDB-H82E0 |
| CD16a V158 человека | Sino Biologicals | 10389-H27H1-B |
| CD16a F158 человека | Sino Biologicals | 10389-H27H-B |
| Человеческий CD16b | ACRO Biosystems | CDB-H82E4 |
| CD16 яванского макака | ACRO Biosystems | FC6-C82E0 |
| FcRn человека | ACRO Biosystems | FCM-H5286 |
| FcRn яванского макака | ACRO Biosystems | FCM-C5284 |

Способы

*Анализа связывания клеток посредством проточной цитометрии*

**[0820]** Связывание AB0089 с изогенными клетками, экспрессирующими CLEC12A, и с раковыми клетками PL-21 осуществляли так, как это подробно описано в примере 19. Значения EC50 получали из кривых связывания клеток с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (четырехпараметрическая логистическая нелинейная регрессионная модель аппроксимации кривой).

*Конструирование и оценка библиотеки дрожжевого дисплея*

**[0821]** Использовали стратегию последовательного мутагенеза с использованием пула синтетических олигонуклеотидов CDRH3 для конструирования библиотеки дрожжевого дисплея для созревания аффинности (обозначенной как "библиотека 17"), где каждый

остаток CDRH3 AB0237 (YDYDDSLDY, SEQ ID NO: 139) был заменен с рандомизацией всех 20 аминокислот в виде одного участка или в парах (фиг. 103).

**[0822]** Сперва конструировали синтетическую двухнитевую ДНК, кодирующую scFv, посредством замены CDRH3 уникальным сайтом рестрикции для BamH1. Затем scFv клонировали в плазмиду дрожжевого дисплея (вектор pYES-Aga2) посредством способа клонирования Hifi с получением в результате плазмиды pYES-Aga2-scFv-BamH1. ДНК-олигонуклеотиды с областями, гомологичными вектору, конструировали со следующими рандомизациями, введенными в исходной CDRH3 (YDYDDSLDY, SEQ ID NO:139) в XDYDDSLDY (SEQ ID NO:305), YXYDDSLDY (SEQ ID NO:306), YDXDDSLDY (SEQ ID NO:307), YDYXDSLDY (SEQ ID NO:308), YDYDXSLDY (SEQ ID NO:309), YDYDDXLDY (SEQ ID NO:310), YDYDDSXDY (SEQ ID NO:311), YDYDDSLXY (SEQ ID NO:312), YDYDDSLDX (SEQ ID NO:313), XXYDDSLDY (SEQ ID NO:314), XDXDDSLDY (SEQ ID NO:315), XDYXDSLDY (SEQ ID NO:316), XDYDXSLDY (SEQ ID NO:317), XDYDDXLDY (SEQ ID NO:318), XDYDDSXDY (SEQ ID NO:319), XDYDDSLXY (SEQ ID NO:320), XDYDDSLDX (SEQ ID NO:321), где X = любая аминокислота) и объединяли в пул. Затем вектор pYES-Aga2-scFv-BamHI расщепляли посредством BamHI и эту расщепленную плазмиду подвергали электропорации вместе с пулами ДНК-олигонуклеотидов с получением окончательной "библиотеки 17" дрожжевого дисплея. В ходе гомологичной рекомбинации в дрожжах внутренне лигируются олигонуклеотиды библиотеки с линеаризованной плазмидой, в результате чего каждая дрожжевая клетка содержит одну плазмиду с одним мутированным олигонуклеотидом CDRH3. После отбора и определения характеристик полученных продуктов "библиотеки 17" использовали аналогичную стратегию созревания аффинности, нацеленную на CDRH2, для последовательного мутагенеза на фоне одной оптимизированной CDRH3. Библиотека для данного второго цикла созревания аффинности обозначается в данном документе как "библиотека 30".

**[0823]** Библиотеку оценивали посредством FACS-сортировки после выращивания в средах D-UT. За 24 часа до сортировки дрожжи пересевали с достижением конечной концентрации 0,5 ЕОП/мл (что измерено посредством спектрофотометра в видимой области спектра), осаждали центрифугированием, дважды промывали в средах GR-UT, а затем инкубировали в течение ночи в тех же средах. В день проведения эксперимента отбирали клетки в количестве 3 ЕОП для тестирования и помещали их в лунки 96-луночного планшета с U-образным дном. Это повторяли до получения количества антигенов, требуемого для тестирования. Затем клетки дважды промывали посредством PBS-F (PBS + 0,25% BSA), а затем разные концентрации биотинилированного CLEC12A-

His инкубировали в течение 30 мин. Далее дрожжевые клетки окрашивали антителом к Flag, меченным FITC, и стрептавидином PE и подвергали сортировке с использованием BD FACSAria для определения связывающих молекул с наивысшей аффинностью.

**[0824]** Итоговые дрожжевые библиотеки анализировали посредством проточной цитометрии. Библиотеку дрожжевого дисплея исходно высевали в среды D-UT за 24 часа до определения характеристик. За 24 часа до проточной цитометрии дрожжи пересевали с достижением конечной концентрации 0,5 ЕОП/мл, осаждали центрифугированием, дважды промывали в средах GR-UT, а затем инкубировали в течение ночи в тех же средах. В день выполнения эксперимента отбирали клетки в количестве 0,2 ЕОП на антиген, подлежащий тестированию, и помещали их в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном. Клетки промывали в PBS-F (PBS + 0,25% BSA), а затем добавляли биотинилированный CLEC12A-His до конечной концентрации 10 нМ в течение 30 минут. Клетки повторно промывали и добавляли небиотинилированный CLEC12A-His (конечная концентрация 1 мкМ) с инкубацией в течение еще 40 минут, при этом образцы отбирали каждые 20 минут. Добавляли FITC-меченое антитело, распознающее Flag, и стрептавидин-PE и инкубировали в течение 30 мин в темноте на льду, дважды промывали, ресуспендировали в PBS-F и анализировали с использованием FACS Celesta.

*Сайт-направленный мутагенез*

**[0825]** gBlock (фрагмент двухнитевой ДНК) с мутацией DS в DT, кодирующий scFv AB0089, нацеливающийся на плечо CLEC12A, заказали в Integrated DNA Technologies (Коралвилл, Айова). Его клонировали в вектор pcDNA3.4 в соответствии с протоколом, описанным ниже.

*Оптимизация кодонов*

**[0826]** Оптимизацию кодонов ДНК части scFv цепи S AB0089 осуществляли посредством инструмента для оптимизации кодонов Codon Optimization Tool от Integrated DNA Technologies (Коралвилл, Айова), в то время как линкер и Fc-часть подвергали оптимизации кодонов (в виде части остова вектора) с применением инструмента для оптимизации кодонов Codon Optimization Tool от GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Оптимизацию кодонов в ДНК для экспрессии цепи H и цепи L AB0089 осуществляли с использованием инструмента для оптимизации кодонов Codon Optimization Tool от GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Цель заключалась в том, чтобы достичь высокого уровня экспрессии в клетках Expi293 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

*Клонирование в векторы для временной экспрессии*

**[0827]** Цепи H и L AB0089 синтезировали и клонировали в вектор pcDNA3.4 с использованием платформы для синтеза генов GeneArt от Thermo Fisher Scientific. Каркас вектора для клонирования цепи S AB0089 авторы настоящего изобретения получали с использованием вектора pcDNA3.4 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) путем создания сайтов рестрикции для KpnI и BamHI для линеаризации и клонирования с применением технологии NEBuilder HiFi от New England Biolabs (Ипсвич, Массачусетс). Следовали общему протоколу клонирования с применением технологии NEBuilder HiFi. Если вкратце, gBlocks (фрагменты двухнитевой ДНК), экспрессирующие представляющий интерес ген, клонировали в остов вектора, трансформировали с использованием бактериальных клеток TG-1, ДНК собирали с использованием набора Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Ирвайн, Калифорния) и последовательность плазмиды подтверждали секвенированием по Сэнгеру (Genewiz, Саут-Плейнфилд, Нью-Джерси). После подтверждения последовательности готовили максипрепы для выделения плазмидной ДНК с использованием набора Nucleo Bond Xtra Maxi EF (Macherey-Nagel, Бетлехем, Пенсильвания).

*Экспрессия*

*Временная экспрессия в клетках Expi293*

**[0828]** Временную трансфекцию клеток Expi293 осуществляли в соответствии с общим протоколом, предоставленным производителем (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс), за исключением того, что для трансфекции использовали реагент PEI. Клетки Expi293 трансфицировали 3 цепями ДНК, полученными для временной экспрессии 3 полипептидов, которые составляют AB0089: pETseq0854 (цепь H), pETseq0424 (цепь L) и pETseq1739 (цепь S), с использованием соотношения плазмид 4:1:1 для достижения высокого процентного содержания гетеродимера. Если вкратце, комплексы ДНК-PEI получали посредством смешивания ДНК и реагента PEIpro (Polyplus Transfection; Илькирш, Франция) по отдельности сначала в средах OptiMEM (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) с последующим смешиванием и последующим добавлением к клеткам Expi293 (жизнеспособность > 95%; VCD 2,5 x $10^6$/мл). После трансфекции клетки культивировали в шейкере-инкубаторе в атмосфере 37°C и 8% $CO_2$. Клеточный супернатант собирали через 5 дней.

*Временная экспрессия в клетках ExpiCHO*

**[0829]** Временные трансфекции клеток ExpiCHO осуществляли в соответствии с общим протоколом, представленным производителем (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Клетки ExpiCHO трансфицировали 3 цепями ДНК,

полученными для экспрессии 3 полипептидов, которые составляют AB0089: pETseq0854 (цепь H), pETseq0424 (цепь L) и pETseq1739 (цепь S), с использованием соотношения плазмид 4:1:1 для достижения высокого процентного содержания гетеродимера. Если вкратце, комплексы ДНК-ExpiFectamine получали путем смешивания ДНК и реагента ExpiFectamine (Life Technologies) по отдельности сначала в средах OptiPro (Life Technologies) с дальнейшим смешиванием и последующим добавлением к клеткам ExpiCHO (жизнеспособность > 95%; VCD 6 x 106/мл). После трансфекции клетки культивировали в шейкере-инкубаторе в атмосфере 37°C и 8% $CO_2$. Добавки Feed и Enhancer ExpiCHO добавляли через 18-20 часов для стимулирования экспрессии белка в соответствии с протоколом. Клеточный супернатант собирали через 9-11 дней в зависимости от жизнеспособности клеток (> 70%).

*Собранный материал*

**[0830]** Для сбора AB0089 супернатанты клеточных культур переносили в поликарбонатные центрифужные флаконы объемом 500 мл или 1 л и центрифугировали при 7500 об/мин в течение 35 мин при 4°C с последующей фильтрацией с использованием фильтрующих колб с размером пор фильтра 0,2 микрона. Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу):

- Счетчик клеток Vi-CELL XR (Beckman Coulter)
- Пробирки для образцов Vi-CELL 4 мл (Beckman Coulter; 08229NT2)
- Набор реагентов Vi-Cell (Beckman Coulter; B94987)
- Поликарбонатный флакон 1 л для центрифугирования (Beckman Coulter; 366751)
- Поликарбонатный флакон 500 мл для центрифугирования (Beckman Coulter; 355649)
- Thermo Scientific Nalgene® Rapid-Flow™, фильтрующие насадки для колб со стерильной мембраной, 1 л (VWR; 73520-986)
- Thermo Scientific Nalgene® Rapid-Flow™, фильтрующие насадки для колб со стерильной мембраной, 500 мл (VWR; 73520-984)

*Очистка*

*Хроматография с захватом посредством белка A*

**[0831]** Колонку SNAP диаметром 5,0 см наполняли до высоты слоя 5,6 см гелем Protein A MabSelect SuRe для колонки объемом примерно 110 мл. Стадии способа очистки с использованием белка A и буферы показаны в таблице 121. Фракции для элюирования нейтрализовали до приблизительно pH 7,0 с использованием 1,0 M Tris, pH 8,3 (5-10% от элюирующего объема). Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу):

- Колонка SNAP (Essential Life Solutions; S-50/125-PASS-OE-FP10)
- Гель MabSelect SuRe Protein A (GE Healthcare; 175-43-802)
- 5x буфер для связывания белка A (500 мМ фосфата натрия, 750 мМ хлорида натрия, pH 7,2) (Boston Bioproducts; C-6332)
- 1x буфер для связывания белка A (100 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, pH 7,2) (разведенный 5x исходный раствор)
- 100 мМ глицина, pH 3,0 (Boston Bioproducts; BB-95-100 мМ)
- 1,0 М Tris, pH 8,3 (Boston Bioproducts; LT-783)
- 10,0 н. гидроксид натрия (VWR; BDH7247-4)
- 0,1 н. гидроксид натрия (разведенный 10,0 н. исходный раствор)

Таблица 121. Стадии способа хроматографии с использованием Protein A MabSelect Sure

| **Стадия** | **Буфер/материал** | **Объем (объем колонки)** | **Скорость потока (мл/мин)** |
|---|---|---|---|
| Уравновешивание | 1x буфер для связывания белка A | 5 | 10 |
| Введение образца | Кондиционированные среды | | 10 |
| Промывка | 1x буфер для связывания белка A | 20 | 10 |
| Элюирование | 100 мМ глицина, pH 3,0 | 7 | 10 |
| Десорбция | 0,1 н. гидроксид натрия | 4 | 10 |
| Повторное уравновешивание | 1x буфер для связывания белка A | 5 | 10 |

*Катионообменная хроматография*

**[0832]** Катионообменную хроматографию (CIEX) осуществляли с использованием смолы Poros XS, которой наполняли колонку XK-26 до высоты слоя примерно 24,5 см с получением конечного объема колонки 130 мл. Буфер для уравновешивания и промывки (буфер A) представлял собой 50 мМ ацетата натрия, pH 5,0, с 10 мМ хлорида натрия. Буфер для элюирования (буфер B) представлял собой 50 мМ ацетата натрия, pH 5,0, с 1,0 М хлоридом натрия.

**[0833]** Корректировали pH и электропроводность элюата, полученного из колонки с иммобилизованным белком A, посредством разведения в по меньшей мере пять раз буфером A. После промывки загруженной колонки белок элюировали ступенчато посредством возрастающих концентраций хлорида натрия. Стадии способа хроматографии IEX показаны в таблице 122.

Таблица 122. Стадии способа катионообменной хроматографии

| **Стадия** | **Буфер** | **% B** | **Объем (объем колонки)** | **Скорость потока (мл/мин)** |
|---|---|---|---|---|
| Уравновешивание | 50 мМ ацетата натрия, 10 мМ NaCl, pH 5,0 | 0 | 7 | 15,0 |
| Введение образца | Нейтрализованный буфер ProA EL, разведенный ~10x буфером IEX EQ | 0 | NA | 15,0 |
| Промывка | 50 мМ ацетата натрия, 10 мМ NaCl, pH 5,0 | 0 | 5 | 15,0 |
| Стадия элюирования | Буфер A: 50 мМ NaOAc, 10 мМ NaCl, pH 5,0 Буфер B: 50 мМ NaOAc, 1 M NaCl, pH 5,0 | 10 | 4 | 15,0 |
| Стадия элюирования | | 15 | 15 | 15,0 |
| Стадия элюирования | | 18 | 15 | 15,0 |
| Стадия элюирования | | 20 | 15 | 15,0 |
| Стадия элюирования | | 30 | 7 | 15,0 |
| Стадия элюирования | | 100 | 7 | 15,0 |
| Десорбция/дезинфекция | 0,1 н. NaOH | 0 | 5 | 15,0 |

*Замена буфера посредством хроматографии G25 и диафильтрации*

**[0834]** Продукт IEX подвергали замене буфера на PBS, pH 7,4 (ThermoFisher Scientific, P/N 10010023), посредством гель-фильтрационной хроматографии с использованием смолы Sephadex™ G25 Fine (GE Healthcare, номер по каталогу 17-0032-01), которой наполняли колонку XK-26 до высоты слоя 30 см (объем колонки 160 мл). Альтернативно продукт подвергали замене буфера и концентрировали путем ступенчатой диафильтрации с использованием центрифужных фильтров Amicon Ultra 15 (Millipore, номер по каталогу: UFC903024).

*SDS-PAGE*

**[0835]** Гели NuPAGE 4-12% Bis-Tris заливали подвижным буфером MES. В лунки загружали 2-3 мкг образца как для электрофореза в невосстанавливающих, так и в восстанавливающих условиях. Образцы для восстанавливающих условий обрабатывали посредством 20 мМ DTT и нагревали при 70°C в течение 10 минут. Параметры источника питания для гель-электрофореза были следующие: постоянный ток 200 В в течение 50 минут. Белковые полосы визуализировали путем окрашивания красителем Novex SimplyBlue SafeStain в соответствии с инструкциями производителя. Гели сканировали на устройстве для визуализации Azure Biosystems C600. Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу):

- Система для электрофореза XCell SureLock Mini-Cell (Thermo Fisher; EI0001)
- Источник питания PowerEase™, 300 Вт (Thermo Fisher; PS0301)
- Цифровой термостат Isotemp Digital Heat Block (Fisher Scientific; 88-860-022)
- Подвижный буфер NuPAGE MES SDS (20X) (Thermo Fisher; NP0002)
- Краситель SimplyBlue SafeStain (Thermo Fisher; LC6065)
- Буфер для нанесения образцов NuPAGE LDS (4X) (Thermo Fisher; NP0007)
- Предварительно окрашенный стандарт белка Novex Sharp Prestained Protein Standard (Thermo Fisher; LC5800)
- 2-МЕРКАПТОЭТАНОЛ (MP Biomedical; 194705)
- Устройство для визуализации Azure c600 (Azure Biosystems)

*Аналитическая эксклюзионная хроматография (Superdex 200)*

**[0836]** Аналитическую эксклюзионную хроматографию осуществляли на колонке Superdex 200 Increase 10/300, установленной на системе для HPLC Agilent 1260. Буфером подвижной фазы был PBS, pH 7,4 (ThermoFisher Scientific, номер по каталогу 10010023). Скорость потока составляла 0,5 мл/мин, время хроматографирования 45 минут. Поглощение измеряли при 214 нм и 280 нм. Пики интегрировали с использованием программного обеспечения для анализа данных Open Lab CDS Data Analysis Software версии 2.3 с применением GC/LC способа оценки площади пиков, выраженной в процентах. Пики ниже порога выявления интегрировали путем определения базовой линии вручную.

*Масса интактного антитела*

**[0837]** Разводили 10 мкг AB0089 до 0,25 мкг/мкл посредством 0,1% муравьиной кислоты, 1 мкг вводили в колонку MabPac 2,1 x 100 мМ и анализировали с использованием устройства UHPLC Thermo Vanquish, соединенного с масс-спектрометром QExactive+ с дополнительной опцией Biopharma. Спектры регистрировали в режиме масс-спектрометрии широкого диапазона при разрешении 17500. Данные анализировали с использованием алгоритма Sliding Window ReSpect в пакете программного обеспечения для анализа данных BioPharma Finder. Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу): 0,1% муравьиной кислоты в воде (Honeywell; LC452-2.5) и колонка MAbPac RP 2,1 x 100 мм, 4 мкм (Thermo Scientific; 088647).

*Определение содержания эндотоксинов*

**[0838]** Регистрацию показателей содержания эндотоксинов определяли посредством устройства для считывания картриджей Endosafe® nexgen MCS (Charles River Laboratories) и картриджей (Charles River Laboratories, номер по каталогу PTS2001F).

Образцы готовили для анализа путем разведения либо в воде, не содержащей эндотоксинов, либо в стерильном PBS с pH 7,4 (ThermoFisher Scientific, номер по каталогу 10010023). Анализ считался действительным, если все параметры эффективности анализа и контроли находились в пределах спецификаций.

*Хроматография с гидрофобным взаимодействием (HIC)*

**[0839]** Образцы AB0089 (5 мкг белка) для введения готовили с высокосолевым буфером (100 мМ фосфата натрия, 1,8 М сульфата аммония, pH 6,5) в соотношении 5:4. Образцы анализировали посредством HPLC с использованием Agilent 1260 Infinity II, оснащенного колонкой Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5 5 мкм, с поддержанием температуры 25°C. Осуществляли элюирование градиентом от 0% низкосолевого буфера (100 мМ фосфата натрия, pH 6,5) до 100% низкосолевого буфера в течение 6,5 минут при скорости потока 1,0 мл/минута. Хроматограммы регистрировали при 280 нм. Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу):

- Колонка Proteomix HIC Butyl-NP5 5 мкм, 4,6 x 35 мм (Sepax; 431NP5-4603)
- Одноосновный фосфат натрия (Sigma Aldrich; RES20906-A702X)
- Двухосновный фосфат натрия (Fisher Bioregents; BB332-500)
- Сульфат аммония, > 99,0% (Sigma; A4418-500G)
- Гидроксид натрия, 10,0 н. (Avantor Materials; 5000-03)
- Хлористоводородная кислота, 10,0 н. (Ricca Chemical Company; 3770-32)

*CE-SDS в невосстанавливающих условиях*

**[0840]** AB0089 разводили до 0,5 мг/мл 1x буфером для образцов нанесения образцов с получением конечного объема образца 50 мкл. К образцам добавляли внутренний стандарт и йодацетамид, которые затем инкубировали при 70°C в течение 10 минут в термостате, а затем в ледяной бане в течение 5 минут. Образцы переносили в 96-луночный планшет, центрифугировали и загружали в прибор. Каждый образец загружали в капилляр в течение 40 секунд при 4600 вольт и разделяли в течение 35 минут при 5750 вольт на приборе Maurice (ProteinSimple, Сан-Хосе, Калифорния). Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу):

- 25X внутренний стандарт (ProteinSimple; 046-016)
- Картридж CE-SDS Plus (ProteinSimple; 090-157)
- Йодоацетамид (Sigma-Aldrich; 16125-5G)
- Набор реагентов для использования в CE-SDS Maurice CE-SDS PLUS Application Kit Reagents (нижний подвижный буфер, разделительная матрица, промывочный раствор, кондиционирующий раствор 1 и 2, 1X буфер для нанесения образцов) (ProteinSimple; 046-571)

- Верхний подвижный буфер (ProteinSimple; 046-384)

*CE-SDS в восстанавливающих условиях*

**[0841]** AB0089 разводили до 0,5 мг/мл 1x буфером для образцов нанесения образцов с получением конечного объема образца 50 мкл. К образцам добавляли внутренний стандарт и бета-меркаптоэтанол (Bio-Rad, № 161-0710), которые затем инкубировали при 70°C в течение 10 минут в термостате, а затем в ледяной бане в течение 5 минут. Образцы переносили в 96-луночный планшет, центрифугировали и загружали в прибор. Каждый образец загружали в капилляр в течение 40 секунд при 4600 вольт и разделяли в течение 31,2 минут при 5750 вольт на приборе Maurice (ProteinSimple, Сан-Хосе, Калифорния).

*Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF)*

**[0842]** AB0089 разводили до 1 мг/мл водой качества Milli-Q, 15 мкл образца добавляли к 60 мкл мастер-микса (вода, метилцеллюлоза, фармалит 3-10, аргинин, маркеры pI 4,05 и 9,99), встряхивали на вихревой мешалке и центрифугировали в течение непродолжительного времени. Аспирировали 60 мкл образца из верхнего слоя раствора, добавляли в 96-луночный планшет и центрифугировали перед тестированием. Образец разделяли в течение одной минуты при 1500 вольт, а затем в течение 8 минут при 3000 вольт на приборе Maurice (ProteinSimple, Сан-Хосе, Калифорния). Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу):

- 0,5% метилцеллюлоза (ProteinSimple; 102730)
- 1% метилцеллюлоза (ProteinSimple; 101876)
- 500 мМ аргинин (ProteinSimple; 042-691)
- Анолит (ProteinSimple; 102727)
- Католит (ProteinSimple; 102728)
- Картридж для cIEF (ProteinSimple; 090-101)
- Флуоресцентный калибровочный стандарт (ProteinSimple; 046-025)
- Фармалиты 3-10 (Sigma Aldrich; P1522-25ML)
- Маркер pI 4,05 (ProteinSimple; 046-029)
- Маркер pI 9,99 (ProteinSimple; 046-034)
- Смесь для определения пригодности системы (ProteinSimple; 046-027)
- Панель пептидов для определения пригодности системы (ProteinSimple; 046-026)

*Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC)*

**[0843]** AB0089 готовили в концентрации 0,5 мг/мл в 1X PBS (Gibco, № 10010-031) или в альтернативных составах. Добавляли 325 мкл в 96-луночный планшет с глубокими

лунками вместе с соответствующей холостой пробой с буфером. Термограммы получали с использованием MicroCal PEAQ DSC (Малверн, Пенсильвания). Температуру линейно повышали от 20 до 100°C со скоростью повышения 60°C/час. Исходные термограммы подвергали вычитанию фонового значения, модель базовой линии подвергали сплайн-интерполяции и данные аппроксимировали с применением модели с промежуточными состояниями.

*Прибор и реагенты для SPR*

**[0844]** Biacore 8K (ID прибора: 2222251, GE Healthcare Life Sciences) использовали для выполнения кинетических измерений, и оценочное программное обеспечение Biacore 8K Insight Evaluation использовали для анализа экспериментальных данных. Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу):

- 10 мМ ацетат натрия, pH 5,0 (Cytiva; BR100351)
- 10 мМ глицин, pH 1,7 (Boston BioProducts; BB-2413D)
- 10x HBS-EP+ (Cytiva; BR1006-69)
- 1x HBS-EP+ самостоятельно готовили в лаборатории из 10x исходного раствора
- 1x MBS-EP+, pH6,0 (готовили самостоятельно в лаборатории)
- BSA, фракция V (7,5%) (Gibco; 15260-037)
- NaCl (Fisher Scientific; S271-1)
- NaOH (Cytiva; BR100358)
- Набор для иммобилизации по аминогруппе (Cytiva; BR-1000-50)
- Набор для захвата мышиных антител (Cytiva; BR100838)
- Чип CM5 (Cytiva; 29-1496-03)
- Сенсорный чип SA серии S (Cytiva; BR-1005-31)
- Чип SA (Cytiva; BR100531)
- Набор CAPture Biotin (Cytiva; 28-9202-34)
- Козье кросс-адсорбированное вторичное антитело к Fc IgG человека (Invitrogen; 31125)
- Колонки Micro Bio-Spin 30 (Bio-Rad; 732-6223)
- Центрифужные фильтры Amicon Ultra 0,5 мл, номинальное отсечение по молекулярной массе 10000 (Millipore Sigma; UFC501096)

*Определение аффинности к CLEC12A посредством SPR*

**[0845]** Аффинности связывания AB0089 с рекомбинантным CLEC12A человека (Dragonfly Tx) измеряли посредством SPR с применением прибора Biacore 8K. Если вкратце, антитела, специфические к Fc человека, ковалентно иммобилизовали при

плотности ~8000-10000 резонансных единиц (RU) на карбоксиметилдекстрановой матрице биосенсорного чипа CM5 посредством химической иммобилизации по аминогруппе с получением чипа с IgG к hFc. Образцы AB0089 захватывали на чипе с IgG к hFc при концентрации 1,5 мкг/мл со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 60 секунд с достижением уровня захвата, составляющего примерно 150 RU. Серийно разводили hCLEC12A-His (от 100 нМ до 0,14 нМ) в трехкратных разведениях посредством подвижного буфера для SPR и вводили при скорости потока 30 мкл/мин поверх захваченных тестируемых образцов. Ассоциацию отслеживали в течение 300 секунд, а диссоциацию отслеживали в течение 600 секунд. Поверхности регенерировали между циклами посредством трех впрыскиваний 10 мМ глицина-HCl, pH 1,7, продолжительностью 20 секунд при 100 мкл/мин. HBS-EP+ (1X) с 0,1 мг/мл BSA использовали в качестве подвижного буфера на протяжении всего эксперимента. Эксперименты осуществляли при физиологической температуре 37°C. Чтобы получить кинетические константы скорости и общую аффинность связывания, данные, полученные путем сопоставления с двумя контрольными кривыми, аппроксимировали к кинетической модели с двумя состояниями с использованием оценочного программного обеспечения Biacore 8K Insight Evaluation (Cytiva). Обоснование для использования модели с двумя состояниями представлено ниже. Точность аппроксимации между аппроксимированной кривой и экспериментальными данными выражали с использованием оценочного программного обеспечения в виде $Chi^2$.

***Определение аффинности к NKG2D посредством SPR***

**[0846]** Аффинность связывания AB0089 с рекомбинантным NKG2D человека (Dragonfly Tx) измеряли посредством SPR с применением прибора Biacore 8K. Если вкратце, антитела, специфические к mFc, ковалентно иммобилизовали при плотности ~8000-10000 RU на карбоксиметилдекстрановой матрице биосенсорного чипа CM5 посредством химической иммобилизации по аминогруппе с получением чипа с IgG к mFc. Обеспечивали захват NKG2D человека, меченного mFc, на чипе с IgG к mFc при концентрации 0,2 мкг/мл, при скорости потока 10 мкл/мин в течение 60 секунд с достижением уровня захвата, составляющего примерно 30 RU. AB0089 подвергали замене буфера на буфер HBS-EP+ (1X) и серийно разводили (от 5000 нМ до 9,77 нМ) в двукратных разведениях посредством HBS-EP+. Аналит (AB0089) вводили со скоростью потока 30 мкл/мин поверх захваченных тестируемых образцов. Ассоциацию отслеживали в течение 60 секунд, а диссоциацию отслеживали в течение 60 секунд. Поверхности регенерировали между циклами посредством трех впрыскиваний 10 мМ глицина-HCl, pH 1,7, продолжительностью 20 секунд при 100 мкл/мин. HBS-EP+ (1X) использовали в

качестве подвижного буфера на протяжении всего эксперимента. Эксперименты осуществляли при физиологической температуре 37°C. Данные, полученные путем сопоставления с двумя контрольными кривыми, аппроксимировали к кинетической модели 1:1 и моделям взаимодействия в стационарном состоянии с использованием оценочного программного обеспечения Biacore 8K Insight Evaluation (GE Healthcare) с совокупной аппроксимацией в модели аппроксимации данных кинетики 1:1. Поскольку образцы подвергали замене буфера на подвижный буфер перед каждым экспериментом, то компенсации для аппроксимации в стационарном состоянии было задано постоянное значение (0). Точность аппроксимации выражали с использованием оценочного программного обеспечения в виде $Chi^2$, который учитывали в контексте значения $R_{max}$.

*Синергизм одновременного связывания CD16a и NKG2D*

**[0847]** Синергическое связывание NKG2D и CD16a оценивали посредством SPR. Отдельно hNKG2D (12,3 мкг/мл), отдельно аллель F158 CD16a (9 мкг/мл) и смесь hNKG2D и CD16a F158 в одинаковой концентрации каждого подвергали иммобилизации по аминогруппе с поверхностью чипа CM5 серии S Biacore в течение 1 минуты. 1,8 мкМ AB0089 или трастузумаба вводили в течение 150 с при 10 мкл/мин. Фазу диссоциации контролировали в течение 180 с, в случае если регенерация не требовалась, и 1800 с, в случае если требовалась естественная регенерация поверхности (практически полная диссоциация аналита) между циклами при одинаковой скорости потока. В качестве подвижного буфера и буфера для разведения образца использовали 1x буфер HBS-EP+.

*Совместное вовлечение во взаимодействие (CLEC12A и NKG2D)*

**[0848]** AB0089 разводили в 1x буфере HBS-EP+, содержащем 0,1 мг/мл BSA, и осуществляли его захват на поверхности чипа CM5 с антителом к Fc человека при скорости потока 5 мкл/мин в течение 60 с с достижением уровня захвата 150-250 RU. Регистрировали чистую разницу между базовым сигналом и сигналом после завершения введения AB0089, представляющую количество захваченного AB0089. Вводили hCLEC12A-His (200 нМ) или mFc-hNKG2D (7 мкМ) поверх захваченного AB0089 со скоростью 20 мкл/мин в течение 90 с до достижения насыщения. После этого введения немедленно следовало введение предварительно инкубированной смеси hCLEC12A-His (200 нМ) и mFc-hNKG2D (7 мкМ) со скоростью потока 20 мкл/мин в течение 90 с с использованием команды введения A-B-A в управляющем программном обеспечении Biacore 8K (вторая мишень была предварительно смешана с первой мишенью, чтобы гарантировать, что все участки связывания для первой мишени заняты). Чип регенерировали посредством двух 20-секундных впрыскиваний 10 мМ глицина (pH 1,7) при 100 мкл/мин. Эксперимент выполняли при 37°C и в качестве подвижного буфера

использовали 1x буфер HBS-EP+, содержащий 0,1 мг/мл BSA. Связывание каждого антигена, выраженное в RU, регистрировали в виде чистой разницы между базовым сигналом до и после введения каждого антигена. Среднему значению относительного коэффициента связывания каждой мишени, связанной с AB0089, не занятым другой мишенью (введенной первой), присваивали значение 1,0. Среднее значение относительной стехиометрии связывания каждой мишени, связанной с захваченным AB0089', которое уже насыщено другой мишенью (введенной второй), выражали в виде доли связывания с полной загрузкой с незанятым AB0089.

Эпитоп-специфическая сортировка

**[0849]** Антитело к CLEC12A или TriNKET непосредственно иммобилизовали на активной проточной кювете сенсорного чипа CM5 серии S посредством иммобилизации по аминогруппе при концентрации 3 мкг/мл с достижением конечной плотности 370-1070 RU. Для эпитоп-специфической сортировки использовали классический сэндвич-анализ с прогоном при 25°C. Первое введение представляло собой 120-секундную ассоциацию 200 нМ CLEC12A-His, после которой непосредственно следовало образование 200 нМ сэндвич-структуры антитело/TriNKET. Образование сэндвич-структуры антитело/TriNKET характеризовалось временем ассоциации 120 секунд и временем диссоциации 120 секунд. Как введения аналита, так и образование молекулы в виде сэндвич-структуры осуществляли при 30 мкл/мин. Для регенерации поверхности чипа после диссоциации использовали 20-секундное впрыскивание 10 мМ глицина, pH 1,7, вводимого в количестве 100 мкл/мин. Первый цикл включал введения буфера как для аналита, так и для образования молекулы в виде сэндвич-структуры. Второй цикл включал 200 нМ аналита hCLEC12A-His с последующим введением буфера для образования молекулы в виде сэндвич-структуры. Последующие циклы включали введение 200 нМ аналита hCLEC12A-His с последующим образованием 200 нМ молекулы в виде сэндвич-структуры. В ходе всего эксперимента использовали 1x буфер HBS-EP+. Сенсограммы визуализировали с использованием оценочного программного обеспечения Biacore Insight Evaluation.

Связывание FcγR

**[0850]** CD64 человека и яванского макака, высоко- и низкоаффинные аллели CD16a (V158 и F158 соответственно), два аллеля CD32a (H131 и R131), CD16b, CD32b и CD16 яванского макака иммобилизовали посредством биотина на активированном (в соответствии с инструкцией производителя) чипе Biacore. В таблице 123 сведены соответствующие уровни захвата и типы используемых чипов Biacore. Из-за необратимости взаимодействия стрептавидин-биотин стадию захвата для всех рецепторов

за исключением FcγRI (CD64) осуществляли только один раз до начала эксперимента по связыванию. Захват hCD64 и CD64 яванского макака на поверхности чипа CAP осуществляли в течение каждого цикла в соответствии с инструкциями производителя для набора Biotin CAPture.

**[0851]** Перед любым экспериментом по связыванию FcγR, требующим высокой исходной концентрации, образцы AB0089 и трастузумаба подвергали замене буфера на 1x подвижный буфер HBS-EP+ SPR путем трех последовательных циклов разведения/концентрирования с применением концентратора объемом 0,5 мл, что давало в результате > 300-кратное разведение исходных буферных компонентов с сохранением высокой концентрации белка. Концентрацию белка измеряли при длине волны 280 на приборе NanoDrop и с использованием соответствующих теоретических молярных коэффициентов экстинкции (196790 $M^{-1}см^{-1}$ для AB0089 и стандартных параметров IgG для трастузумаба).

**[0852]** Каждый эксперимент по связыванию FcγR состоял из нескольких циклов с использованием 2-кратно серийно разведенного AB0089 или трастузумаба. Холостой цикл при 0 нМ в начале каждой серии концентрирования и чип с поверхностью без рецептора использовали в качестве контроля для сопоставления. Каждый экспериментальный цикл включал стадии ассоциации, диссоциации и регенерации. Концентрации аналита (AB0089 или трастузумаб), время ассоциации и диссоциации и параметры регенерации были специфическими для FcγR (таблица 123). Все стадии выполняли при скорости потока 30 мкл/мин и при 25°C.

Таблица 123. Параметры, использованные в экспериментах по связыванию FcγR с применением SPR

| **Параметр** | **hCD64, CD64 яванского макака** | **hCD16a V158** | **hCD16a F158** | **CD16 яванского макака** | **hCD32a H131, R131** | **hCD16b** | **hCD32b** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Тип чипа | Чип CAP | Чип SA типа S | | | | | |
| Уровень захвата FcγR, RU | 35-50 | 10-27 | 10-27 | | 7-25 | 10-23 | |
| Диапазон концентраций, нМ | 400-1,56 | 1500-0,023 | 6000 – 0,023 | | 16000-125 | 24000 -188 | |

| **Параметр** | **hCD64, CD64 яванского макака** | **hCD16a V158** | **hCD16a F158** | **CD16 яванского макака** | **hCD32a H131, R131** | **hCD16b** | **hCD32b** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Тип чипа | Чип CAP | Чип SA типа S | | | | | |
| Уровень захвата FcγR, RU | 35-50 | 10-27 | 10-27 | | 7-25 | 10-23 | |
| Время ассоциации, с | 240 | 150 | | | 60 | 60 | |
| Время диссоциации, с | 600 | 300 | | | 60 | 150 | |
| Регенерация поверхности | Регенерация с использованием набора CAPture | 5-сек впрыскивание 1-2 мМ NaOH | | | | | |

**[0853]** Перед анализом образца для стабилизации поверхности чипа осуществляли серию из 2-5 холостых экспериментальных циклов с применением подходящего для эксперимента подвижного буфера вместо аналита. Исходные данные аппроксимировали к кинетической модели 1:1, либо к модели с использованием аффинности в стационарном состоянии с применением оценочного программного обеспечения Biacore Insight Evaluation. Для оценки точности аппроксимации использовали $Chi^2$ (рассчитанный с помощью программного обеспечения) в сопоставлении либо с рассчитанным $R_{max}$, либо с кажущимся ответом при максимальном связывании. Все зарегистрированные значения округляли до одного знака после запятой после расчета.

*Связывание FcRn*

**[0854]** Рекомбинантный FcRn человека или яванского макака (cyno) захватывали на поверхности чипа SA серии S в концентрации 0,25 мкг/мл в течение 1 минуты. AB0089’ и коммерческое антитело трастузумаб (в качестве контрольного IgG1 в анализе) подвергали процедуре замена буфера на MBS-EP+, pH 6,0, перед экспериментом по связыванию, определяемому посредством SPR. Каждый эксперимент по связыванию FcRn состоял из нескольких циклов с использованием разных концентраций аналитов. Использовали серию двукратных разведений (от 12 мкМ до 0,023 мкМ) AB0089 и трастузумаба. В начале каждой серии концентраций добавляли холостой цикл при 0 нМ, и при этом использовался пустой чип с поверхностью без FcRn, модифицированной посредством

иммобилизации по аминогруппе. Каждый экспериментальный цикл включал стадии ассоциации, диссоциации и регенерации. Стадия ассоциации состояла из 60-секундного введения аналита, после чего следовала 60-секундная стадия диссоциации. Каждый кинетический цикл завершала регенерация поверхности (60-секундное введение буфера HBS-EP+, pH 7,4). Все стадии выполняли при скорости потока 30 мкл/мин и при 25°C. В качестве подвижного буфера использовали буфер MBS-EP+, pH 6,0. Данные аппроксимировали к модели аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии посредством оценочного программного обеспечения Biacore Insight. Для оценки точности аппроксимации использовали $Chi^2$ (рассчитанный с помощью программного обеспечения) в сопоставлении с рассчитанным $R_{max}$. Все зарегистрированные значения округляли до одного знака после запятой.

*Анализ цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV*

**[0855]** Активность AB0089 тестировали с использованием клеток KHYG-1-CD16aV. Значения EC50 и максимального лизиса получали из кривых связывания клеток с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (четырехпараметрическая логистическая нелинейная регрессионная модель аппроксимации кривой).

*Анализ цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками*

**[0856]** Активность AB0089 тестировали с использованием первичных NK-клеток. Значения EC50 и максимального лизиса получали из кривых связывания клеток с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (четырехпараметрическая логистическая нелинейная регрессионная модель аппроксимации кривой).

*Неспецифическое связывание с полиспецифическим реагентом (PSR)*

**[0857]** 50 мкл TriNKET или контрольного mAb в концентрации 100 нМ в PBSF инкубировали с 5 мкл суспензии предварительно промытых гранул Dynabeads Protein A в течение 30 мин при комнатной температуре. Магнитные микроносители, связанные с TriNKET или mAb, отстаивали на магнитной подставке в течение 60 секунд и удаляли супернатант. Связанные гранулы промывали посредством 100 мкл PBSF. Гранулы инкубировали в течение 20 минут на льду с 50 мкл биотинилированного реагента PSR, который представлял собой 25-кратное разведение исходного раствора (Xu *et. al.*, (2013) *Protein engineering design and selection*, 26, 663-670). Образцы помещали на магнитную подставку, удаляли супернатант и промывали посредством 100 мкл PBSF. Вторичный реагент для FACS, предназначенный для выявления связывания биотинилированного реагента PSR с TriNKET или контрольными mAb, готовили следующим образом: 1:250 мкл стрептавидина-PE и 1:100 ослиного антитела к Fc человека смешивали в PBSF. К каждому образцу добавляли 100 мкл вторичных реагентов и инкубировали в течение 20

минут на льду. Гранулы дважды промывали посредством 100 мкл PBSF. Образцы анализировали на BDFACS Celesta. В анализе использовали два контроля PSR, ритуксимаб (положительный в PSR) и трастузумаб (отрицательный в PSR). Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу): PBSF (1X PBS, pH 7,4 + 0,25% BSA) (Dragonfly Tx), гранулы Dynabeads (Invitrogen; 10001D), стрептавидин-PE (Biolegend; 405204) и ослиное Ab к Fc человека (Jackson ImmunoResearch; 709-096-149).

*Анализ перекрестной реактивности High-Spec® с использованием микрочипов HuProt™*

**[0858]** Специфичность AB0089 тестировали при концентрации 0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл в отношении нативного протеома человека на микрочипе HuProt, иммобилизованного на предметных стеклах. Анализ осуществляли в лабораториях CDI (Балтимор, Мэриленд).

*Оценка иммуногенности*

**[0859]** Программу EpiMatrix от EpiVax использовали для всех расчетов в соответствии с описанным в Cohen *et al.* (2013) *Mol Cancer Ther*, 12, 2748–59.

*Молекулярное моделирование*

**[0860]** Молекулярное моделирование осуществляли с использованием веб-сайта SAbPred (opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdab/sabpred/). CLEC12A- и NKG2D-связывающие плечи сравнивали с 377 биотерапевтическими молекулами, прошедшими фазу I, с использованием вычислительного инструмента для определения профилей терапевтических антител (TAP). В TAP использовали ABodyBuilder для построения модели для AB0089 с боковыми цепями с помощью PEARS. Построение CDRH3 осуществляли посредством MODELLER, поскольку данная петля является наиболее вариабельной из всех CDR.

**[0861]** Оценивали следующие пять различных параметров.

1. Общая длина CDR
2. Зоны поверхностной гидрофобности (PSH) в непосредственной близости от CDR
3. Зоны положительного заряда (PPC) в непосредственной близости от CDR
4. Зоны отрицательного заряда (PNC) в непосредственной близости от CDR
5. Структура, симметрия заряда, параметр заряда Fv (sFvCSP) для CLEC12A-связывающего scFv и NKG2D-связывающего Fab

*Реализуемость*

*Испытание стабильности методом ускоренного (40°C) старения* в HST, pH 6,0

**[0862]** AB0089 из партии AB0089-002 концентрировали и подвергали диафильтрации в 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 6,0 (HST, pH 6,0), с применением

устройства Amicon Ultra15 30K. Концентрацию извлеченного образца определяли по поглощению при длине волны 280 и образец разбавляли до 20 мг/мл посредством буфера HST. Аликвоту 0,2 мл немедленно замораживали при -80°C в качестве контроля, а две аликвоты по 0,15 мл хранили при 40°C в темноте. Аликвоту отбирали через 2 и 4 недели и немедленно замораживали при -80°C до проведения анализа. Использовали следующие материалы/реагенты:

- Центрифужные фильтры Amicon Ultra15 (30K MWCO) (Millipore; UFC903024)
- Хлористоводородная кислота, 10 н. (RICCA; 3770-32)
- L-гистидин (MP Biomedicals; 101954)
- Гидроксид натрия, 10 н. (JT Baker; 5000-03)
- Сахароза (VWR; M117-500G)
- Tween-80 (VWR; 0442-1L)

*Испытание стабильности методом ускоренного (40°C) старения* в CST, pH 7,0

**[0863]** AB0089 из партии AB0089-002 концентрировали и подвергали диафильтрации в 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0, с применением устройства Amicon Ultra15 30K. Концентрацию извлеченного образца определяли по поглощению при длине волны 280 и образец разбавляли до 20 мг/мл посредством буфера CST. Аликвоту 0,4 мл немедленно замораживали при -80°C в качестве контроля, а четыре аликвоты по 0,15 мл хранили при 40°C в темноте. Аликвоту отбирали еженедельно и немедленно замораживали при -80°C до проведения анализа. Использовали следующие материалы/реагенты:

- Центрифужные фильтры Amicon Ultra15 (30K MWCO) (Millipore; UFC903024)
- Хлористоводородная кислота, 10 н. (RICCA; 3770-32)
- Дигидрат цитрата натрия (Fisher Chemical; S466)
- Гидроксид натрия, 10 н. (JT Baker; 5000-03)
- Сахароза (VWR; M117-500G)
- Раствор Tween-80 (10%) (Sigma: PB192-10ML)

*Принудительное окисление*

**[0864]** AB0089 из партии AB0089-002 разводили до 1 мг/мл посредством забуференного фосфатом солевого раствора (PBS). Добавляли 6,7 мкл 3% пероксида водорода к аликвоте 1,0 мл AB0089 с получением конечной концентрации 0,02% пероксида водорода. Окисление AB0089 выполняли в течение 24 часов при комнатной температуре в темноте. Через 24 часа образец подвергали замене буфера на буфер PBS, pH 7,4, с использованием устройств Amicon Ultra 0,5 мл 10K MWCO в соответствии с инструкциями производителя. Не подвергнутый окислению контроль (0,5 мл) хранили при

-80°C. Использовали следующие материалы/реагенты: 30% пероксид водорода (VWR; BDH7690-1), PBS Gibco pH 7,4 (1x) (ThermoFisher; 10010-031) и колонки для обессоливания Zeba (Thermo Scientifc; 89890).

*Стрессовое условие pH 5*

**[0865]** Концентрированное AB0089 из партии AB0089-002 разводили до 1,0 мг/мл посредством 20 мМ ацетата натрия, pH 5,0. Концентрацию подтверждали по поглощению при длине волны 280 на спектрофотометре Nanodrop One. Образец разделяли. Половину хранили при -80°C в качестве контроля, а другую половину инкубировали при 40°C в течение 2 недель. После инкубации образец хранили при -80°C до анализа. Использовали натрий-ацетатный буфер (1 М, pH 5,0) (Boston Bioproducts; BB-60).

*Стрессовое условие pH 8*

**[0866]** Концентрированное AB0089 из партии AB0089-002 разводили до 1,0 мг/мл посредством 20 мМ Tris, pH 8,3. Концентрацию подтверждали по поглощению при длине волны 280 на спектрофотометре Nanodrop One. Образец разделяли. Половину хранили при -80°C в качестве контроля, а другую половину инкубировали при 40°C в течение 2 недель. После инкубации образец хранили при -80°C до анализа. pKa Tris является зависимым от температуры. Буфер Tris, pH 8,3, измеренный при 25°C, как ожидается, будет характеризоваться pH ~8,0 при 40°C. Использовали буфер Tris (1 М, pH 8,3) (Boston Bioproducts; LT-783).

*Замораживание/оттаивание*

**[0867]** Три аликвоты по 0,1 мл 20 мг/мл AB0089 из партии AB0089-002 в буфере CST, pH 7,0, подвергали циклам замораживания/оттаивания при -80°C в контейнере из пенополистирола для замедления процесса замораживания. В циклах 2, 4 и 6 отбирали аликвоту и помещали на хранение при -80°C до проведения анализа.

*Перемешивание*

**[0868]** Аликвоты по 0,5 мл 10 мг/мл AB0089 из партии AB0089-002 в 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, pH 7,0 или 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0 добавляли в планшет с глубокими лунками (Thermo, № 278752), планшет герметично закрывали, накрывали фольгой и встряхивали при комнатной температуре при 300 об/мин в течение 3 дней. Через 3 дня планшет центрифугировали и анализировали посредством спектрофотометра по поглощению при длине волны 280 (концентрация), 340 (мутность) и посредством SEC (агрегация).

*Выдерживание при низком уровне pH*

**[0869]** AB0089 захватывали на колонке MabSelect Sure Protein A и элюировали посредством 100 мМ глицина, pH 3,0. Пиковые фракции объединяли и 12 мл элюата из

колонки с иммобилизованным белком А доводили до pH 3,3 с использованием 100 мМ глицинового буфера, pH 3,0. Элюат с откорректированным pH выдерживали при комнатной температуре. Через 1,5 часа pH элюата доводили до нейтрального значения с помощью 1,0 М Tris-HCl, pH 8,3. Образец, выдержанный при определенном pH, дополнительно очищали посредством катионообменной хроматографии. Для анализа конечный продукт подвергали замене буфера на PBS, pH 7,4, и ему присвоили название "AB0089 из партии AB0089-003".

*Высокая концентрация*

**[0870]** AB0089 из партии AB0089-002 концентрировали с использованием центрифужных фильтров с отсечением по молекулярной массе 30 кДа в PBS, pH 7,4. Концентрацию определяли по поглощению при длине волны 280 на Nanodrop и качество продукта отслеживали посредством SEC согласно описанному выше.

*Эксклюзионная хроматография (TSKgel G3000SWxl)*

**[0871]** Для оценки реализуемости образцов использовали следующий способ. 50 мкг тестируемого вещества вводили в прибор для жидкостной хроматографии при высоком давлении (HPLC) Agilent 1260 Infinity II с насосом для четырехкомпонетных смесей 1260 Quat, пробоотборником 1260 Vialsampler, 1260 VWD. Образец разделяли на колонке с гелем Tosoh TSKgel G3000SWxl, внутренний диаметр 7,8 мм x 30 см, 5 мкм. Буфер подвижной фазы для SEC представлял собой PBS, pH 7,0, пропускаемый со скоростью потока 0,50 мл/мин. Поглощение считывали как при 214, так и при 280 нм, площади пиков интегрировали вручную и регистрировали процентное содержание высокомолекулярных фракций (HMWS), низкомолекулярных фракций (LMWS) и мономера. Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу): стандарты для гель-фильтрации (Bio-Rad; 1511901), буфер для SEC (20 мМ моногидрата одноосновного фосфата натрия/гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 0,3 М хлорида натрия, pH 7,0) (Boston BioProducts; C-5194D) и колонка с гелем TSKgel G3000SWxl, 7,8 мм x 30 см, 5 мкм (Tosoh; 08541).

*Триптическое пептидное картирование посредством LC-MS/MS*

**[0872]** 50 мкг AB0089 разводили посредством 6 М гидрохлорида гуанидина в 250 мМ Tris, pH 8,5, и восстановление дисульфидных связей осуществляли посредством 25 мМ дитиотреитола в течение 30 минут при 40°C в термомешалке. Восстановленные цистеины затем алкилировали посредством 50 мМ йодацетамида в течение 60 минут при комнатной температуре в темноте. Восстановленный и алкилированный белок подвергали замене буфера на буфер из 50 мМ Tris, pH 8,0, и его расщепляли трипсином (фермент:субстрат 1:25) в течение 1 часа при 37°C. LC-MS/MS осуществляли на устройстве Thermo Vanquish

для UHPLC, соединенном с масс-спектрометром QExactive+. Если вкратце, 5 мкг гидролизата белка разделяли на колонке Waters UPLC BEH Peptide C18 (2,1 x 150 мм) в течение 150 минут с использованием градиента ацетонитрила от 2% до 40% со скоростью 0,3 мл/мин. Масс-спектры регистрировали в диапазоне 230-2000 масса/заряд в режиме детекции положительно заряженных ионов с разрешением 35000 для полного MS-сканирования и с разрешением 17500 для сканирований Top10 MS/MS. Файлы, полученные в UPLC-MS/MS, анализировали с использованием программного обеспечения Byos PTM (Protein Metrics). Пептиды идентифицировали с использованием точного поиска последовательности AB0089 по массам и в библиотеках масс-спектральных данных MS/MS. Настройки для идентификации пептидов были следующими.

- Допуск по массе предшественника – 6,00 ppm
- Допуск по массе фрагмента – 20,00 ppm
- Участок(-и) расщепления RK, C-концевой
- Специфичность ферментативного расщепления – полностью специфическое
- Пропущенные расщепления – 2
- Модификации: карбамидометил / +57,021464 @ C, фиксированная
- DTT / +151,994915 @ C
- Окисление / 15,994915 @ M, W
- Детиометил / -48,003371 @ M
- Дезамидирование / +0,984016 @ N, Q
- Пиро-Glu / -17,026549 @ N-конц., Q
- Пиро-Glu / -18,010565 @ N-конц., E
- Карбамил / +43,005814 @ N-конц., K, R
- Ацетил / +42,010565 @ Белок, N-конц.
- Потеря аммония / -17,026549 @ N
- Диоксидирование / +31,989829 @ W
- Кинуренин / +3,994915 при W
- N-гликан 50 общих

**[0873]** Использовали следующие материалы/реагенты (поставщик; номер по каталогу):

- 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (JT Baker; LC441-2.5)
- 0,1% муравьиной кислоты в воде (JT Baker; LC452-2.5)
- Муравьиная кислота (Thermo Scientific; 28905)
- Гуанидина HCl (Alfa Aesar; A13543)
- Хлористоводородная кислота, 6 н. (Avantor; 4103-01)

- Дитиотреитол в формате No-weigh (Thermo Scientific; 20291)
- Йодоацетамид в формате No-weigh (Thermo Scientific; 90034)
- Гидроксид натрия, 6 н. (Avantor; 5672-02)
- Tris-основание (Avantor; 4109-01)
- Трипсин (Thermo Scientific; 90057)
- Колонка для UPLC BEH Peptide C18 (2,1 x 150 мм) (Waters; 186003556)
- Колонки для обессоливания Zeba spin (Thermo Scientific; 89882)

**Результаты**

Обнаружение

**[0874]** Гибридомный субклон 16B8.C8 (из которого получали AB0089 с оптимизированной последовательностью и его предшественник AB0237) получали посредством иммунизации мышей BALB/c с использованием рекомбинантного человеческого белка CLEC12A-His (фиг. 104). Представлено подробное описание процедуры иммунизации, скрининга антител, оценки связывания CLEC12A, рекомбинантного и экспрессируемого на клеточной поверхности, и эпитоп-специфической сортировки.

**[0875]** В ходе оценки реализуемости AB0237 идентифицировали потенциальный участок неблагоприятной модификации, представляющей собой изомеризацию аспарагиновой кислоты, в CDRH3 CLEC12A-связывающего scFv. Попытки устранить данный потенциальный участок неблагоприятной модификации путем замены одной аминокислоты или с использованием подходов на основе целевого дрожжевого дисплея (рандомизация "DS" или "S") давали в результате низкий выход экспрессии и значительную потерю связывания с CLEC12A, что свидетельствует о том, что этот мотив может быть важным для поддержания структуры CDR. Поэтому были предприняты усилия по созреванию аффинности, направленные на оптимизацию CDRH3 и CDRH2 для дальнейшего улучшения аффинности в отношении CLEC12A, а затем последовательность DS заменяли на DT на фоне оптимизированной CDRH3. Кроме того, авторы настоящего изобретения стремились улучшить показатель гуманизации молекулы за счет уменьшения количества мышиных обратных мутаций в каркасной области. Авторы настоящего изобретения предположили, что требуется только одна обратная мутация в положении H83, тогда как другие обратные мутации не являются обязательными для сохранения структуры CDR. Оптимизированной каркасной области scFv, которая содержала одну обратную мутацию, присвоили название pET1596 и ее использовали в качестве основы для всего дальнейшего конструирования. Позже обратную мутацию (H94)K вводили обратно, чтобы обеспечить дополнительную стабилизацию молекулы. Эти усилия по

конструированию привели в результате к получению молекулы AB0089, которая сохраняла высокую аффинность в отношении CLEC12A человека и активность в отношении раковых клеточных линий AML с одновременным устранением потенциальных сайтов неблагоприятной модификации, представляющей собой изомеризацию, и улучшением показателя гуманизации.

Оптимизация последовательностей

*CDRH3-направленная рандомизированная библиотека для созревания аффинности*

**[0876]** Библиотеку дрожжевого дисплея для созревания аффинности (называемую библиотекой 17) успешно создавали путем осуществления мутаций остатков CDRH3 (YDYDDSLDY, SEQ ID NO:139) клона pET1596 в каждом положении по одному или путем замены двух аминокислотных остатков на все 20 аминокислот, как описано выше. Для обогащения scFv, которые характеризуются более высокой аффинностью к hCLEC12A в библиотеке 17, выполняли три цикла отбора с биотинилированным CLEC12A-His при концентрации 1 нМ (1-й и 2-й циклы отбора; фиг. 105A, B) и 0,1 нМ (3-й цикл отбора; фиг. 105C). Сравнивали значения аффинности между родительским клоном pET1596 и клонами из библиотеки, и их можно отличить с высокой степенью точности, что давало возможность осуществлять количественный отбор в реальном времени (фиг. 105 B, C, D). После 3 циклов сортировки посредством FACS для выделения клонов один клон, который содержал 2 отличия по аминокислотам по сравнению с родительским клоном (**G**DY**G**DSLDY) (SEQ ID NO:322), проявлял более высокую аффинность связывания в отношении CLEC12A по сравнению с родительским клоном (фиг. 105D, E).

*CDRH3-направленная комбинаторная библиотека для созревания аффинности*

**[0877]** Результаты CDRH3-направленной библиотеки продемонстрировали улучшение аффинности, однако дальнейшее улучшение было крайне необходимым. В связи с этим библиотеку 30 создавали путем встраивания комбинаторной библиотеки CDRH2 (от WSGGK (SEQ ID NO:138) до XSGGK (SEQ ID NO:323), WXGGK (SEQ ID NO:324), WSXGK (SEQ ID NO:325), WSGXK (SEQ ID NO:326), WSGGX (SEQ ID NO:327), XXGGK (SEQ ID NO:328), XSXGK (SEQ ID NO:329), XSGXK (SEQ ID NO:330), XSGGX (SEQ ID NO:331), WXXGK (SEQ ID NO:332), WXGXK (SEQ ID NO:333), WXGGX (SEQ ID NO:334), где X = любая аминокислота) в оптимизированный каркас CDRH3. Цель состояла в том, чтобы разработать и выбрать связывающие молекулы с лучшей аффинностью, чем у исходного клона (pET1596) или CDRH3-оптимизированного варианта. За счет этого получили библиотеку с рандомизированной CDRH2 при сохранении фиксированной CDRH3. Для обогащения высокоаффинными связывающими

молекулами в данной библиотеке дрожжевого дисплея для созревания аффинности (библиотеке 30) осуществляли два цикла сортировки посредством FACS (фиг. 106).

**[0878]** После 2 циклов сортировки посредством FACS один клон с изменениями в CDRH2 от WSGGK (SEQ ID NO:138) до W<u>V</u>GG<u>A</u> (SEQ ID NO:272) на фоне CDRH3 <u>G</u>DY<u>G</u>DSLDY (SEQ ID NO:322) характеризовался наиболее высокой аффинностью в отношении CLEC12A (фиг. 107). Данный клон продемонстрировал значительное улучшение аффинности в отношении CLEC12A по сравнению с родительскими pET1596 и AB0237.

*Устранение потенциального сайта неблагоприятных модификаций DS в последовательности*

**[0879]** После идентификации клона с созревшей аффинностью использовали сайт-направленный мутагенез для получения рационального варианта (CDRH3: от GDYGD<u>**S**</u>LDY (SEQ ID NO:322) до GDYGD<u>**T**</u>LDY (SEQ ID NO:273)), в результате чего получили CLEC12A-нацеливающийся scFv, который не содержит потенциальных сайтов неблагоприятных модификаций, представляющих собой изомеризацию, сохраняя при этом высокую аффинность связывания с мишенью. Сравнение CDR оптимизированной молекулы AB0089 и AB0237 показано в таблице 124.

Таблица 124. Сравнение CDR, связывающих CLEC12A, в AB0089 и AB0237

| **TriNKET** | **CDRH1** | **CDRH2** | **CDRH3** |
|---|---|---|---|
| AB0237 | GFSLTNY (SEQ ID NO:137) | WSGGK (SEQ ID NO:138) | YDYDDSLDY (SEQ ID NO:139) |
| AB0089 | GFSLTNY (SEQ ID NO:137) | W<u>**V**</u>GG<u>**A**</u> (SEQ ID NO:272) | <u>**G**</u>DY<u>**G**</u>D<u>**T**</u>LDY (SEQ ID NO:273) |

**[0880]** Отличия последовательностей, полученные в результате созревания аффинности, подчеркнуты. Коррекция потенциальных сайтов неблагоприятных модификаций, представляющих собой изомеризацию, полученная выполненная посредством сайт-направленного мутагенеза (от DS до DT), показана зеленым.

**[0881]** На основе структурного моделирования авторы настоящего изобретения решили повторно ввести мышиный остаток в положение H94, чтобы обеспечить дополнительную поддержку структуре CDR. AB0089 содержит только 2 мышиных остатка в положениях H83 и H94 в VH CLEC12A-связывающего scFv, тогда как в AB0237 имеются 5 мышиных обратных мутаций. Остальные обратные мутации ревертировали в остаток исходной человеческой зародышевой линии, за счет улучшается показатель гуманизации AB0089 (таблица 125).

Таблица 125. Мышиные обратные мутации в каркасных областях антител AB0089 и AB0237

| **Цепь** | **AB0089** | **AB0237** |
|---|---|---|
| VH | | (H71)K |
| VH | (H83)Q | (H83)Q |
| VH | (H94)K | (H94)K |
| VL | | (L70)R |
| VL | | (L83)I |

Молекулярный формат и дизайн

**[0882]** AB0089 представляет собой гетеродимерное трифункциональное антитело, которое перенаправляет активность NK- и T-клеток в отношении CLEC12A-экспрессирующих раковых клеток. AB0089 содержит три цепи: цепь H, цепь L и цепь S. Схематическое представление молекулы AB0089 представлено на фиг. 108. Цепь H представляет собой тяжелую цепь A49M-I, NKG2D-нацеливающего антитела, которое было выбрано из-за того, что оно характеризуется низкой аффинностью, но при этом является мощным агонистом рецепторов NKG2D на NK- и цитотоксических T-клетках. Мутацию M-I вводили для устранения остатка Met102 в CDRH3, который чувствителен к окислению, а следовательно может сообщать предрасположенность к потенциальной неблагоприятной модификации. Цепь L представляет собой легкую цепь антитела A49M-I, нацеливающегося на NKG2D. Цепь S содержит scFv, который с высокой аффинностью связывается с CLEC12A на раковых клетках AML. Оба домена scFv и Fab слиты с Fc IgG1 человека. Обе цепи несут несколько мутаций в домене CH3, введенных для обеспечения стабильной гетеродимеризации двух мономеров Fc. В Fc IgG1 AB0089 имеется семь таких мутаций: три мутации в цепи H и четыре мутации в цепи S. Две из этих мутаций вовлечены в образование стабилизирующего мостика S-S (Y349C и S354C) между цепями H и цепью S (номенклатура согласно EU). scFv (ориентация VH-VL) в цепи S стабилизирован двумя мутациями, обеспечивающими введение мостика S-S ((H44)C и (L100)C, номенклатура согласно Chothia). Цепь S также содержит неиммуногенный линкер $(G_4S)_4$ между VH и VL scFv. Аминокислотная последовательность CLEC12A-нацеливающегося scFv основана на последовательности гуманизированного антитела 16B8.C8, полученного из гибридомы (Green Mountain Antibodies). Аминокислотная последовательность Fab к NKG2D основана на полностью человеческом антителе A49M-I, полученном с применением технологии дрожжевого дисплея для белков человека (Adimab).

*Аминокислотная последовательность*

**[0883]** Аминокислотные последовательности трех полипептидных цепей, составляющих AB0089, показаны ниже. CDR определены с использованием номенклатуры согласно Chothia и представлены в таблице 126. С-концевой K, обычно процессируемый и расщепляемый в IgG1, удален в цепи S и цепи H для предотвращения гетерогенности.

**[0884]** **Цепь S:** CLEC12A-нацеливающийся scFv-CH2-CH3 (гуманизированная последовательность, CDR выделены курсивом, обратные мутации подчеркнуты двойной линией, сконструированный сайт образования дисульфидного мостика в scFv обозначен строчными буквами, а мутации в Fc для обеспечения гетеродимеризации и сконструированный дисульфидный мостик между CH3 подчеркнуты одной линией).

**[0885]** QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS***GFSLTNY***GLHWIRQPPGK**c**LEWIGVI***WV GGA***TDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV**Q**AADTAVYYCA**K**_K_***GDYGDTLDY***WGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***HASQNINFWL S***WYQQKPGKAPKLLIY***EASNLHT***GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QQSHS YPLT***FG**c**GTKLEIKGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG (SEQ ID NO:276)

**[0886]** **Цепь H:** NKG2D-нацеливающийся VH-CH1-CH2-CH3 (полностью человеческий, CDR выделены курсивом, мутации в Fc для обеспечения гетеродимеризации и сконструированный дисульфидный мостик между CH3 подчеркнуты).

**[0887]** EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS***GFTFSSY***SMNWVRQAPGKGLEWVSSI***S SSSSY***IYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR***GAPIGAAAGWFDP*** WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:260)

**[0888]** **Цепь L:** VL-CL (полностью человеческий, CDR выделены курсивом), нацеливающийся на NKG2D.

**[0889]** DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC***RASQGISSWLA***WYQQKPGKAPKLLIY***AASS LQS***GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QQGVSFPRT***FGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:261)

Таблица 126. Последовательности CDR AB0089

| **AB0089** | **Вариабельная область** | **Каркасная область** | **CDR1** | **CDR2** | **CDR3** |
|---|---|---|---|---|---|
| Цепь S | VH | VH4-59 | GFSLTNY (SEQ ID NO:137) | WVGGA (SEQ ID NO:272) | GDYGDTLDY (SEQ ID NO:273) |
| Цепь S | VL | VK1-12 | HASQNINFW LS (SEQ ID NO:140) | EASNLH T (SEQ ID NO:141) | QQSHSYPLT (SEQ ID NO:142) |
| Цепь H | VH | VH3-21 | GFTFSSY (SEQ ID NO:297) | SSSSY (SEQ ID NO:298) | GAPIGAAAGWF DP (SEQ ID NO:97) |
| Цепь L | VL | VK1-2 | RASQGISSWL A (SEQ ID NO:86) | AASSLQ S (SEQ ID NO:77) | QQGVSFPRT (SEQ ID NO:87) |

CDR идентифицированы согласно Chothia

*Анализ потенциальных участков неблагоприятных модификаций в CDR*

**[0890]** Цепь L (NKG2D-связывающая легкая цепь) не содержит прогнозируемых участков неблагоприятных модификаций. Цепь H (NKG2D-связывающая тяжелая цепь) содержит DP в CDRH3. На этот мотив не оказывает влияние принудительное разложение (как и в других конструкциях, данные для которых не показаны). Соответственно, эта последовательность не была изменена в AB0089. Цепь S (CLEC12A-связывающая цепь scFv-Fc) не содержит прогнозируемых участков неблагоприятных модификаций.

*Описание мутаций, касающихся гетеродимеризации*

**[0891]** Для аннотирования аминокислотных остатков в Fc использовалось соглашение о нумерации согласно EU.

Цепь H содержит следующие мутации:

K360E – мутация, обеспечивающая гетеродимеризацию, в домене CH3 Fc-области.

K409W – мутация, обеспечивающая гетеродимеризацию, в домене CH3 Fc-области.

Y349C – мутация, обеспечивающая стабилизацию дисульфидных связей между субъединицами, в домене CH3 Fc-области.

**[0892]** Мутации K360E/K409W в Fc-области цепи H предназначены для обеспечения взаимодействий, способствующих предпочтительному образованию гетеродимеров, с цепью S за счет гидрофобной/стерической комплементарности, а также электростатических взаимодействий дальнего действия (Choi *et al.*, (2013) *Mol Cancer Ther*, 12, 2748–59; Choi *et al.*, (2015) *Mol Immuno*l, 65, 377–83). Мутацию Y349C вводили для образования дополнительной межцепочечной дисульфидной связи, представленной парой Y349C-(CH3-цепь-H) – S354C(CH3-цепь-S) (Choi *et al.*, (2015) *Mol Immuno*l, 65, 377–83).

Цепь S содержит следующие мутации:

G44C – мутация, обеспечивающая стабилизацию дисульфидной связи в области $V_H$ scFv.

S100C – мутация, обеспечивающая стабилизацию дисульфидной связи в области $V_L$ scFv.

Q347R – мутация, обеспечивающая гетеродимеризацию, в домене CH3 Fc-области.

D399V – мутация, обеспечивающая гетеродимеризацию, в домене CH3 Fc-области.

F405T – мутация, обеспечивающая гетеродимеризацию, в домене CH3 Fc-области.

S354C – мутация, обеспечивающая стабилизацию дисульфидных связей между субъединицами, в домене CH3 Fc-области.

**[0893]** Мутации G44C и S100C вводили для стабилизации scFv за счет сконструированной дисульфидной связи между VH и VL. Стабилизация дисульфидной связи улучшает структурную и термическую стабильность scFv. Мутации Q347R/D399V/F405T в Fc-области цепи S были предназначены для обеспечения взаимодействий, способствующих предпочтительному образованию гетеродимеров, с цепью H за счет гидрофобной/стерической комплементарности, а также электростатических взаимодействий дальнего действия (Choi *et al*, (2013) *Mol Cancer Ther*, 12, 2748–59). Мутацию S354C вводили для образования дополнительной дисульфидной связи между CH3, представленной парой Y349C(CH3-цепь-H) – S354C(CH3-цепь-S) (Choi *et al*, (2015) *Mol Immuno*l, 65, 377–83).

**[0894]** Гетеродимеризация цепи H и цепи S основана на пяти мутациях, так называемых EW-RVT, с парами взаимодействий K409W(CH3A) – D399V/F405T(CH3B) (получившая название пара W-VT) и K360E(CH3A) – Q347R(CH3B) (получившая пара ER), которые были разработаны для замены консервативных электростатических взаимодействий на асимметричные гидрофобные взаимодействия и с добавлением

асимметричных электростатических взаимодействий дальнего действия на краю гетеродимерной области контакта CH3 соответственно (Choi *et al.*, (2013) *Mol Cancer Ther*, 12, 2748–59). Подробный анализ гетеродимерной области контакта CH3A-CH3B выявил незначительное количество структурных нарушений, возникающих в результате мутаций в области контакта, по сравнению с нативным Fc IgG1 (фиг. 109). Конформации остова и боковой цепи остатков, примыкающих к мутациям области контакта в Fc-EW-RVT, являются почти такими же, как в Fc-WT, за исключением замен боковых цепей мутированных остатков (фиг. 109A). Остатки пар мутаций W-VT, т. е. K409W(CH3A)–D399V(CH3B)/F405T(CH3B), располагались в непосредственной близости друг от друга, образуя комплементарные контакты чаще всего в скрытых контактах CH3A–CH3B (фиг. 109B), что предполагает то, что пары W-VT усиливают гидрофобную зону контакта между CH3A–CH3B путем образования оптимальных гидрофобных взаимодействий. Остатки пары мутации E-R K360ECH3A–Q347RCH3B располагались достаточно близко при 3,45 Å, чтобы образовать солевой мостик, в отличие от пары K-Q дикого типа (4,61 Å) (фиг. 109C), способствуя предпочтительному образованию гетеродимера за счет сильных электростатических взаимодействий. Таким образом, мутированные остатки, введенные в Fc-EW-RVT, образуют нековалентные взаимодействия в зоне контакта CH3A-CH3B, способствуя предпочтительному образованию гетеродимера без значительных структурных нарушений в общей структуре домена CH3.

**[0895]** По своей структуре остатки пары W-VT (K409W(CH3A) – D399V(CH3B)/F405T(CH3B)) и остатки пары E-R (K360E(CH3A) – Q347R(CH3B)) расположены в гетеродимерной зоне контакта CH3 с образованием асимметричных комплементарных гидрофобных взаимодействий и электростатических взаимодействий при 3,45 Å соответственно, которые способствуют предпочтительному образованию гетеродимера. С другой стороны, образование соответствующего гомодимера было термодинамически невыгодным из-за стерического столкновения между остатками 409WCH3A и F405CH3A, а также отталкивающих электростатических взаимодействий между остатками 347R(CH3B) и K360(CH3B). Потеря остатков электростатического взаимодействия дикого типа K409WT–D39WT также препятствует образованию гомодимера. Дополнительная стабилизация гетеродимера привносится вариантом EW-RVT(S-S), связанным дисульфидной связью между CH3, с мутациями Y349C(CH3A) и S354C(CH3B) (фиг. 110). Структура Fc-EW-RVT(S-S) была описана посредством рентгеноструктурного анализа при разрешении 2,5 Å (Choi *et al.*, (2015) *Mol Immuno*l, 65, 377–83) и была очень сходной с известными структурами IgG1.

Структурное моделирование

**[0896]** В отсутствие кристаллической структуры для сравнения создавали структурные модели вариабельных сегментов плеч, связывающих CLEC12A и NKG2D. Построение модели осуществляли с использованием веб-сайта SAbPred (opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdab/sabpred/).

*Анализ распределения поверхностного заряда и гидрофобных зон для CLEC12A-связывающего плеча AB0089*

**[0897]** На фиг. 111 демонстрируется представленная в виде ленточной диаграммы модель CLEC12A-связывающего scFv в трех различных ориентациях (верхняя панель) и их соответствующее распределение поверхностного заряда для той же ориентации (нижняя панель). Распределение заряда scFv антитела к CLEC12A является поляризованным ("вид сверху", нижняя панель) с отрицательно заряженными остатками, включенными преимущественно в CDRH3 и CDRL2. Неравномерное распределение электростатических зон на паратопе очевидно связано с мишенью и отражает комплементарность распределения заряда на его родственном эпитопе, что может способствовать высокоаффинному взаимодействию между CLEC12A и scFv AB0089.

**[0898]** На фиг. 112 показаны результаты анализа длины CDR и зон поверхностной гидрофобности CLEC12A-нацеливающегося плеча AB0089. Анализы осуществляли с применением профилей терапевтических антител (TAP): opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdab/sabpred/tap. При этом сравнивается кандидат относительно 377 терапевтических антител, исследуемых на поздней стадии их испытания. Длины CDR для CLEC12A-связывающего плеча AB0089 находятся в пределах нормального диапазона для терапевтических антител на поздней стадии их испытания. Анализ гидрофобных зон CDR антитела дает возможность прогнозировать его реализуемость. Теоретические гидрофобные свойства CLEC12A-связывающего плеча AB0089 находятся в пределах нормы производимых в промышленных масштабах биотерапевтических препаратов и терапевтических антител-кандидатов, исследуемых на поздней стадии их испытания.

**[0899]** На фиг. 113 показаны результаты анализов зон, содержащих положительные и отрицательные заряды, а также симметрия этих зарядов относительно областей CDR. Все три графика показывают, что распределения заряда находятся в пределах нормы по сравнению с популяцией терапевтических антител.

*Распределение поверхностного заряда и анализ гидрофобных зон NKG2D-связывающего плеча AB0089*

**[0900]** NKG2D-связывающий Fab показан на ленточных диаграммах с тремя разными ориентациями (фиг. 114, верхняя панель), и представлено их соответствующее распределение поверхностного заряда одинаковой ориентации (фиг. 114, нижняя панель). Поверхностный заряд на NKG2D-связывающем плече распределяется более равномерно, чем заряды на CLEC12A-нацеливающемся плече.

**[0901]** На фиг. 115 показаны результаты анализов длины CDR и зон поверхностной гидрофобности NKG2D-нацеливающегося плеча AB0089. Очевидно, длина CDR, гидрофобные свойства и распределение положительных/отрицательных зарядов находятся в пределах нормы существующих терапевтических антител.

**[0902]** На фиг. 116 показаны результаты анализов зон, содержащих положительные и отрицательные заряды, а также симметрия этих зарядов относительно областей CDR. Все три графика показывают, что распределения заряда находятся в пределах нормы по сравнению с популяцией терапевтических антител.

*Оценка каркасной области*

**[0903]** CLEC12A-связывающее плечо AB0089 было обнаружено посредством иммунизации мышей. Каркасные области, выбранные для пересаживания CDR, часто применяются в терапевтических моноклональных антителах, исследуемыми на стадии их клинического испытания (фиг. 117). NKG2D-связывающее плечо является полностью человеческим, создано на основе каркасной области, часто применяемой в mAb на продвинутой стадии, и не содержит каких-либо необычных остатков или отклонений от зародышевой линии.

Прогнозирование иммуногенности

**[0904]** Белковые последовательности трех цепей AB0089 исследовали в отношении присутствия потенциально иммуногенных Т-клеточных эпитопов с применением алгоритма EpiMatrix и ранжировали потенциал иммуногенности (фиг. 118). Для AB0089 получены благоприятные показатели по шкале иммуногенности белка с поправкой на Treg. Показатель иммуногенности белка по шкале EpiMatrix с поправкой на Treg для последовательностей трех цепей AB0089 составлял -33,39 (цепь H), -27,13 (цепь S) и -23,49 (цепь L) (таблица 127). Прогнозируемый риск иммуногенности для AB0089 оценивается как низкий.

Таблица 127. Анализ иммуногенности EpiVax для AB0089

| Последовательность белка | Длина | Хиты в EpiMatrix | Показатель EpiMatrix | Показатель Epx с поправкой на Treg |
|---|---|---|---|---|
| AB0089_ЦЕПЬ_H | 451 | 207 | 5,99 | -33,39 |
| AB0089_ЦЕПЬ_L | 214 | 98 | 11,17 | -23,49 |
| AB0089_ЦЕПЬ_S | 472 | 202 | -2,96 | -27,13 |

Экспрессия

**[0905]** Экспрессия AB0089 достигалась с применением способа очистки с использованием платформы Dragonfly Tx для F3' TriNKET. Вкратце, AB0089 экспрессировали путем временной трансфекции клеток Expi293 и ExpiCHO с помощью трех плазмид, кодирующих NKG2D-нацеливающуюся легкую цепь (цепь L), NKG2D-нацеливающуюся тяжелую цепь IgG (цепь H) и CLEC12A-нацеливающийся слитый scFv-Fc (цепь S). Для экспрессии как в Expi293, так и в ExpiCHO, цепь S: цепь H: цепь L трансфицировали при соотношении плазмид 4:1:1, чтобы максимизировать процент требуемого гетеродимерного продукта. Это соотношение было получено эмпирически на основе предыдущих гуманизированных TriNKET и не было специально оптимизировано для AB0089.

Очистка

**[0906]** Очистку AB0089 осуществляли с использованием способов очистки на основе платформы для F3' TriNKET, разработанной Dragonfly Therapeutics (фиг. 119). Данную процедуру очистки ранее использовали для материала, экспрессируемого в клеточных культурах Expi293, ExpiCHO и CHO-M, в отношении множества разных TriNKET. Не проводили какой-либо оптимизации или обширной процедуры очистки AB0089. Использовали двухстадийную процедуру очистки.

**[0907]** Две партии AB0089 получали во временно трансфицированных клетках ExpiCHO и Expi293. В таблице 128 представлены сводные данные по титру и чистоте конечного продукта для обеих партий. Очистка AB0089 из партии AB0089-002, экспрессированного в ExpiCHO, подробно описана ниже.

Таблица 128. Сводные данные по очистке AB0089

| Партия | Хозяин для экспрессии | Титр, мг/л | Чистота, %-ое содержание мономера |
|---|---|---|---|
| AB0089-001 | Expi293 | 16,8 | > 99 |

| Партия | Хозяин для экспрессии | Титр, мг/л | Чистота, %-ое содержание мономера |
|---|---|---|---|
| AB0089-002 | ExpiCHO | 68,3 | > 99 |

*Захват посредством белка A*

**[0908]** AB0089 экспрессировали в линии клеток ExpiCHO, как это описано выше. Примерно 5,7 л отфильтрованного супернатанта загружали в колонку с иммобилизованным белком A. Скорость потока при загрузке составляла 10 мл/мин (298 см/ч.; время нахождения 3,3 минуты). Выход на стадии захвата составлял примерно 752 мг. На фиг. 120 показана хроматограмма стадии захвата.

**[0909]** Согласно SEC-анализу элюат из колонки с иммобилизованным белком A содержит главным образом требуемые гетеродимерные фракции AB0089 (примерно 88,8%), которые элюируются в момент времени 23,4 мин (фиг. 121). Примеси включают HMW-агрегаты и очень небольшое количество LMW.

**[0910]** Анализ посредством SDS-PAGE раствора, загружаемого в колонку с белком A, проточной фракции и элюата демонстрирует, что захват AB0089 был полным, основываясь на отсутствии полосы AB0089 в образце проточной фракции. Дорожка, соответствующая элюату из колонки с иммобилизованным белком A, демонстрирует главным образом TriNKET с дополнительными полосами, соответствующими пикам HMW и LMW, выявленными посредством SEC (фиг. 122).

*Катионообменная хроматография*

**[0911]** Элюат из колонки с иммобилизованным белком A далее очищали посредством катионообменной хроматографии с использованием колонки Poros XS (диаметр 1,2 см x длина 20 см) при скорости потока 7 мл/мин (371 см/ч.; время нахождения 3,2 минуты). Продукт начинали элюировать с 15% подвижной фазы B, когда проводимость достигала примерно 20 мСм/см (фиг. 123). Анализ посредством SDS-PAGE элюированных фракций демонстрировал присутствие продукта высокой чистоты в первых пяти фракциях (фиг. 124). Пики концевых фракций исключали из пула продуктов IEX, поскольку SDS-PAGE указывает на присутствие контаминирующих белков, связанных с продуктом.

**[0912]** Фракции IEX концентрировали с получением в результате примерно 401 мг очищенного AB0089. Объединенные фракции подвергали замене буфера на PBS с pH 7,4 посредством диализа. Выход AB0089 после замены буфера составлял примерно 391 мг при конечной концентрации 9,66 мг/мл (AB0089 из партии AB0089-002). Показатели выхода и извлечения для AB0089 из партии AB0089-002 сведены в таблицу 129.

Таблица 129. Показатели выхода и извлечения в процессе очистки AB0089 и замены буфера

| **Стадия** | **Общий белок (мг)** | **Извлечение на стадии (%)** | **Общее извлечение (%)** |
|---|---|---|---|
| MabSelect SuRe, захват | 752 | NA | NA |
| POROS XS, заключительная очистка | 401 | 53 | 53 |
| После замены буфера | 391 | 98 | 52 |

NA: не применимо

*Определение характеристик AB0089 из партии AB0089-002, используемого в исследовании на яванском макаке*

**[0913]** Всесторонне определяли характеристики AB0089 из партии AB0089-002, предназначенной для использования в исследованиях на яванском макаке, в отношении чистоты, идентичности, связывания с мишенями и активности. Все тестированные критерии соответствовали спецификации.

*Чистота, определенная посредством SDS-PAGE*

**[0914]** SDS-PAGE образца готового продукта продемонстрировал, что основные полосы соответствовали ожидаемой молекулярной массе для AB0089 как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях (фиг. 125).

*Чистота, определенная посредством аналитической SEC (Superdex 200)*

**[0915]** SEC-анализ очищенного AB0089 из партии AB0089-002 показал 100%-ое содержание мономера, как определено посредством интегрированной площади пика (фиг. 126).

*Анализ идентичности по массе интактного антитела*

**[0916]** Идентичность AB0089 (партия AB0089-002) подтверждали посредством масс-спектрометрии (фиг. 127). Анализ посредством LC-MS интактного AB0089 продемонстрировал наблюдаемую массу (126130,0 Да), которая хорошо согласуется с теоретической массой 126129,1 Да. Основной наблюдаемый паттерн гликозилирования (G0F/G0F) является типичным для Fc-содержащей молекулы, экспрессируемой в клетках CHO.

*Определение содержания эндотоксинов*

**[0917]** Уровень содержания эндотоксинов в антителе AB0089 конечной партии AB0089-002 составлял 0,259 ЕЭ/мг. Все параметры анализа соответствовали спецификации.

Биохимические и биофизические свойства

**[0918]** Характеристики AB0089 определяли посредством SEC, CE, cIEF, HIC и DSC для подтверждения того, что оно характеризуется надлежащей чистотой и обладает характеристиками предварительной реализуемости, присущими качественному биологическому терапевтическому средству.

*Чистота*

**[0919]** Чистоту AB0089 определяли посредством CE-SDS (фиг. 128). В невосстанавливающих условиях образование основных примесей индуцируется способом получения (свободная легкая цепь и TriNKET – LC). В восстанавливающих условиях выявляют 3 ожидаемые цепи (цепь LC, HC и scFv-Fc). Результаты анализа чистоты антитела AB0089 из партии AB0089-002 посредством SEC, NR и R CE-SDS сведены в таблице 130.

Таблица 130. Результаты анализа чистоты антитела AB0089 посредством SEC и CE-SDS

| **Тестируемый образец** | **SEC** | | | **NR CE-SDS** | **R CE-SDS** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **HMW (%)** | **Мономер (%)** | **LMW (%)** | **Чистота (%)** | **Чистота (%)** |
| AB0089 | ND | 100 | ND | 98,9 | 98,0 |

ND: не выявлено

*Экспериментальная pI и профиль заряда, определенные посредством cIEF*

**[0920]** Профиль заряда AB0089 анализировали посредством cIEF (фиг. 129). AB0089 продемонстрировало основной пик при pI 8,52 ± 0,0. Также наблюдаются несколько менее распространенных, перекрывающихся пиков кислых вариантов и второстепенных пиков основных вариантов.

*Оценка гидрофобности посредством HIC*

**[0921]** Гидрофобные свойства AB0089 оценивали посредством HIC (фиг. 130, таблица 131). Хроматограмма показала один узкий пик, указывающий на высокую чистоту и гомогенность молекулы. Время удерживания в HIC-анализе составило 10,2 минуты, что находится в диапазоне коммерческих моноклональных антител с типичными характеристиками (8,9-13,5 минут, данные не показаны).

Таблица 131. Результаты оценки гидрофобности AB0089 посредством HIC Humira используется в качестве внутреннего контроля mAb к IgG1 с надлежащими характеристиками.

| **Тестируемый образец** | **Время удерживания в HIC-анализе (мин)** |
|---|---|
| AB0089 | 10,2 |

| Тестируемый образец | Время удерживания в HIC-анализе (мин) |
|---|---|
| Humira | 8,9 |

*Оценка термической стабильности посредством DSC*

**[0922]** Термическую стабильность AB0089 оценивали посредством DSC в нескольких буферах (PBS, pH 7,4, HST, pH 6,0, CST, pH 7,0). AB0089 продемонстрировало высокую термостабильность во всех протестированных буферах (фиг. 131). Значение $T_m1$, соответствующее развертыванию scFv, удовлетворяло критериям ≥ 65°C, используемым в оценке термостабильности (таблица 132).

Таблица 132. Результаты термической стабильности AB0089, определенной посредством DSC

| Тестируемый образец | Буфер | $T_{начала}$ (°C) | $T_{m1}$ (°C) | $T_{m2}$ (°C) | $T_{m3}$ (°C) | $T_{m4}$ (°C) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089 | PBS, pH 7,4 | 64,0 | 71,8 | 76,7 | 81,3 | 83,4 |
| AB0089 | HST, pH 6,0 | 61,2 | 69,0 | 78,7 | 84,3 | 86,3 |
| AB0089 | CST, pH 7,0 | 64,7 | 72,4 | 77,1 | 82,2 | 84,2 |

*Размещение дисульфидной связи*

**[0923]** AB0089 представляет собой молекулу, сконструированную на основе остова моноклонального антитела IgG1. В то время как типичный IgG1 содержит 16 дисульфидных связей, формат F3' AB0089 имеет только 15 дисульфидных связей. Половина AB0089 представляет собой полуантитело к NKG2D, поскольку оно содержит ожидаемые семь дисульфидных связей (по одной в каждом домене IgG и межмолекулярная дисульфидная связь, соединяющая LC с HC). Другая половина AB0089 представляет собой слитый scFv-Fc, связывающий CLEC12A. scFv содержит три дисульфидные связи (по одной в каждом домене VH и VL антитела к CLEC12A и сконструированную стабилизирующую дисульфидную связь, соединяющую вариабельные домены), и Fc содержит две ожидаемых дисульфидных связи в доменах IgG. Гетеродимер ковалентно ассоциирован с двумя нативными дисульфидами шарнирного участка IgG1 и одним дополнительным межмолекулярным сконструированным дисульфидом, соединяющим Fab-Fc с scFv-Fc в домене CH3. Вместе

это дает в результате 15 ожидаемых дисульфидных связей в AB0089. Прогностическая карта дисульфидов для AB0089 показана на фиг. 132.

**[0924]** Связность дисульфидной связи AB0089 подтверждали посредством анализа пептидного картирования с использованием LC-MS/MS гидролизата в невосстанавливающих условиях. Пептиды, связанные дисульфидной связью, идентифицировали посредством поиска в базе данных MS/MS и подтверждали посредством сравнения их интенсивности в нативном гидролизате и гидролизате в восстанавливающих условиях. При ферментативном расщеплении трипсином VL и сконструированные пары дисульфидов соединены длинным пептидом, содержащим 2 цистеина (три пептида, соединенных двумя дисульфидными связями, S7:S36:S22), что не выявляют в данных, полученных посредством LC-MSMS. Для выявления стабилизирующего дисульфида сконструированного scFv AB0089 расщепляли как трипсином, так и химотрипсином. На фиг. 133 показана экстракционная ионная хроматограмма (XIC) для сконструированной дисульфидной пары в scFv (в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях) и наиболее интенсивное зарядовое состояние для этой пептидной пары. Дисульфидную пару в VL не выявили при двойном ферментативном расщеплении трипсином/химотрипсином, очевидно, потому, что она является слишком маленькой и гидрофильной, чтобы ее можно было удержать на колонке. Все другие дисульфиды идентифицировали после ферментативного расщепления только трипсином, включая сконструированный мостик S-S, введенный для стабилизации гетеродимеризации Fc (фиг. 134).

**[0925]** Сводные данные о выявленных пептидах, связанных дисульфидными связями, в AB0089 показаны в таблице 133. Все выявленные пептиды, связанные дисульфидными связями, характеризовались высокой точностью определения масс (< 4 ppm), были восстанавливаемыми, и их последовательность подтверждалась посредством фрагментации MS/MS.

Таблица 133. Теоретические и экспериментальные массы пептидов, связанных дисульфидными связями

| **Домен** | **Триптический пептид** | **Теоретическая масса (Да)** | **Экспериментальная масса (Да)** | **Точность определения масс (ppm)** |
|---|---|---|---|---|
| VL | L2:L7 | 4482,0784 | 4482,0786 | 0,4 |
| CL | L12:L19 | 3555,749 | 3555,755 | 1,8 |

| Домен | Триптический пептид | Теоретическая масса (Да) | Экспериментальная масса (Да) | Точность определения масс (ppm) |
|---|---|---|---|---|
| Межмолекулярный CL-CH1 | L20-21:H19 | 1260,4863 | 1260,4861 | -0,3 |
| VH | H3:H10 | 3371,4686 | 3371,4666 | 2,5 |
| CH1 | H13:H14-15 | 7916,9194 | 7916,9282 | 1,5 |
| Шарнирный участок | H20-21:S17-18 | 5454,7834 | 5454,7905 | 1,5 |
| CH2 | H23:H30 | 2328,0977 | 2328,1018 | 1,8 |
| Межмолекулярный CH3-CH3[a] | H36:S34-35 | 2757,383 | 2757,3855 | 1,6 |
| CH3 | H37:H41 | 4432,0675 | 4432,0687 | 0,3 |
| VH scFv | S1-2:S8 | 5828,907 | 5828,9052 | -0,1 |
| Стабилизирующий scFv[a] | S7:S36[b] | 1011,4154 | 1011,4188 | 3,4 |
| VL scFv | S10-11:S14 | Не выявлено | | |
| CH2 | S20:S27 | Не являющийся уникальным, см. H23:H30 | | |
| CH3 | S36:S41 | 3844,8236 | 3844,8284 | 1,2 |

[a]Сконструированный дисульфид; [b]Двойное ферментативное расщепление трипсином/химотрипсином

Характеристики связывания

*Аффинность связывания с CLEC12A человека*

**[0926]** Аффинность AB0089 к CLEC12A человека определяли посредством SPR при 37°C. AB0089 с высокой аффинностью связывается с CLEC12A человека (фиг. 135 и таблица 134). Однако связывание демонстрирует гетерогенность и не соответствует типичным кинетическим параметрам связывания 1:1. В эксперименте, описанном ниже и на фиг. 136, установили механизм связывания согласно модели с двумя состояниями и обосновали применение модели с двумя состояниями для аппроксимации данных. Аналогичные кинетические параметры согласно модели с двумя состояниями выявили для CLEC12A-связывающего плеча теподитамаба (Merus).

Таблица 134. Кинетические параметры и аффинность связывания AB0089 с hCLEC12A

| **Тестируемый образец** | $k_{a1}$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | $k_{d1}$ **($c^{-1}$)** | $k_{a2}$ **($c^{-1}$)** | $k_{d2}$ **($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|
| AB0089 | $1{,}09 \times 10^{7}$ | $4{,}26 \times 10^{-2}$ | $3{,}41 \times 10^{-3}$ | $7{,}28 \times 10^{-4}$ | 0,69 |
| AB0089 | $1{,}06 \times 10^{7}$ | $4{,}49 \times 10^{-2}$ | $3{,}49\times 10^{-3}$ | $7{,}48 \times 10^{-4}$ | 0,75 |
| AB0089 | $1{,}02 \times 10^{7}$ | $4{,}32 \times 10^{-2}$ | $3{,}45 \times 10^{-3}$ | $7{,}41 \times 10^{-4}$ | 0,75 |
| AB0089 | $9{,}99 \times 10^{6}$ | $4{,}32 \times 10^{-2}$ | $3{,}39 \times 10^{-3}$ | $7{,}49 \times 10^{-4}$ | 0,78 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(1{,}04\pm0{,}03)\times10^{7}$** | **$(4{,}35\pm0{,}12)\times10^{-2}$** | **$(3{,}43\pm0{,}04)\times10^{-3}$** | **$(7{,}41\pm0{,}10)\times10^{-4}$** | **0,74±0,04** |

**[0927]** Модель связывания с двумя состояниями предполагает две стадии связывания, которые определяются двумя наборами кинетических констант:

1. образование исходного комплекса CLEC12A-AB0089;
2. переход исходного комплекса в более стабильный конечный комплекс.

$$A + B \underset{k_{d1}}{\overset{k_{a1}}{\rightleftarrows}} AB \underset{k_{d2}}{\overset{k_{a2}}{\rightleftarrows}} AB^{*}$$

**[0928]** Данный механизм подразумевает, что более длительные периоды времени ассоциации в эксперименте SPR приводили бы к более высокому соотношению более стабильного комплекса на поверхности и более медленной кажущейся скорости диссоциации. Как AB0089, так и молекула на основе теподитамаба характеризуются кажущейся скоростью диссоциации, зависящей от времени ассоциации, что подтверждает модель взаимодействия с двумя состояниями (фиг. 136).

*Связывание с CLEC12A+ изогенными и раковыми клеточными линиями*

**[0929]** Оценку связывания AB0089 с изогенными клеточными линиями, экспрессирующими CLEC12A, и раковыми клетками AML отслеживали посредством FACS (фиг. 137, таблица 135). AB0089 продемонстрировало высокую аффинность в отношении CLEC12A, экспрессируемого на клеточной поверхности, и связывает клеточные линии PL-21 и HL-60 AML с EC50, составляющей менее 1 нМ. Специфичность AB0089 в отношении CLEC12A была продемонстрирована отсутствием связывания с родительскими Ba/F3 клетками, которые не экспрессируют эту мишень.

Таблица 135. Связывание AB0089 с изогенными и раковыми линиями клеток, экспрессирующими CLEC12A

| Клеточная линия | EC50 (нМ) |
|---|---|
| Ba/F3-hCLEC12A | 4,02 |
| Родительская Ba/F3 | Связывание отсутствует |
| PL21 | 0,45 |
| HL-60 | 0,74 |

*Аффинность связывания с полиморфным вариантом CLEC12A (Q244) человека*

**[0930]** Полиморфный вариант CLEC12A (Q244) распространен у 30% населения. Авторы настоящего изобретения протестировали связывание AB0089 с данным генетическим вариантом посредством SPR и сравнили его аффинность с основной формой CLEC12A (K244) (фиг. 138). Значения аффинности связывания AB0089 с вариантами WT и Q244 CLEC12A были сходными (таблица 136). Также тестировали связывание AB0089 с CLEC12A яванского макака (cCLEC12A). Не выявили связывание при концентрации 100 нМ, что свидетельствует о том, что AB0089 не обладает перекрестной реактивностью с CLEC12A яванского макака.

Таблица 136. Кинетические параметры и аффинность связывания AB0089 с вариантами (K244) и (Q244) CLEC12A человека

| Тестируемый образец | Мишень | $k_{a1}$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_{d1}$ ($c^{-1}$) | $k_{a2}$ ($c^{-1}$) | $k_{d2}$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089 | hCLEC12A (K244) WT | (1,63±0,51) $\times 10^{7}$ | (3,98±0,14) $\times 10^{-2}$ | (2,95±0,06) $\times 10^{-3}$ | (9,62±0,00) $\times 10^{-4}$ | 0,60 ± 0,26 |
| AB0089 | hCLEC12A (Q244) | (9,70±0,45) $\times 10^{6}$ | (3,53±0,13) $\times 10^{-3}$ | (2,67±0,06) $\times 10^{-3}$ | (1,25±0,02) $\times 10^{-3}$ | 1,17 ± 0,00 |

*Связывание с дифференциально гликозилированным CLEC12A*

**[0931]** CLEC12A человека представляет собой высокогликозилированный белок (6 потенциальных участков N-гликозилирования с внеклеточным доменом (ECD), состоящим из 201 аминокислоты). Вариации статуса гликозилирования CLEC12A на поверхности различных типов клеток описаны в литературе (Marshall *et al.*, (2006) *Eur. J. Immunol.*, 36: 2159-2169). CLEC12A, экспрессируемый на поверхности клеток AML у разных пациентов, также может иметь разные паттерны гликозилирования. Чтобы определить, связывается ли AB0089 с различными гликозилированными вариантами CLEC12A человека, антиген обрабатывали нейраминидазой (для удаления концевых сиаловых кислот) или PNGазой-F (для удаления N-связанных гликанов) и аффинность

сравнивали с необработанным CLEC12A посредством SPR (фиг. 139 и таблица 137). AB0089 связывалось как с полностью гликозилированным, так и с дегликозилированным CLEC12A, и предполагается, что на него не повлияет гетерогенность состава целевого гликана.

Таблица 137. Кинетические параметры и аффинность связывания AB0089 с дифференциально гликозилированным CLEC12A

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_{a1}$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | $k_{d1}$ **($c^{-1}$)** | $k_{a2}$ **($c^{-1}$)** | $k_{d2}$ **($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089 | Необработанный CLEC12A | $(1{,}63\pm0{,}05)\times10^{7}$ | $(3{,}98\pm0{,}01)\times10^{-2}$ | $(2{,}95\pm0{,}06)\times10^{-3}$ | $(9{,}62\pm0{,}00)\times10^{-4}$ | 0,60 ± 0,26 |
| AB0089 | Десиалилированный CLEC12A | $(2{,}09\pm0{,}21)\times10^{7}$ | $(3{,}29\pm0{,}18)\times10^{-2}$ | $(3{,}04\pm0{,}06)\times10^{-3}$ | $(8{,}63\pm0{,}24)\times10^{-4}$ | 0,35 ± 0,47 |
| AB0089 | Дегликозилированный CLEC12A | $(8{,}96\pm0{,}86)\times10^{6}$ | $(6{,}33\pm0{,}28)\times10^{-3}$ | $(4{,}09\pm0{,}13)\times10^{-3}$ | $(5{,}67\pm0{,}10)\times10^{-4}$ | 0,09 ± 0,01 |

Среднее значение для 3 повторов

*Аффинность связывания с NKG2D человека*

**[0932]** AB0089 тестировали в отношении связывания с ECD NKG2D человека посредством SPR (Biacore) при 37°C (фиг. 140). NKG2D по своей природе является димером, поэтому для данного эксперимента использовали рекомбинантный димер NKG2D, меченный mFc. Форма сенсограмм связывания, показанных на фиг. 140, дала возможность использовать две разные модели аппроксимации для расчета данных аффинности и кинетических констант скорости: аппроксимация с использованием аффинности в стационарном состоянии и аппроксимация данных кинетики 1:1. Кинетические константы и значения равновесной аффинности показаны в таблице 138. AB0089 было разработано для связывания с NKG2D человека с низкой аффинностью, но что наиболее важно с высокой скоростью диссоциации. Константа скорости диссоциации составляла 1,43 ± 0,03 x $10^{-1}$ $c^{-1}$. Значения аффинности ($K_D$), полученные путем аппроксимации данных посредством моделей аппроксимации с использованием аффинности в стационарном состоянии и аппроксимации данных кинетики 1:1, были очень сходными: 881 ± 10 нМ и 884 ± 11 нМ соответственно, что указывает на высокую достоверность в измеренных параметрах.

Таблица 138. Кинетические параметры и аффинность связывания AB0089 с NKG2D человека

| **Тестируемый образец** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики** | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации в стационарном состоянии** |
|---|---|---|---|---|
| AB0089 | $1,61 \times 10^5$ | $1,41 \times 10^{-1}$ | 872 | 873 |
| AB0089 | $1,59 \times 10^5$ | $1,42 \times 10^{-1}$ | 892 | 894 |
| AB0089 | $1,66 \times 10^5$ | $1,46 \times 10^{-1}$ | 880 | 885 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(1,62 \pm 0,03) \times 10^5$** | **$(1,43 \pm 0,03) \times 10^{-1}$** | **881 ± 10** | **884 ± 11** |

*Аффинность связывания с CD16a (FcγRIIIa)*

**[0933]** Один из механизмов действия AB0089 заключается в вовлечении во взаимодействие CD16a (FcγRIIIa) человека, который экспрессируется на NK-клетках, посредством его Fc. Связывание AB0089 с CD16a (аллель V158) оценивали посредством SPR и сравнивали с аффинностью CD16a (V158) к трастузумабу, одобренному коммерческому моноклональному терапевтическому антителу того же изотипа IgG1 (фиг. 141, таблица 139). Связывание AB0089 с CD16a сопоставимо со связыванием трастузумаба. Маловероятно, что разница в 3,8 раза в аффинности будет иметь физиологические последствия, а также повлияет на терапевтический эффект AB0089, поскольку последний основан на синергии одновременного вовлечения во взаимодействие двух мишеней на NK-клетках – CD16 и NKG2D. Кроме того, несколько более слабое связывание с CD16a также может способствовать безопасности лекарственного средства.

Таблица 139. Кинетические параметры и аффинность связывания AB0089 с hCD16a (V158)

| **Тестируемый образец** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|
| AB0089 | $8,76 \times 10^4$ | $2,94 \times 10^{-2}$ | 336 |
| AB0089 | $7,70 \times 10^4$ | $2,64 \times 10^{-2}$ | 343 |
| AB0089 | $8,46 \times 10^4$ | $2,72 \times 10^{-2}$ | 321 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(8,31 \pm 0,55) \times 10^4$** | **$(2,77 \pm 0,16) \times 10^{-2}$** | **333 ± 11** |

| **Тестируемый образец** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|
| Трастузумаб | $1{,}31 \times 10^5$ | $1{,}12 \times 10^{-2}$ | 86 |
| Трастузумаб | $1{,}22 \times 10^5$ | $1{,}08 \times 10^{-2}$ | 89 |
| Трастузумаб | $1{,}30 \times 10^5$ | $1{,}13 \times 10^{-2}$ | 87 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(1{,}28 \pm 0{,}05) \times 10^5$** | **$(1{,}11 \pm 0{,}03) \times 10^{-2}$** | **87 ± 1** |

*Связывание с рецепторами Fcγ*

**[0934]** Поскольку AB0089 является кандидатным биологическим лекарственным средством, полученным из IgG1, то важно, чтобы оно сохраняло соответствующие свойства связывания с Fc-рецептором. SPR-данные свидетельствуют о том, что AB0089 связывает рецепторы Fcγ человека и яванского макака со значениями аффинности, сопоставимыми с трастузумабом – коммерческим биологическим препаратом на основе IgG1, который служил в качестве экспериментального контроля (таблица 140). Подробное описание связывания каждого отдельного рецептора представлено ниже.

Таблица 140. Сводные данные по значениям аффинности AB0089 и трастузумаба к FcγR человека и яванского макака

| **Рецептор Fcγ** | **AB0089, $K_D$ (нМ)** | **Трастузумаб, $K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|
| hFcγRI | 5,1 ± 1,0 | 2,9 ± 0,4 |
| cFcγRI | 1,5 ± 0,3[a] | 1,0 ± 0,1 |
| H131 hFcγRIIa | 900,4 ± 57,1 | 1045,1 ± 62,2 |
| R131 hFcγRIIa | 1253,3 ± 269,2 | 1493,2 ± 265,9 |
| V158 hFcγRIIIa | 333,4 ± 11,1 | 87,1 ± 1,4 |
| F158 hFcγRIIIa | 1271,0 ± 24,6 | 331,4 ± 3,3 |
| cFcγRIII[a] | 348,8 ± 2,4 | 128,8 ± 2,1 |
| hFcγRIIb | 6270,3 ± 1164,4 | 6270,3 ± 1031,7 |
| hFcγRIIIb[a] | 8851,3 ± 1454,4 | 3872,4 ± 486,3 |

[a]n = 3, в остальном n = 4

*Связывание AB0089 с рекомбинантным CD64 (FcγRI) человека и яванского макака*

**[0935]** На фиг. 142 и фиг. 143 изображено связывание AB0089 с CD64 человека и яванского макака соответственно. В таблице 141 продемонстрировано, что AB0089 связывает рекомбинантный CD64 человека и яванского макака со значениями аффинности, сопоставимыми (разница в менее чем два раза) с трастузумабом.

Таблица 141. Связывание AB0089 и трастузумаба с CD64 человека и яванского макака

| **FcγRI человека** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|
| AB0089 из партии AB0089-002 | $4,4 \times 10^4$ | $1,8 \times 10^{-4}$ | 6,4 |
| AB0089 из партии AB0089-002 | $4,6 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^{-4}$ | 4,7 |
| AB0089 из партии AB0089-002 | $4,6 \times 10^4$ | $1,9 \times 10^{-4}$ | 4,1 |
| AB0089 из партии AB0089-002 | $4,6 \times 10^4$ | $2,4 \times 10^{-4}$ | 5,2 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(4,6 \pm 0,1) \times 10^4$** | **$(2,3 \pm 0,4) \times 10^{-4}$** | **5,1 ± 1,0** |
| Трастузумаб | $9,0 \times 10^4$ | $2,3 \times 10^{-4}$ | 2,5 |
| Трастузумаб | $8,6 \times 10^4$ | $2,1 \times 10^{-4}$ | 2,5 |
| Трастузумаб | $8,3 \times 10^4$ | $2,7 \times 10^{-4}$ | 3,2 |
| Трастузумаб | $8,8 \times 10^4$ | $2,8 \times 10^{-4}$ | 3,2 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(8,1 \pm 0,0) \times 10^4$** | **$(2,5 \pm 0,3) \times 10^{-4}$** | **2,9 ± 0,4** |
| **FcγRI яванского макака** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
| AB0089 из партии AB0089-002 | $5,5 \times 10^4$ | $8,1 \times 10^{-5}$ | 1,5 |
| AB0089 из партии AB0089-002 | $5,4 \times 10^4$ | $9,5 \times 10^{-5}$ | 1,8 |
| AB0089 из партии AB0089-002 | $5,5 \times 10^4$ | $6,6 \times 10^{-5}$ | 1,2 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(5,5 \pm 0,0) \times 10^4$** | **$(8,1 \pm 1,5) \times 10^{-5}$** | **1,5 ± 0,3** |
| Трастузумаб | $1,3 \times 10^5$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | 1,1 |
| Трастузумаб | $1,3 \times 10^5$ | $1,2 \times 10^{-4}$ | 0,9 |
| Трастузумаб | $1,3 \times 10^5$ | $1,1 \times 10^{-4}$ | 0,8 |
| Трастузумаб | $1,3 \times 10^5$ | $1,3 \times 10^{-4}$ | 1,0 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(1,3 \pm 0,1) \times 10^5$** | **$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$** | **1,0 ± 0,1** |

*Связывание AB0089 с рекомбинантным CD32a (FcγRIIa) человека*

**[0936]** На фиг. 144 и фиг. 145 изображено связывание AB0089 и трастузумаба с CD32a (аллели H131 и R131) соответственно, протестированное посредством SPR. Отсутствовало значимое отличие между значениями аффинности обоих аллелей к AB0089 и трастузумабу (таблица 142).

Таблица 142. Связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным CD32a (FcγRIIa) человека

| **Тестируемый образец** | **$K_D$ (нМ)** | |
|---|---|---|
| | **H131 FcgRIIa** | **R131 FcgRIIa** |
| AB0089 (партия AB0089-002) | 953,6 | 1335,7 |
| AB0089 (партия AB0089-002) | 822,8 | 1024,1 |
| AB0089 (партия AB0089-002) | 930,1 | 1598,0 |
| AB0089 (партия AB0089-002) | 895,0 | 1055,3 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **900,4 ± 57,1** | **1253,3 ± 269,2** |
| Трастузумаб | 1069,2 | 1488,2 |
| Трастузумаб | 953,1 | 1381,0 |
| Трастузумаб | 1090,2 | 1862,1 |
| Трастузумаб | 1068,0 | 1241,4 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **1045,1 ± 62,2** | **1493,2 ± 265,9** |

*Связывание AB0089 с CD16a (FcγR3a) человека и CD16 (FcγR3) яванского макака*

**[0937]** В данном документе представлено подробное описание связывания AB0089 с высокоаффинным CD16a (V158). Связывание AB0089 с аллелем F158 CD16a человека и CD16 яванского макака представлено в таблице 143, фиг. 146 и фиг. 147. Связывание AB0089 с рекомбинантным CD16a человека (аллели V158 и F158) и CD16 яванского макака сопоставимо с коммерческим биологическим лекарственным средством на основе IgG1 трастузумабом. Маловероятно, что разница в 2,3-3,8 раза в аффинности в отношении белков CD16 между AB0089 и трастузумабом будет иметь физиологические последствия, а также повлияет на терапевтический эффект, поскольку последний основан на синергии вовлечения во взаимодействие двух мишеней на NK-клетках (CD16a и NKG2D). Небольшая разница в кажущихся ответах при максимальном связывании между трастузумабом и AB0089 обусловлена разницей в молекулярной массе. Кроме того, некоторые повторы могут проявлять небольшую изменчивость кажущихся ответов при максимальном связывании, вызванную небольшой вариацией уровней захвата рецепторов. Следует обратить внимание, что хотя форма сенсограмм, представляющих связывание с аллелем F158 CD16a человека, допускает аппроксимирование взаимодействий как к моделям в стационарном состоянии, так и кинетическим моделям 1:1, по ретроспективным причинам использовали модель аппроксимации с использованием аффинности (в стационарном состоянии).

Таблица 143. Связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным аллелем F158 CD16a человека и CD16a яванского макака

| **Тестируемый образец** | **FcγRIIIa F158 человека $K_D$ (нМ)** | **FcγRIII яванского макака $K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|
| AB0089 (AB0089-002) | 1250,9 | 351,3 |
| AB0089 (AB0089-002) | 1250,6 | 346,7 |
| AB0089 (AB0089-002) | 1282,2 | 348,3 |
| AB0089 (AB0089-002) | 1300,4 | |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **1271,0 ± 24,6** | **348,8 ± 2,4** |
| Трастузумаб | 332,3 | 127,1 |
| Трастузумаб | 326,6 | 128,1 |
| Трастузумаб | 333,8 | 131,1 |
| Трастузумаб | 333,1 | |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **331,4 ± 3,3** | **128,8 ± 2,1** |

*Связывание AB0089 с CD32b (FcγR2b) человека*

**[0938]** На фиг. 148 изображено связывание с AB0089 и трастузумаба с CD32b, протестированное посредством SPR. Отсутствовало значимое отличие между значениями аффинности CD32b к AB0089 и трастузумабу (таблица 144).

Таблица 144. Связывание AB0089 и трастузумаба с CD32b (FcγR2b)

| **Тестируемый образец** | **$K_D$ (мкМ)** |
|---|---|
| AB0089 (партия AB0089-002) | 7,1 |
| AB0089 (партия AB0089-002) | 5,3 |
| AB0089 (партия AB0089-002) | 5,3 |
| AB0089 (партия AB0089-002) | 7,4 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **6,3 ± 1,2** |
| Трастузумаб | 7,1 |
| Трастузумаб | 5,6 |
| Трастузумаб | 5,2 |
| Трастузумаб | 7,2 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **6,3 ± 1,0** |

*Связывание AB0089 с CD16b (FcγR3b) человека*

**[0939]** На фиг. 149 изображено связывание AB0089 и трастузумаба с CD16b, протестированное посредством SPR. AB0089 связывает CD16b (FcγR3b) человека

аналогично трастузумабу (таблица 145). Маловероятно, что разница в 2,3 раза в аффинности к рецептору будет иметь физиологическое значение.

Таблица 145. Связывание AB0089 и трастузумаба с рекомбинантным CD16b (FcγR3b) человека

| **Тестируемый образец** | **$K_D$ (мкМ)** |
|---|---|
| AB0089 (партия AB0089-002) | 10,3 |
| AB0089 (партия AB0089-002) | 8,8 |
| AB0089 (партия AB0089-002) | 7,4 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **8,9 ± 1,5** |
| Трастузумаб | 4,3 |
| Трастузумаб | 3,9 |
| Трастузумаб | 3,4 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **3,9 ± 0,5** |

*Связывание с FcRn*

**[0940]** На фиг. 150 и фиг. 151 изображено связывание AB0089 с FcRn человека и яванского макака соответственно, протестированное посредством SPR. Значения аффинности AB0089 к FcRn человека и яванского макака сходны с такими значениями у трастузумаба, коммерческого биологического препарата на основе IgG1, который служил в качестве экспериментального контроля (таблица 146).

Таблица 146. Сводные данные по значениям аффинности AB0089 и трастузумаба к FcRn человека и яванского макака

| **FcRn** | **AB0089, $K_D$ (мкМ)** | **Трастузумаб, $K_D$ (мкМ)** |
|---|---|---|
| hFcRn, pH 6,0 | 1,1 ± 0,1 | 1,7 ± 0,2 |
| cFcRn, pH 6,0[a] | 1,0 ± 0,1 | 1,5 ± 0,1 |

[a]n = 3, в остальном n = 4

*Одновременное вовлечение во взаимодействие AB0089 с CD16a и NKG2D*

**[0941]** AB0089 представляет собой трехфункциональный биологический препарат на основе IgG с двумя механизмами связывания с NK-клетками: связывание CD16a достигается за счет Fc, а связывание NKG2D достигается за счет Fab A49M-I. Оба взаимодействия важны для оптимальной цитотоксической активности AB0089. Чтобы продемонстрировать синергизм совместного вовлечения в связывание CD16a человека и связывания NKG2D человека авторы настоящего изобретения провели эксперимент с использованием SPR, в котором они качественно сравнивали связывание AB0089 с NKG2D, CD16a и смешанными NKG2D-CD16a на поверхностях чипов Biacore. Аффинность AB0089 к NKG2D человека и CD16a человека является низкой в отношении

обеих данных мишеней, однако одновременное связывание с обеими мишенями дает в результате эффект авидности, который проявляется в более медленной скорости диссоциации. Таким образом, AB0089 может авидно вовлекать во взаимодействие CD16a и NKG2D (фиг. 152).

*Совместное вовлечение во взаимодействие CLEC12A и NKG2D*

**[0942]** Чтобы определить, препятствует ли связывание одной мишени связыванию другой мишени с AB0089 последовательно вводили CLEC12A и NKG2D поверх AB0089, захваченного на чипе SPR с IgG к hFc (фиг. 153). Сенсограммы связывания мишени демонстрируют, что статус занятости домена CLEC12A не препятствует связыванию NKG2D (фиг. 153, верхняя панель) и наоборот (фиг. 153, нижняя панель). Подобие форм соответствующих участков сенсограммы, изображающих связывание каждой мишени со свободным AB0089 и AB0089, который был насыщен другой мишенью, позволяет предположить, что статус занятости мишенью молекулы AB0089 не оказывал значимого влияния на кинетические параметры. Например, форма участка, соответствующего связыванию CLEC12A, на сенсограммах является сходной на обеих панелях. Следует обратить внимание, что насыщающая концентрация NKG2D должна была поддерживаться на протяжении всего эксперимента, представленного на нижней панели, ввиду высокой скорости диссоциации данной мишени. Кроме того, отсутствие какого-либо влияния на относительную стехиометрию связывания каждой мишени (по сравнению со связыванием с незанятым AB0089) означает полную независимость участков связывания NKG2D и CLEC12A на AB0089 (таблица 147). Таким образом, AB0089 может успешно обеспечивать одновременное совместное вовлечение во взаимодействие опухолевого антигена и NKG2D-нацеливающегося плеча.

Таблица 147. Относительная стехиометрия связывания AB0089 в отношении CLEC12A и NKG2D

Стехиометрию связывания выражают относительно связывания каждой мишени с незанятым захваченным AB0089.

| | **CLEC12A,** относительная стехиометрия связывания | **NKG2D,** относительная стехиометрия связывания |
|---|---|---|
| Мишень связана с AB0089, которое незанято другой мишенью (вводили первой) | 1,00 | 1,00 |

| | **CLEC12A,** относительная стехиометрия связывания | **NKG2D,** относительная стехиометрия связывания |
|---|---|---|
| Мишень связана с AB0089, которое насыщено другой мишенью (вводили второй) | 1,16 ± 0,02 | 1,16 ± 0,06 |

*Эпитоп-специфическая сортировка*

**[0943]** Авторы настоящего изобретения сравнивали связываемый эпитоп для AB0089 в сравнении с AB0237, AB0192 и тремя CLEC12A-связывающими референтными TriNKET с использованием SPR. cFAE-A49. Теподитамаб основано на CLEC12A-связывающем плече молекулы от Merus (WO_2014_051433_A1), cFAE-A49. CLL1-Merus получено на основе клона 4331 от Merus (WO_2014_051433_A1) и cFAE-A49. h6E7 получено на основе mAb h6E7 от Genentech (h6E7) (US_2016_0075787_A1). Взаимодействие AB0089 с hCLEC12A блокировалось AB0237 и двумя контрольными молекулами, представляющими собой cFAE-A49. CLL1-Merus и cFAE-A49. Теподитамаб, но не молекула на основе Genentech-h6E7 (фиг. 154), дает основание предположить, что связываемый эпитоп для AB0089 перекрывается с эпитопом для теподитамаба. Результаты показали, что и AB0089, и AB0237 имеют один и тот же эпитоп. Данная область узнавания антитела отличается от AB0192, которое дополнительно перекрестно конкурирует с cFAE-A49.h6E7.

*Активность*

**[0944]** Активность AB0089 тестировали посредством анализа цитотоксичности с использованием KHYG-1-CD16aV, линии NK-клеток, сконструированной для стабильной экспрессии CD16aV и NKG2D (фиг. 155 и таблица 148). AB0089 продемонстрировало активность в субнаномолярном диапазоне в отношении лизиса клеток HL60 и PL-21 AML. Кроме того, AB0089 активно усиливает цитотоксический лизис клеток PL21 AML, опосредованный очищенными человеческими первичными NK-клетками, значительно превосходя по эффективности соответствующие моноклональные антитела (фиг. 156 и таблица 149). Дополнительная оценка цитотоксичности AB0089 подробно описана в примере 18.

Таблица 148. Активность AB0089 в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV, с клетками HL60 и PL21.

| **Раковая клетка** | **EC50 (нМ)** | **Макс. уничтожение (%)** |
|---|---|---|
| HL60 | 0,27 | 111 |

| Раковая клетка | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|
| PL21 | 0,16 | 83 |

Таблица 149. Активность AB0089 в цитотоксическом уничтожении клеток PL21, опосредованном первичными NK-клетками

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|
| AB0089 | 0,35 | 20 |
| AB0305 – родительское mAb | 1,85 | 5 |

*Специфичность*

*Неспецифическое связывание, оцененное посредством PSR*

**[0945]** Для оценки специфичности AB0089 выполняли анализ с использованием PSR на основе проточной цитометрии, в котором измеряют связывание с препаратом на основе мембранных белков клеток CHO, солюбилизированных детергентом (фиг. 157). Было продемонстрировано, что анализ с использованием PSR коррелирует с ортогональными анализами специфичности, такими как хроматография перекрестного взаимодействия и твердофазный иммуноферментный анализ с использованием бакуловирусных частиц. Характеристики, полученные в данных анализах, тесно связаны с растворимостью антител и клиренсом *in vivo*, поэтому они служат прогностическим фактором надлежащей технологичности (Xu *et al.*, (2013) *Protein engineering design and selection*, 26, 663-670). AB0089 продемонстрировало профиль, который в высокой степени подобен профилю у контроля с низким показателем в анализе с использованием PSR (трастузумаб), что свидетельствует о высокой специфичности и отсутствии неспецифического связывания с неродственными белками (фиг. 157B). Ритуксимаб использовали в качестве положительного контроля для анализа специфичности связывания с использованием PSR.

*Оценка специфичности AB0089 посредством микрочипа HuProt™*

**[0946]** Для непосредственной оценки специфичности AB0089 авторы настоящего изобретения разработали технологию на основе белкового микрочипа. Микрочип протеома человека HuProt™ предоставляет самую большую базу данных индивидуально очищенных полноразмерных человеческих белков на одном предметном стекле для микроскопа. Массив, состоящий из 22000 полноразмерных человеческих белков, экспрессировали в дрожжах *S. cerevisiae*, очищали и затем наносили в двух параллелях на предметное стекло в виде микрочипа, что дает возможность определять профили тысяч взаимодействий посредством высокопроизводительного способа. На фиг. 158 показано относительное связывание (Z-показатель) AB0089 при 1 мкг/мл с CLEC12A человека по

сравнению с микрочипом полного протеома человека. В целях сравнения были также представлены 24 основных белка с остаточным фоновым связыванием с AB0089. В таблице 150 представлены Z- и S-показатели для AB0089 в отношении CLEC12A человека и 6 основных белков из микрочипа. S-показатель представляет собой разницу между Z-показателем для указанного белка и для следующего в одном ряду с ним. Основываясь на критериях Z- и S-показателей, AB0089 продемонстрировало высокую специфичность по отношению к CLEC12A человека и отсутствие нецелевого связывания в анализе с использованием протеома человека HuProt™.

Таблица 150. Сводные данные по основным хитам, полученным посредством микрочипа HuProt™

| **Название** | **Место в ряду** | **ID белка** | **Z-показатель** | **S-показатель** |
|---|---|---|---|---|
| hCLEC12A | 1 | hCLEC12A | 150,61 | 146,120 |
| RPLP0 | 2 | JHU16464.P173H05 | 4,49 | 0,051 |
| POLR2E | 3 | JHU02080.P189F02 | 4,44 | 0,57 |
| RPRD1A | 4 | JHU16457.P173E09 | 3,86 | 0,01 |
| ZNF608 | 5 | JHU13018.P136G04 | 3,85 | 0,10 |
| ECDHDC1 | 6 | JHU25034.P240F11 | 3,75 | 0,06 |
| BC089418 | 7 | JHU16002.P168E09 | 3,70 | 0,12 |

Оценка реализуемости

**[0947]** Стабильность и принудительное разложение AB0089 оценивали в следующих условиях:

- Испытание стабильности методом ускоренного (40°C) старения
  - 20 мг/мл AB0089 в составе HST, pH 6,0 (20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 6,0), 40°C, 4 недели (SEC, SPR, активность, CE-SDS, пептидная карта).
  - 20 мг/мл AB0089 в CST, pH 7,0 (20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0), 40°C, 4 недели (SEC, SPR, активность, CE-SDS, пептидная карта).
- Химическая стабильность
  - Окисление: 1 мг/мл AB0089 в PBS с 0,02% пероксида водорода, комнатная температура, 24 часа (SEC, CE-SDS, SPR, активность, пептидная карта).
  - pH 8,0: 1 мг/мл AB0089 в 20 мМ Tris, 40°C, 2 недели (cIEF, SPR, активность, пептидная карта).

- pH 5,0: 1 мг/мл AB0089 в 20 мМ ацетата натрия, 40ºC, 2 недели (cIEF, SPR, активность, пептидная карта).

- Технологичность
  - Замораживание/оттаивание: 20 мг/мл AB0089 в 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0 (SEC, SDS-CE)
  - Перемешивание: 10 мг/мл AB0089 в 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0 (SEC, SDS-CE)
  - Высокая концентрация: > 150 мг/мл, PBS (SEC, A280).
  - Выдерживание при низком уровне pH (имитация условий стадии очистки от вирусов в процессе производства): pH 3,3, 1,5 часа, элюат ProA (SEC); полностью очищенное антитело AB0089 (cIEF, CE-SDS, SPR, активность)
  - Выдерживание при низком уровне pH (для исследования изомеризации): полностью очищенное AB0089 разводили элюирующим буфером ProA и доводили pH до 3,5. Образец выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре, нейтрализовали посредством Tris-буфера и подвергали замене буфера на буфер PBS, pH 7,4, перед дальнейшим анализом (SEC, cIEF, CE-SDS, SPR, активность, пептидная карта).

*Испытание стабильности методом ускоренного (40ºC) старения*

**[0948]** Для оценки стабильности AB0089 молекулу выдерживали при концентрации белка 20 мг/мл при 40°C в течение 4 недель в двух разных буферных условиях: (1) в 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,01% PS-80, pH 6,0 (HST) и (2) в 20 мМ цитрата, 250 мМ сахарозы, 0,01% PS-80, pH 7,0 (CST). Стабильность в обоих буферах оценивали посредством SEC, CE, SPR и активности.

*Стабильность в HST, pH 6,0*

**[0949]** AB0089 продемонстрировало высокую стабильность после 4 недель инкубации в HST, pH 6,0, при 40°C. При этом посредством SEC не выявили какой-либо агрегации и минимального снижения содержания мономера (1,6%) (фиг. 159 и таблица 151). Выявление минимальной фрагментации выполняли посредством CE-SDS R (фиг. 160 и таблица 152). Кроме того, отсутствовала значимая разница в количестве фракции активного соединения, значениях кинетики или аффинности связывания в отношении hCLEC12A, hNKG2D и hCD16a между контрольными и подвергнутыми стрессовому условию образцами (фиг. 161 и таблица 153). И наконец, не выявили значимой разницы в активности между контрольным и подвергнутыми стрессовому условию образцами (фиг. 162 и таблица 154).

Таблица 151. Результаты SEC-анализа AB0089 после 2 и 4 недель инкубации при 40°C в HST, pH 6,0

| **Тестируемый образец** | **Мономер (%)** | **LMWS (%)** | **HMWS (%)** |
|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 99,5 | 0,5 | 0,0 |
| AB0089, HST, pH 6,0, 40°C, 2 недели | 99,1 | 0,9 | ND |
| AB0089, HST, pH 6,0, 40°C, 4 недели | 98,4 | 1,3 | 0,4 |

Таблица 152. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0089 через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0

| **Тестируемый образец** | **Чистота, определенная посредством NR CE (%)** | **Чистота, определенная посредством R CE (%)** |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 98,2 | 94,3 |
| AB0089, HST, pH 6,0, 40°C, 4 недели | 98,3 | 97,2 |

Таблица 153. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16a через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | hCLEC 12A | **$k_{a1}$ ($M^{-1}c^{-1}$)** (8,87 ± 0,53) x $10^6$ | **$k_{a2}$ ($c^{-1}$)** (3,49 ± 0,04) x $10^{-3}$ | **$k_{d1}$ ($c^{-1}$)** (4,20 ± 0,07) x $10^{-2}$ | **$k_{d2}$ ($c^{-1}$)** (9,37 ± 0,32) x $10^{-4}$ | 1,0 ± 0,0 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию | hCLEC 12A | **$k_{a1}$ ($M^{-1}c^{-1}$)** (7,91 ± 0,42) x $10^6$ | **$k_{a2}$ ($c^{-1}$)** (3,69 ± 0,04) x $10^{-3}$ | **$k_{d1}$ ($c^{-1}$)** (4,24 ± 0,17) x $10^{-2}$ | **$k_{d2}$ ($c^{-1}$)** (8,56 ± 0,45) x $10^{-4}$ | 1,0 ± 0,1 |
| AB0089, контроль | hNKG2D | (1,75±0,12) x$10^5$ | | (1,35±0,08) x$10^{-1}$ | | 772 ± 13 |

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | $k_d$ **($c^{-1}$)** | $K_D$ **(нМ)** |
|---|---|---|---|---|
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию | hNKG2D | (1,66±0,03) x$10^5$ | (1,32±0,02) x$10^{-1}$ | 796 ± 5 |
| AB0089, контроль | CD16aV | (8,53±0,05) x$10^4$ | (2,76±0,02) x$10^{-2}$ | 323 ± 3 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию | CD16aV | (7,93±0,27) x$10^4$ | (2,84±0,07) x$10^{-2}$ | 359 ± 6 |

Среднее значение для 3 повторов

Таблица 154. Активность AB0089 через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0, в анализе цитотоксичности с использованием KHYG-1-CD16aV

| **Тестируемый образец** | **EC50 (нМ)** | **Макс. уничтожение (%)** |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 0,16 | 83 |
| AB0089, HST, pH 6,0, 40°C, 4 недели | 0,17 | 84 |

*Стабильность в CST, pH 7,0*

**[0950]** AB0089 продемонстрировало высокую стабильность после 4 недель инкубации в CST, pH 7,0, при 40°C. При этом посредством SEC выявили минимальное снижение содержания мономера (1,6%) (фиг. 163 и таблица 155). При анализе посредством CE-SDS фрагментацию AB0089 не выявили (фиг. 164 и таблица 156). Кроме того, отсутствовала значимая разница в содержании активного белка или значениях аффинности связывания в отношении hCLEC12A, hNKG2D и hCD16a между контрольными и подвергнутыми воздействию стрессового условия образцами (фиг. 165 и таблица 157). И наконец, длительное воздействие тепловым стрессовым условием не оказывало влияния на активность AB0089 (фиг. 166 и таблица 158).

Таблица 155. Результаты SEC-анализа антитела AB0089 в течение 1-4-х недель при 40°C в CST, pH 7,0

| **Тестируемый образец** | **Конц. (мг/мл)** | **Мономер (%)** | **LMWS (%)** | **HMWS (%)** |
|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 22,0 | 99,1 | 0,5 | 0,5 |
| AB0089, CST, pH7.0, 40˚C, 1 неделя | ND | 98,2 | 1,2 | 0,6 |
| AB0089, CST, pH 7,0, 40˚C, 2 недели | | 97,9 | 1,3 | 0,7 |
| AB0089, CST, pH 7,0, 40˚C, 3 недели | | 97,7 | 1,5 | 0,8 |
| AB0089, CST, pH 7,0, 40˚C, 4 недели | 22,6 | 97,5 | 1,7 | 1,0 |

ND: не выявлено

Таблица 156. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0089 через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0

| **Тестируемый образец** | **Чистота, определенная посредством NR CE (%)** | **Чистота, определенная посредством R CE (%)** |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 98,6 | 92,7 |
| AB0089, CST, pH 7,0, 40˚C, 4 недели | 96,2 | 96,0 |

Таблица 157. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16a через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | | $k_d$ **($c^{-1}$)** | | $K_D$ **(нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | hCLEC 12A | $k_{a1}$ **($M^{-1}c^{-1}$)** (8,87 ± 0,53) x $10^6$ | $k_{a2}$ **($c^{-1}$)** (3,49 ± 0,04) x $10^{-3}$ | $k_{d1}$ **($c^{-1}$)** (4,20 ± 0,07) x $10^{-2}$ | $k_{d2}$ **($c^{-1}$)** (9,37 ± 0,32) x $10^{-4}$ | 1,0 ± 0,0 |

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию | hCLEC12A | **$k_{a1}$ ($M^{-1}c^{-1}$)** (6,31 ± 0,32) x $10^6$ | **$k_{a2}$ ($c^{-1}$)** (3,93 ± 0,12) x $10^{-3}$ | **$k_{d1}$ ($c^{-1}$)** (3,73 ± 0,15) x $10^{-2}$ | **$k_{d2}$ ($c^{-1}$)** (8,00 ± 0,05) x $10^{-4}$ | 1,0 ± 0,0 |
| AB0089, контроль | hNKG2D | (1,75±0,12) x$10^5$ | | (1,35±0,08) x$10^{-1}$ | | 772 ± 13 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию | hNKG2D | (1,60±0,04) x$10^5$ | | (1,26±0,06) x$10^{-1}$ | | 791 ± 13 |
| AB0089, контроль | CD16aV | (8,53±0,05) x$10^4$ | | (2,76±0,02) x$10^{-2}$ | | 323 ± 3 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию | CD16aV | (8,31±0,43) x$10^4$ | | (2,84±0,07) x$10^{-2}$ | | 342 ± 9 |

Среднее значение для 3 повторов

Таблица 158. Активность AB0089 через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0, в анализе цитотоксичности с использованием KHYG1-CD16aV

| **Тестируемый образец** | **Буфер** | **EC50 (нМ)** | **Макс. уничтожение (%)** |
|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | CST, pH 7,0 | 0,13 | 87 |

| **Тестируемый образец** | **Буфер** | **EC50 (нМ)** | **Макс. уничтожение (%)** |
|---|---|---|---|
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию | CST, pH 7,0 | 0,16 | 88 |

*Анализ пептидной карты при испытании стабильности образцов методом ускоренного старения*

**[0951]** Чтобы определить, индуцировало ли воздействие стрессовым условием 40°C модификации в определяющих комплементарность областях (CDR), контрольные образцы и образцы, подвергнутые стрессовому условию в течение 4-х недель, анализировали посредством LC-MS/MS с использованием пептидного картирования. На основании данных пептидной карты все CDR в AB0089 являются устойчивыми к модификации при воздействии стрессового условия, представляющего собой повышенную температуру (таблица 159). Исходя из ручной проверки формы пика не выявили признаков изомеризации аспарагиновой кислоты в пептиде, охватывающем CDRH3 CLEC12A-связывающего плеча (фиг. 167).

Таблица 159. Посттрансляционные модификации в CDR AB0089 после стрессового условия, представляющего собой повышенную температуру

| | | | | **Относительное содержание (%)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Цепь** | **CDR** | **Последовательность (Chothia)** | **Модификация** | **Контроль** | **Подвергнутые стрессовому условию (CST)** | **Подвергнутые стрессовому условию (HST)** |
| S | H1 | GFSLTNY (SEQ ID NO:137) | Дезамидирование | 0,7 | 1,7 | 0,9 |
| S | H2 | WVGGA (SEQ ID NO:272) | Отсутствует | NA | | |
| S | H3 | GDYGDTLDY (SEQ ID NO:273) | Изомеризация | Не выявлено | | |
| S | L1 | HASQNINFWLS (SEQ ID NO:140) | Дезамидирование | 0,3 | 1,0 | 0,4 |

| | | | | Относительное содержание (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Цепь** | **CDR** | **Последовательность (Chothia)** | **Модификация** | **Контроль** | **Подвергнутые стрессовому условию (CST)** | **Подвергнутые стрессовому условию (HST)** |
| S | L2 | EASNLHT (SEQ ID NO:141) | Дезамидирование | Не выявлено | | |
| S | L3 | QQSHSYPLT (SEQ ID NO:142) | Отсутствует | NA | | |
| H | H1 | GFTFSSY (SEQ ID NO:297) | Отсутствует | NA | | |
| H | H2 | SSSSSY (SEQ ID NO:298) | Отсутствует | NA | | |
| H | H3 | GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:97) | Усечение | Не выявлено | | |
| L | L1 | RASQGISSWLA (SEQ ID NO:86) | Отсутствует | NA | | |
| L | L2 | AASSLQS (SEQ ID NO:77) | Отсутствует | NA | | |
| L | L3 | QQGVSFPRT (SEQ ID NO:87) | Отсутствует | NA | | |

NA: не применимо

*Химическая стабильность*

*Принудительное окисление*

**[0952]** Чтобы оценить стабильность AB0089 при стрессовом условии, представляющем собой окисление, AB0089 инкубировали с 0,02% пероксида водорода в течение 24 часов при комнатной температуре в PBS. SEC-анализ не показал каких-либо отличий в содержании мономера между окисленным AB0089 и контрольным образцом (фиг. 168 и таблица 160). В AB0089 не выявили увеличения фрагментации посредством CE-SDS как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях (фиг. 169 и таблица 161).

Таблица 160. Результаты SEC-анализа AB0089 после принудительного окисления по сравнению с контролем

| Тестируемый образец | Концентрация (мг/мл) | Мономер (%) | LMWS (%) | HMWS (%) |
|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 1,1 | 99,3 | 0,4 | 0,3 |
| AB0089, принудительное окисление | 1,0 | 99,1 | 0,5 | 0,4 |

Таблица 161. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0089 после принудительного окисления

| Тестируемый образец | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE (%) |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 98,9 | 98,0 |
| AB0089, принудительное окисление | 97,4 | 98,1 |

**[0953]** Сайт-специфическое окисление метионина отслеживали посредством триптического пептидного картирования после принудительного окисления. Значительные уровни окисления выявляли только по двум метионинам в Fc (таблица 162). Ретроспективные данные авторов настоящего изобретения показывают, что в трастузумабе модифицированы те же остатки на 61,6% и 39,1% при тех же условиях.

Таблица 162. Сводные данные по окислению метионина в AB0089 до и после воздействия стресса, представляющего собой окисление

| | | | Относительное содержание (%) | |
|---|---|---|---|---|
| **Последовательность** | **Цепь** | **Положение** | **Контроль** | **Окисленный** |
| LSCAASGFTFSSYS**M**NWVR (SEQ ID NO:300) | H | 34 | 0,6 | 0,9 |
| NSLYLQ**M**NSLR (SEQ ID NO:301) | H | 83 | 0,4 | 0,9 |
| DTL**M**ISR (SEQ ID NO:302) | H/S | 257/278 | 2,1 | 66,7 |
| WQQGNVFSCSV**M**HEALHNHYTQK (SEQ ID NO:303) | H/S | 433/454 | 1,3 | 37,8 |
| DIQ**M**TQSPSSVSASVGDR (SEQ ID NO:304) | L | 4 | 0,5 | 1,1 |

| | | | Относительное содержание (%) | |
|---|---|---|---|---|
| **Последовательность** | **Цепь** | **Положение** | **Контроль** | **Окисленный** |
| GDYGDTLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSDIQ**M**TQSPSSLSASVG DR (SEQ ID NO:339) | S | 141 | 3,1 | 3,5 |

**[0954]** В том же эксперименте также отслеживали окисление остатков триптофана в CDR AB0089. Ни в одном из остатков триптофана не выявили значительное увеличение окисления после воздействия стрессового условия (таблица 163).

Таблица 163. Сводные данные по окислению триптофана в CDR AB0089 до и после воздействия стресса, представляющего собой окисление

| | | | | Относительное содержание (%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Последовательность** | **Цепь** | **CDR** | **Сдвиг масс (Да)[a]** | **Контроль** | **Окисленный** |
| **W**VGGA (SEQ ID NO:272) | S | H2 | +16/+32/+4 | ND/0,1/0,2 | ND/0,2/0,3 |
| HASQNINF**W**LS (SEQ ID NO:140) | S | L1 | +16/+32/+4 | ND/0,2/0,2 | ND/0,3/0,3 |
| GAPIGAAAG**W**FDP (SEQ ID NO:97) | H | H3 | +16/+32/+4 | 0,0/0,2/0,4 | 0,0/0,3/0,7 |
| RASQGISS**W**LA (SEQ ID NO:86) | L | L1 | +16/+32/+4 | 0,2/0,1/0,2 | 0,2/0,2/0,3 |

[a] одиночное окисление (+16 Да), двойное окисление (+32 Да) и кинуренин (+4 Да), ND: не выявлены.

**[0955]** Стрессовое условие, представляющее собой окисление, не оказывало значительного влияния на содержание активного белка или значения аффинности к hCLEC12A, hNKG2D и hCD16aV (фиг. 170 и таблица 164). Не выявили значительного влияния окисления на активность AB0089 (фиг. 171 и таблица 165).

Таблица 164. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16A после принудительного окисления по сравнению с контролем

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | | $k_d$ **($c^{-1}$)** | | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | hCLEC12A | $k_{a1}$ **($M^{-1}c^{-1}$)** (1,01 ± 0,04) x $10^7$ | $k_{a2}$ **($c^{-1}$)** (3,46 ± 0,01) x $10^{-3}$ | $k_{d1}$ **($c^{-1}$)** (4,76 ± 0,22) x $10^{-2}$ | $k_{d2}$ **($c^{-1}$)** (8,37 ± 0,29) x $10^{-4}$ | 0,9 ± 0,0 |
| AB0089, окисленное | hCLEC12A | $k_{a1}$ **($M^{-1}c^{-1}$)** (9,93 ± 0,11) x $10^6$ | $k_{a2}$ **($c^{-1}$)** (3,47 ± 0,04) x $10^{-3}$ | $k_{d1}$ **($c^{-1}$)** (4,81 ± 0,10) x $10^{-2}$ | $k_{d2}$ **($c^{-1}$)** (8,37 ± 0,22) x $10^{-4}$ | 0,9 ± 0,0 |
| AB0089, контроль | hNKG2D | (1,69±0,04) x$10^5$ | | (1,35±0,01) x$10^{-1}$ | | 797 ± 19 |
| AB0089, окисленное | hNKG2D | (1,71±0,13) x$10^5$ | | (1,30±0,07) x$10^{-1}$ | | 762 ± 13 |
| AB0089, контроль | hCD16aV | (8,64±0,22) x$10^4$ | | (2,78±0,05) x$10^{-2}$ | | 322 ± 7 |
| AB0089, окисленное | hCD16aV | (8,65±0,43) x$10^4$ | | (2,77±0,05) x$10^{-2}$ | | 320 ± 10 |

Среднее значение для 3 повторов

Таблица 165. Активность AB0089 до и после принудительного окисления в анализе цитотоксичности с использованием KHYG1-CD16aV

| **Тестируемый образец** | **EC50 (нМ)** | **Макс. уничтожение (%)** |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 0,11 | 84 |
| AB0089, окисленное | 0,16 | 87 |

*Стрессовое условие pH 8*

**[0956]** Химическую стабильность AB0089 оценивали путем длительной инкубации при низком уровне pH (20 мМ Tris, pH 8,0, 40°C, 2 недели). AB0089 оказалось высокостабильным: посредством SEC было выявлено снижение содержания мономера, составляющее всего лишь 1,2% (фиг. 172 и таблица 166).

Таблица 166. Результаты CE-SDS-анализа антитела AB0089 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8,0, 40°C, 2 недели).

| Тестируемый образец | Мономер (%) | LMWS (%) | HMWS (%) |
|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 99,4 | 0,4 | 0,2 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 8 | 98,2 | 1,1 | 0,7 |

**[0957]** CE-SDS в восстанавливающих и в невосстанавливающих условиях продемонстрировали низкие уровни разложения, составившие 1,7% и 3,9% соответственно (фиг. 173 и таблица 167).

Таблица 167. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0089 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8, 40°C, 2 недели).

| Тестируемый образец | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE (%) |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 98,6 | 98,2 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 8 | 96,9 | 94,3 |

**[0958]** После длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH, выявляли небольшой кислотный сдвиг в общем профиле заряда, выявленный посредством cIEF (фиг. 174 и таблица 168). Данный кислотный сдвиг можно объяснить дезамидированием всей последовательности AB0089. Подобный кислотный сдвиг выявляли для трастузумаба после воздействия таких же стрессовых условий (данные не показаны).

Таблица 168. Профиль заряда AB0089 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8, 40°C, 2 недели)

| Тестируемый образец | % кислых фрагментов | % фрагментов главного продукта | % основных фрагментов |
|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 43,1 | 51,4 | 5,5 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 8 | 66,6 | 29,0 | 4,4 |

**[0959]** Отсутствовала значимая разница в количестве активного белка или в значениях аффинности к hCLEC12A, hNKG2D или hCD16aV между подвергнутыми воздействию стрессового условия и контрольными образцами (фиг. 175 и таблица 169).

Таблица 169. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16aV после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8, 40°C, 2 недели)

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | | $k_d$ **($c^{-1}$)** | | **KD (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | hCLEC12A | $k_{a1}$ **($M^{-1}c^{-1}$)** (1,01 ± 0,04) x $10^7$ | $k_{a2}$ **($c^{-1}$)** (3,46 ± 0,01) x $10^{-3}$ | $k_{d1}$ **($c^{-1}$)** (4,76 ± 0,22) x $10^{-2}$ | $k_{d2}$ **($c^{-1}$)** (8,37 ± 0,29) x $10^{-4}$ | 0,9 ± 0,0 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 8 | hCLEC12A | $k_{a1}$ **($M^{-1}c^{-1}$)** (9,93 ± 0,05) x $10^7$ | $k_{a2}$ **($c^{-1}$)** (3,36 ± 0,09) x $10^{-3}$ | $k_{d1}$ **($c^{-1}$)** (4,90 ± 0,24) x $10^{-2}$ | $k_{d2}$ **($c^{-1}$)** (8,63 ± 0,33) x $10^{-4}$ | 0,9 ± 0,1 |
| AB0089, контроль | hNKG2D | (1,69±0,04) x$10^5$ | | (1,35±0,01) x$10^{-1}$ | | 797 ± 19 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 8 | hNKG2D | 1,30 x$10^5$ | | 1,27 x$10^{-1}$ | | 983 |
| AB0089, контроль | hCD16aV | (8,64±0,22) x$10^4$ | | (2,78±0,05) x$10^{-2}$ | | 322 ± 7 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 8 | hCD16aV | (7,94±0,28) x$10^4$ | | 2,79±0,15) x$10^{-2}$ | | 350 ± 11 |

Среднее значение для 3 повторов для всех образцов за исключением связывающегося с hNKG2D образца, подвергнутого стрессовому условию pH 8 (n = 2)

**[0960]** После длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH, активность AB0089 снижалась в примерно 2 раза (фиг. 176 и таблица 170). С учетом того, что ортогональные способы анализа не показали каких-либо отличий в связывании или содержании фракций активного соединения (фиг. 175), очевидно, что данные отличия могут быть обусловлены вариабельностью анализа активности.

Таблица 170. Активность AB0089 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8, 40°C, 2 недели)

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 0,11 | 84 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 8 | 0,23 | 83 |

*Стрессовое условие pH 5*

**[0961]** Химическую стабильность AB0089 также оценивали путем длительной инкубации при низком уровне pH (20 мМ ацетата натрия, pH 5,0, 40°C, 2 недели). DF оказалось высокостабильным: посредством SEC было выявлено снижение содержания мономера, составляющее всего лишь 0,3% (фиг. 177 и таблица 171).

Таблица 171. Результаты SEC-анализа AB0089 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 2 недели)

| Тестируемый образец | Мономер (%) | LMWS (%) | HMWS (%) |
|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 99,3 | 0,4 | 0,2 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 5 | 99,0 | 0,8 | 0,2 |

**[0962]** После длительного воздействия pH 5 низкие уровни разложения AB0089 выявляли посредством CE-SDS в невосстанавливающих и в восстанавливающих условиях: 1,0% и 0,3% снижение содержания мономера соответственно (фиг. 178 и таблица 172).

Таблица 172. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0089 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 2 недели).

| Тестируемый образец | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE (%) |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 98,6 | 97,7 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 5 | 97,6 | 97,4 |

**[0963]** После длительного воздействия pH 5 выявляли небольшой кислотный сдвиг в общем профиле заряда, выявленный посредством cIEF (фиг. 178 и таблица 172), в частности значительно увеличивающийся с одним кислым вариантом.

Таблица 173. Профиль заряда AB0089 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 2 недели)

| **Тестируемый образец** | **% кислых фрагментов** | **% фрагментов главного продукта** | **% основных фрагментов** |
|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 37,8 | 56,4 | 5,8 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 5 | 47,3 | 45,9 | 6,8 |

**[0964]** После длительного воздействия низкого уровня pH отсутствовала значимая разница в содержании активного белка или в значениях аффинности AB0089 к hCLEC12A, hNKG2D или hCD16aV (фиг. 180 и таблица 174).

Таблица 174. Кинетические параметры и аффинность связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16aV после воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 2 недели)

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | hCLEC12A | **$k_{a1}$ ($M^{-1}c^{-1}$)** (1,01 ± 0,04) x $10^7$ | **$k_{a2}$ ($c^{-1}$)** (3,46 ± 0,01) x $10^{-3}$ | **$k_{d1}$ ($c^{-1}$)** (4,76 ± 0,22) x $10^{-2}$ | **$k_{d2}$ ($c^{-1}$)** (8,37 ± 0,29) x $10^{-4}$ | 0,9 ± 0,0 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 5 | hCLEC12A | **$k_{a1}$ ($M^{-1}c^{-1}$)** (8,62 ± 0,02) x $10^6$ | **$k_{a2}$ ($c^{-1}$)** (3,47 ± 0,04) x $10^{-3}$ | **$k_{d1}$ ($c^{-1}$)** (4,27 ± 0,22) x $10^{-2}$ | **$k_{d2}$ ($c^{-1}$)** (8,40 ± 0,09) x $10^{-4}$ | 1,0 ± 0,0 |
| AB0089, контроль | hNKG2D | (1,69±0,04) x$10^5$ | | (1,35±0,01) x$10^{-1}$ | | 797 ± 19 |

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 5 | hNKG2D | 1,87 x$10^5$ | 1,31 x$10^{-1}$ | 703 |
| AB0089, контроль | CD16aV | (8,64±0,22) x$10^4$ | (2,78±0,05) x$10^{-2}$ | 322 ± 7 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 5 | CD16aV | (7,54±0,36) x$10^4$ | (2,89±0,05) x$10^{-2}$ | 383 ± 12 |

Среднее значение для 3 повторов для всех образцов за исключением связывающегося с hNKG2D образца, подвергнутого стрессовому условию pH 5 (n = 2)

**[0965]** Активность AB0089 после длительного воздействия pH 5 оставалась подобной активности контрольного образца (фиг. 181 и таблица 175).

Таблица 175. Активность AB0089 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 2 недели) в анализе цитотоксичности с использованием KHYG-1-CD16aV

| **Тестируемый образец** | **EC50 (нМ)** | **Макс. уничтожение (%)** |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 0,11 | 84 |
| AB0089, подвергнутое стрессовому условию pH 5 | 0,16 | 86 |

*Анализ посредством пептидного картирования материала, подвергнутого стрессовому условию, представляющему собой pH 5 и pH 8*

**[0966]** Чтобы определить, являются ли выявленные посредством cIEF изменения, вызванные стрессовым условием pH, следствием модификации в определяющих комплементарность областях (CDR), образцы, подвергнутые стрессовому условию,

представляющему собой pH 5 и pH 8, анализировали с помощью пептидного картирования посредством LC-MS/MS. На основании данных пептидной карты все CDR в AB0089 являются устойчивыми к модификации при воздействии стрессового условия, представляющего собой низкий и высокий уровни pH (таблица 176). Исходя из ручной проверки формы пика не выявили признаков изомеризации аспарагиновой кислоты в пептиде, охватывающем CDRH3 CLEC12A-нацеливающегося плеча AB0089 (фиг. 182).

Таблица 176. Посттрансляционные модификации в CDR AB0089 после длительного воздействия низкого и высокого уровней pH (pH 5,0 и pH 8,0)

| | | | | **Относительное содержание (%)** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **pH 5** | | **pH 8** | |
| **Цепь** | **CDR** | **Последовательность (Chothia)** | **Модификация** | **Контроль** | **Подвергнутое стрессовому условию** | **Контроль** | **Подвергнутое стрессовому условию** |
| S | H1 | GFSLTNY (SEQ ID NO:137) | Дезамидирование | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 1,4 |
| S | H2 | WVGGA (SEQ ID NO:272) | Отсутствует | NA | | | |
| S | H3 | GDYGDTLDY (SEQ ID NO:273) | Изомеризация | Не выявлено | | | |
| S | L1 | HASQNINFWLS (SEQ ID NO:140) | Дезамидирование | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,4 |
| S | L2 | EASNLHT (SEQ ID NO:141) | Дезамидирование | Не выявлено | | | |
| S | L3 | QQSHSYPLT (SEQ ID NO:142) | Отсутствует | NA | | | |

| | | | | Относительное содержание (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | pH 5 | | pH 8 | |
| **Цепь** | **CDR** | **Последовательность (Chothia)** | **Модификация** | **Контроль** | **Подвергнутое стрессовому условию** | **Контроль** | **Подвергнутое стрессовому условию** |
| H | H1 | GFTFSSY (SEQ ID NO:297) | Отсутствует | NA | | | |
| H | H2 | SSSSSY (SEQ ID NO:298) | Отсутствует | NA | | | |
| H | H3 | GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:97) | Усечение | Не выявлено | | | |
| L | L1 | RASQGISSWLA (SEQ ID NO:86) | Отсутствует | NA | | | |
| L | L2 | AASSLQS (SEQ ID NO:77) | Отсутствует | NA | | | |
| L | L3 | QQGVSFPRT (SEQ ID NO:87) | Отсутствует | NA | | | |

NA: не применимо

*Технологичность*

*Стабильность при замораживании/оттаивании*

**[0967]** Аликвоты антитела AB0089 (20 мг/мл в CST, pH 7,0) замораживали и оттаивали 6 раз путем помещения флаконов в контейнер из пенополистирола (для замедления скорости замораживания) и помещения контейнера в условия -80°C. После 6 циклов замораживания/оттаивания антитело AB0089 не продемонстрировало снижения содержания мономера в ходе SEC-анализа. Концентрация белка, измеренная по поглощению при длине волны 280, оставалась без изменений (фиг. 183 и таблица 177).

Таблица 177. Результаты SEC-анализа AB0089 после воздействия замораживания/оттаивания

| Тестируемый образец | Конц. (мг/мл) | Мономер (%) | LMWS (%) | HMWS (%) |
|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 22,3 | 99,0 | 0,7 | 0,3 |
| AB0089 после 6 циклов З/О | 22,1 | 98,9 | 0,8 | 0,3 |

**[0968]** После 6 циклов замораживания/оттаивания не выявили снижения чистоты в ходе анализа посредством CE-SDS в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях (фиг. 184 и таблица 178).

Таблица 178. Результаты анализа чистоты посредством NR и R CE-SDS антитела AB0089 после воздействия стрессового условия замораживания/оттаивания

| Тестируемый образец | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE (%) |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 98,4 | 93,2 |
| AB0089 после 6 циклов З/О | 98,3 | 93,7 |

*Перемешивание*

**[0969]** Осуществляли встряхивание антитела AB0089 (при 10 мг/мл в 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, pH 7,0, с добавлением 0,01% Tween-80 или без него) при 300 об/мин при комнатной температуре в планшете с глубокими лунками в течение 3 дней. После воздействия стрессового условия, представляющего собой перемешивание, посредством SEC-анализа не выявили как снижения содержания мономера (фиг. 185 и таблица 179), так и снижения концентрации белка (A280) и повышения мутности (A340).

Таблица 179. Результаты SEC-анализа AB0089 после воздействия стрессового условия, представляющего собой перемешивание

| Тестируемый образец | 0,01% Tween-80 | Конц. (мг/мл) | Мономер (%) |
|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | + | 9,86 | 99,5 |
| AB0089, перемешивание | + | 9,97 | 99,7 |
| AB0089, контроль | - | 9,81 | 99,4 |
| AB0089, перемешивание | - | 9,93 | 99,1 |

*Высокая концентрация*

**[0970]** AB0089 концентрировали до примерно 10, 15, 25, 50, 100, 150 и 175 мг/мл в PBS, pH 7,4, и извлечение отслеживали посредством визуальной оценки, определения концентрации (по поглощению при длине волны 280) и SEC. Для SEC-анализа образцы

вводили неразведенными (вводимый объем нормализовали по концентрации). AB0089 было способно выдержать концентрирование до > 175 мг/мл с минимальным снижением процентного содержания мономера (фиг. 186, фиг. 187, таблица 180) и без видимого осаждения.

Таблица 180. Результаты SEC-анализа AB0089 при разных концентрациях

| **Концентрация (мг/мл)** | **%-ое содержание мономера** | **% HMW** |
|---|---|---|
| 9,7 | 99,7 | 0,3 |
| 14,7 | 99,7 | 0,3 |
| 26,2 | 99,7 | 0,3 |
| 53,4 | 99,6 | 0,4 |
| 94,2 | 99,6 | 0,4 |
| 143,5 | 99,6 | 0,4 |
| 178,4 | 99,5 | 0,5 |

*Выдерживание при низком уровне pH*

**[0971]** Для оценки характеристик AB0089 в ходе выдерживания при низком уровне pH (имитация вирусной инактивации) использовали два разных способа. Первый способ имитировал процесс производства, при котором элюат из первой стадии хроматографии (с использованием белка A) выдерживали при низком уровне pH перед дополнительной очисткой. Согласно второму способу полностью очищенное антитело AB0089 выдерживали в условиях низкого уровня pH. Данный способ использовали для оценки потенциальных химических модификаций в CDR, индуцируемых низким уровнем pH.

*Выдерживание при низком уровне pH элюата из колонки с иммобилизованным белком A*

**[0972]** Чтобы определить, является ли AB0089 устойчивым к выдерживанию при низком уровне pH, элюат, содержащий AB0089, из колонки с иммобилизованным белком A доводили до pH 3,5 и выдерживали в течение 2 часов при комнатной температуре. После периода выдерживания элюат из колонки с иммобилизованным белком A нейтрализовали посредством 1,0 M Tris, pH 8,3, с достижением нейтрального pH. Осуществляли аналитическую SEC, чтобы определить, имелись ли какие-либо изменения в профиле или содержании агрегатов до и после воздействия низкого уровня pH (фиг. 188). Каких-либо изменений в SEC-профиле AB0089 не наблюдали после выдерживания при низком уровне pH по сравнению с контрольным образцом "без выдерживания", что свидетельствует о высокой стабильности AB0089 в условиях выдерживания при низком уровне pH/вирусной инактивации, используемых в производстве биологических препаратов.

**[0973]** Белок дополнительно обрабатывали на второй стадии способа очистки с применением платформы DF и анализировали с применением панели дополнительных анализов по сравнению с очищенным белком, который не подвергали выдерживанию при низком уровне pH. Химическую модификацию боковых цепей аминокислот обычно можно определять экспериментально в общем масштабе посредством cIEF. cIEF-профили контрольного антитела AB0089 и партии, выдерживаемой при низком уровне pH, визуально очень схожи, а результаты относительного количественного определения кислых фракций, фракций главного продукта и основных фракций находятся в пределах 5% друг от друга. Это указывает на то, что выдерживание при низком уровне pH не оказало поддающегося измерению влияния на профиль заряда AB0089 (фиг. 189 и таблица 181).

Таблица 181. Профиль заряда AB0089 после выдерживания при низком уровне pH

| **Тестируемый образец** | **pI** | **% кислых фрагментов** | **% фрагментов главного продукта** | **% основных фрагментов** |
|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 8,5 | 43,7 | 50,8 | 5,5 |
| AB0089, выдерживание при низком уровне pH | 8,6 | 39,5 | 54,3 | 6,2 |

**[0974]** На значения аффинности AB0089 к hCLEC12a, hNKG2D и CD16aV не влияло выдерживание при низком уровне pH (фиг. 190 и таблица 182). Какого-либо отличия в содержании активного белка не выявили. Разница в аффинности связывания и разница в кажущемся ответе при максимальном связывании между контролем и образцом, выдерживаемым при низком уровне pH, находились в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Это указывает на то, что AB0089 сохраняет аффинность ко всем трем мишеням после выдерживания при низком уровне pH.

Таблица 182. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16aV после выдерживания при низком уровне pH

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | hCLEC12A | **$k_{a1}$ ($M^{-1}c^{-1}$)** (1,04 ± 0, 03) x $10^7$ | **$k_{a2}$ ($c^{-1}$)** (3,43 ± 0, 04) x $10^{-3}$ | **$k_{d1}$ ($c^{-1}$)** (4,35 ± 0, 12) x $10^{-2}$ | **$k_{d2}$ ($c^{-1}$)** (7,41 ± 0, 10) x $10^{-4}$ | 0,7 ± 0,0 |

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | | $k_d$ ($c^{-1}$) | | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0089, выдерживание при низком уровне pH | hCLEC12A | $k_{a1}$ ($M^{-1}c^{-1}$) (1,11 ± 0,07) x $10^7$ | $k_{a2}$ ($c^{-1}$) (3,50 ± 0,03) x $10^{-3}$ | $k_{d1}$ ($c^{-1}$) (4,65 ± 0,05) x $10^{-2}$ | $k_{d2}$ ($c^{-1}$) (7,49 ± 0,03) x $10^{-4}$ | 0,7 ± 0,0 |
| AB0089, контроль | hNKG2D | (1,62±0,03) x$10^5$ | | (1,43±0,03) x$10^{-1}$ | | 881 ± 10 |
| AB0089, выдерживание при низком уровне pH | hNKG2D | (1,59±0,07) x$10^5$ | | (1,50±0,05) x$10^{-1}$ | | 941 ± 45 |
| AB0089, контроль | CD16aV | (8,31±0,55) x$10^4$ | | (2,77±0,16) x$10^{-2}$ | | 333 ± 11 |
| AB0089, выдерживание при низком уровне pH | CD16aV | (8,73±0,22) x$10^4$ | | (2,74±0,05) x$10^{-2}$ | | 314 ± 8 |

Результаты представляют среднее значение для 3 повторов

**[0975]** Активность антитела AB0089, подвергнутого выдерживанию при низком уровне pH, и активность контрольного образца тестировали в отношении раковых клеток HL-60 CLEC12A+ в биологическом анализе с использованием KHYG1-CD16aV. Активность AB0089 не изменилась после стадии выдерживания при низком уровне pH (фиг. 191 и таблица 183).

Таблица 183. Активность AB0089 после выдерживания при низком уровне pH в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|
| AB0089, контроль | 0,11 | 95 |
| AB0089, выдерживание при низком уровне pH | 0,11 | 89 |

*Выдерживание при низком уровне pH полностью очищенного белка*

**[0976]** Провели дополнительное исследование с выдерживанием при низком уровне pH, чтобы выяснить, изомеризуется ли мотив DT в CDRH3 (KGDYG**DT**LDY) CLEC12A-нацеливающегося scFv в ходе стадии вирусной инактивации. Материал после

выдерживания при низком уровне pH получали из полностью очищенного материала AB0089 с использованием следующих стадий.

1. AB0089 разводили 1:1 посредством 0,1 M глицина, pH 3,0, чтобы имитировать элюирование с использованием ProA.
2. Значение pH доводили до 3,5 ± 0,1 посредством 2 M уксусной кислоты (чтобы имитировать условия выдерживания при низком уровне pH).
3. Выдерживание при низком уровне pH осуществляли в течение 60 мин при комнатной температуре.
4. Значение pH доводили до нейтрального, составляющего ~7,5, посредством 1 M Tris, pH 8,0.
5. AB0089 подвергали замене буфера на PBS, pH 7,4.

**[0977]** Конечный материал после выдерживания при низком уровне pH (AB0089 из партии AB0089-004) сравнивали с контролем (AB0089 из партии AB0089-002) с использованием панели биологических анализов: SEC, cIEF, анализ связывания с CLEC12A посредством SPR, пептидное картирование и активность. Осуществляли аналитическую SEC, чтобы определить, имелись ли какие-либо изменения в профиле или содержании агрегатов до и после воздействия низкого уровня pH (фиг. 192 и таблица 184). Каких-либо изменений в профиле %-ого содержания мономера не выявили после выдерживания при низком уровне pH.

Таблица 184. Результаты SEC-анализа AB0089 после выдерживания при низком уровне pH по сравнению с контролем

| **Тестируемый образец** | **Мономер (%)** | **LMWS (%)** | **HMWS (%)** |
|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 99,7 | ND | 0,3 |
| AB0089, выдерживание при низком уровне pH | 99,7 | ND | 0,3 |

ND: не выявлено

**[0978]** Как видно из первого исследования с выдерживанием при низком уровне pH, cIEF-профили контрольного антитела AB0089 и партии, выдерживаемой при низком уровне pH, визуально очень схожи, а результаты относительного количественного определения кислых фракций, фракций главного продукта и основных фракций находятся в пределах 6% друг от друга. Следовательно, выдерживание при низком уровне pH не оказало значительного влияния на профиль заряда AB0089 (фиг. 193 и таблица 185).

Таблица 185. AB0089 после выдерживания при низком уровне pH

| **Тестируемый образец** | **pI** | **% кислых фрагментов** | **% фрагментов главного продукта** | **% основных фрагментов** |
|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | 8,6 | 42,5 | 51,1 | 6,5 |
| AB0089, выдерживание при низком уровне pH | 8,6 | 38,0 | 56,8 | 5,4 |

**[0979]** Аффинность AB0089 в отношении hCLEC12a не изменилась по сравнению с контролем (фиг. 281 и таблица 186). Разница в аффинности связывания и разница в кажущемся ответе при максимальном связывании между контролем и образцом, выдерживаемым при низком уровне pH, находится в пределах экспериментальной вариабельности результатов данного анализа. Это указывает на отсутствие влияния инкубации при низком уровне pH на связывание CLEC12A-связывающего плеча с антигеном-мишенью.

Таблица 186. Сводные данные по кинетическим параметрам и аффинности связывания AB0089 в отношении hCLEC12A после выдерживания при низком уровне pH по сравнению с контролем

| **Тестируемый образец** | $k_{a1}$ **($M^{-1}s^{-1}$)** | $k_{d1}$ **($s^{-1}$)** | $k_{a2}$ **($s^{-1}$)** | $k_{d2}$ **($s^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|---|---|
| AB0089, контроль | $(1,03\pm0,03)\times10^{7}$ | $(2,72\pm0,11)\times10^{-2}$ | $(3,59\pm0,05)\times10^{-3}$ | $(8,56\pm0,32)\times10^{-4}$ | 0,51 ± 0,02 |
| AB0089 Выдерживание при низком уровне pH | $(1,02\pm0,06)\times10^{7}$ | $(2,76\pm0,10)\times10^{-2}$ | $(3,60\pm0,04)\times10^{-3}$ | $(8,62\pm0,11)\times10^{-4}$ | 0,53 ± 0,02 |

Результаты представляют среднее значение для 3 повторов

**[0980]** Активность AB0089 после выдерживания при низком уровне pH против раковых клеток HL-60 CLEC12A+ оценивали в биологическом анализе с использованием KHYG1-CD16V. Какого-либо различия между значениями активности в случае выдерживания при низком уровне pH и контрольными образцами не выявили (фиг. 282 и таблица 187).

Таблица 187. Активность AB0089 после выдерживания при низком уровне pH сохраняется в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG1-CD16aV

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Максимальный лизис (%) |
|---|---|---|
| AB0089, контроль (AB0089-002) | 0,04 | 99 |
| AB0089, выдерживание при низком уровне pH (AB0089-004) | 0,03 | 98 |

**[0981]** Чтобы определить, индуцирует ли выдерживание при низком уровне pH изменения в модификации в CDR, контрольные и выдерживаемые при низком уровне pH образцы анализировали посредством LC-MS/MS с использованием пептидного картирования. На основании данных пептидной карты все CDR в AB0089 являются устойчивыми к модификации при выдерживании при низком уровне pH (таблица 188). Исходя из ручной проверки формы пика, признаков изомеризации аспарагиновой кислоты не выявили.

Таблица 188. AB0089 устойчивы к посттрансляционным модификациям после выдерживания при низком уровне pH

| | | | | **Относительное содержание (%)** | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Цепь** | **CDR** | **Последовательность (Chothia)** | **Потенциальные участки неблагоприятных модификаций** | **Контроль** | **Выдерживание при низком уровне pH** |
| S | H1 | GFSLTNY (SEQ ID NO:137) | Дезамидирование | 0,7 | 1,1 |
| S | H2 | WVGGA (SEQ ID NO:272) | Отсутствует | NA | |
| S | H3 | GDYGDTLDY (SEQ ID NO:273) | Изомеризация | ND | ND |
| S | L1 | HASQNINFWLS (SEQ ID NO:140) | Дезамидирование | 0,2 | 0,1 |
| S | L2 | EASNLHT (SEQ ID NO:141) | Дезамидирование | ND | ND |
| S | L3 | QQSHSYPLT (SEQ ID NO:142) | Отсутствует | NA | |
| H | H1 | GFTFSSY (SEQ ID NO:297) | Отсутствует | NA | |

| | | | | Относительное содержание (%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Цепь** | **CDR** | **Последовательность (Chothia)** | **Потенциальные участки неблагоприятных модификаций** | **Контроль** | **Выдерживание при низком уровне pH** |
| H | H2 | SSSSSY (SEQ ID NO:298) | Отсутствует | NA | |
| H | H3 | GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:97) | Усечение | ND | ND |
| L | L1 | RASQGISSWLA (SEQ ID NO:86) | Отсутствует | NA | |
| L | L2 | AASSLQS (SEQ ID NO:77) | Отсутствует | NA | |
| L | L3 | QQGVSFPRT (SEQ ID NO:87) | Отсутствует | NA | |

NA: не применимо

**[0982]** В совокупности данные результаты демонстрируют, что AB0089 является улучшенным вариантом AB0192 с оптимизированным CMC-профилем. Молекулярный формат и структура AB0089 соответствуют концептуальным требованиям для нового мультиспецифического терапевтического воздействия, в котором для лечения AML задействуют одновременно CLEC12A, NKG2D и CD16a. AB0089 является высокоактивным и характеризуется благоприятным профилем реализуемости без каких-либо потенциальных участков неблагоприятных модификаций или значимых посттрансляционных модификаций, наблюдаемых при любых стрессовых условиях. AB0089 связывается с эпитопом на CLEC12a аналогично теподитамабу (Merus).

**Пример 18. Цитотоксичность и механизм действия AB0089**

**Цели**

**[0983]** Измерить активность AB0089 в клеточных анализах *in vitro* с применением условий, соответствующих физиологическим, чтобы определить характеристики способов действия AB0089.

**План исследования**

**[0984]** Первичный механизм действия AB0089 тестировали с применением систем анализа *in vitro* с NK-клетками человека и CLEC12A+ раковыми клетками. Также

использовали другие эффекторные функции, помимо цитолиза, опосредованного NK-клетками, в паре с CLEC12A+ раковыми клетками для тестирования дополнительных механизмов действия AB0089. Макрофаги представляли собой эффекторные клетки для анализов ADCP, а сыворотка крови человека использовалась в качестве источника комплемента для тестирования CDC-активности.

**Материалы и способы**

Первичные клетки и клеточные линии

**[0985]** Раковые клеточные линии человека были получены из исследовательских банков клеток. Использовались следующие клеточные линии (номер изделия; поставщик): PL21 (ACC-536; DSMZ) и HL60 (CCL-240; ATCC).

**[0986]** Кровь человека получали от Biological Speciality Corporation (225-11-04). PBMC выделяли центрифугированием в градиенте плотности и NK-клетки очищали с применением отрицательного истощения с помощью магнитных микроносителей (StemCell, № по катал. 17955). При очистке NK-клеток от PBMC следовали инструкциям изготовителя. Замороженные NK-клетки приобретали у BioIVT. Моноциты HUMAN-HL65-U-200429 CD14+ получали у BioIVT (HMN370652, HMN370653, HMN370654). Замороженные PBMC очищали самостоятельно (см. выше) и замораживали для последующего применения.

Материалы для культивирования клеток

**[0987]** Применялись следующие изделия (поставщик; номер изделия): RPMI-1640 (Corning; 10040CV), DMEM (Corning; 10031CV), инактивированная нагреванием FBS (ThermoFisher; 16140-071), GlutaMax I (ThermoFisher; 35050-061), пеницил./стрептом. (ThermoFisher; 151450-122), 2-меркаптоэтанол (MP Biomedicals; 02194705), IL-2 (PeproTech; 200-02), CFSE (ThermoFisher ; C34554), фиолетовый краситель Cell Trace (ThermoFisher; C34557), rhM-CSF (R&D Systems; 216-MC/CF), TrypLE (ThermoFisher; 12604-013), BFA (Biolegend; 420601), монензин (BioLegend; 420701) и сыворотка крови человека (Sigma Aldrich; S1764-5X1ML).

Материалы для анализа

**[0988]** Применялись следующие изделия (поставщик; номер изделия): забуференный Hepes солевой раствор (Alfa Aesar; J67502), реагент BATDA (Perkin Elmer; C136-100), 96-луночный круглодонный планшет TC (Corning; 3799), раствор европия (Perkin Elmer; C135-100), желтые 96-луночные микропланшеты DELFIA (Perkin Elmer; AAAND-0001), буфер для фиксации (BioLegend; 420801), Zombie NIR (BioLegend; 77184) и клон класса I антитела к MHC W6/32 (Invitrogen; HLA-C1).

**[0989]** Применялись следующие тестируемые образцы (описание): AB0237 (CLEC12A-нацеленное TriNKET с NKG2D-связывающим Fab (A49) и CLEC12A-связывающим доменом scFv (1602)), AB0300 (AB0237 с мутацией LALAPG в домене CH2), mAb AB0037 (гуманизированное mAb 1602 к CLEC12A), AB0089 (CLEC12A-нацеленное TriNKET с NKG2D-связывающим Fab (A49) и CLEC12A-связывающим доменом scFv (1739)), mAb AB0305 (гуманизированное mAb 1739 к CLEC12A), AB0192 (CLEC12A-нацеленное TriNKET с NKG2D-связывающим Fab (A49) и CLEC12A-связывающим доменом scFv (1797)), mAb AB0306 (гуманизированное mAb 1797 к CLEC12A), и F3'-паливизумаб (ненацеленное TriNKET с NKG2D-связывающим Fab (A49) и scFv-связывающим доменом из паливизумаба).

**[0990]** Применялись следующие приборы (серийный номер): Attune NxT (2AFC228271119), BD Celesta (H66034400085), BD Celesta (H66034400160), Spectramax i3x (363704226) и Spectramax i3x (363703638).

Получение реагентов

**[0991]** Среды RPMI для культивирования первичных клеток получали, начиная с RPMI-1640. Для получения полных сред добавляли 10% HI-FBS, 1x GlutaMax, 1x пеницил./стрептом. и 50 мкМ 2-меркаптоэтанола. Среды RPMI для культивирования клеток получали, начиная с RPMI-1640. Для получения полных сред добавляли 10% HI-FBS, 1x GlutaMax и 1x пеницил./стрептом. 1x HBS получали путем разбавления 1 части 5x HBS в 4 частях DI-воды. Раствор стерилизовали фильтрованием перед применением.

Анализ цитотоксичности DELFIA

Мечение клеток-мишеней

**[0992]** Вкратце, CLEC12A+ клетки-мишени осаждали и промывали с помощью 1x HBS. Клетки-мишени ресуспендировали в предварительно нагретых средах RPMI для культивирования первичных клеток при $10^6$ клеток/мл. Реагент BATDA (бис(ацетоксиметил)-2,2':6',2"-терпиридин-6,6"-дикарбоксилат) разбавляли 1:400 в суспензии клеток. Клетки смешивали и инкубировали при 37°C с 5% $CO_2$ в течение 15 минут. Меченые клетки-мишени промывали 3 раза с помощью 1x HBS и ресуспендировали при 5 x $10^4$ клеток/мл в средах RPMI для культивирования первичных клеток.

Получение аналитического планшета

**[0993]** Выдержанные в состоянии покоя NK-клетки человека удаляли из культуры и осаждали, клетки ресуспендировали в средах RPMI для культивирования первичных клеток при 0,5 x $10^6$ клеток/мл. 4x тестируемые образцы получали в средах RPMI для культивирования первичных клеток. В 96-луночный круглодонный планшет TC

добавляли 100 мкл меченых клеток-мишеней, 50 мкл 4x TriNKET/mAb и 50 мкл эффекторных клеток. Контрольные лунки для определения фонового значения получали путем осаждения меченых клеток-мишеней и добавляли 100 мкл супернатанта в лунки для определения фонового значения, содержащие по 100 мкл сред RPMI для культивирования первичных клеток. Лунки для определения спонтанного высвобождения получали путем добавления 100 мкл меченых клеток-мишеней в лунки, содержащие по 100 мкл сред RPMI для культивирования первичных клеток. Лунки для определения максимального высвобождения получали путем добавления 100 мкл меченых клеток-мишеней в лунки, содержащие по 80 мкл сред RPMI для культивирования первичных клеток и 20 мкл 10% раствора TritonX-100. Аналитический планшет инкубировали при 37°C с 5% CO2 в течение 2-3 часов.

Считывание аналитического планшета

**[0994]** Аналитический планшет извлекали из инкубатора и планшет центрифугировали с получением осадка клеток. Из каждой лунки отбирали по 20 мкл супернатанта и переносили в чистый 96-луночный желтый аналитический планшет DELFIA. В каждую лунку добавляли по 200 мкл раствора европия комнатной температуры и планшет помещали на шейкер для планшетов на 15 минут при 250 об./мин. Планшет считывали с применением картриджа HTRF на SpectraMax i3x со следующими настройками PMT и оптики:

- Время интегрирования – 0,4 мс
- Время возбуждения – 0,05 мс
- Число импульсов – 100
- Задержка измерения – 0,25 мс
- Высота считывания – 2,36 мм

Анализ данных

**[0995]** Среднее значение образцов для определения фонового значения рассчитывали и вычитали из значений всех образцов. Специфический лизис рассчитывали следующим образом:

% специфического лизиса = (образец-спонтанный) / (макс.-спонтанный) * 100%

**[0996]** Данные аппроксимировали согласно четырехпараметрической нелинейной регрессионной модели с использованием Prism GraphPad 7.0 или 8.0.

Анализы активации IFNγ и CD107a

Установка планшета

**[0997]** Раковые клеточные линии человека, экспрессирующие CLEC12A, собирали из культуры и количество клеток доводили до 2 x $10^6$ клеток/мл. Тестируемые образцы

разбавляли в культуральных средах. Выдержанные в состоянии покоя NK-клетки или PBMC собирали из культуры, клетки промывали и ресуспендировали при 2-4 x $10^6$ клеток/мл в средах для культивирования. IL-2 и антитело к CD107a, конъюгированные с флуорофором, добавляли к NK-клеткам или PBMC для активационного культивирования. Брефельдин-A (BFA) и монензин разбавляли в средах для культивирования, чтобы заблокировать транспорт белка из клетки для внутриклеточного окрашивания цитокинов. В 96-луночный планшет добавляли 50 мкл опухолевых мишеней, mAb/TriNKET, BFA/монензин и NK-клетки до общего объема культуры, составляющего 200 мкл. Планшет культивировали в течение 4 часов, прежде чем получали образцы для анализа FACS.

Получение образцов для FACS

**[0998]** После 4-часового активационного культивирования клетки подготавливали для анализа посредством проточной цитометрии с использованием конъюгированных с флуорофором антител, перечисленных в таблице 189. Окрашивание CD107a и IFNγ анализировали в CD3-CD56+ популяциях для оценки активации NK-клеток.

**Таблица 189. FACS, панель активации NK**

| **Флуорофор** | **Мишень** | **Коэффициент разбавления** |
|---|---|---|
| **BV421** | IFNy | 50 |
| **BV510** | CD8 | 100 |
| **BV605** | Элементы, не представляющие интереса | |
| **BV785** | CD3 | 100 |
| **PE-D594** | CD56 | 100 |
| **PE-Cy7** | CD4 | 100 |
| **APC** | CD107a | 50 |
| **A700** | CD45 | 50 |
| **NIR** | Живые-мертвые | 1000 |
| | TruStain FcX | 50 |
| | Буфер BV | 50 |
| | Средство | 50 |

| Флуорофор | Мишень | Коэффициент разбавления |
|---|---|---|
| | блокирования моноцитов | |

**[0999]** Клетки, представляющие интерес, идентифицировали с использованием графика зависимости FSC и SSC и вокруг клеток рисовали гейт соответствующей формы. Среди гейтированных клеток дублетные клетки удаляли путем просмотра графика зависимости FSC-H и FSC-A. В пределах одноклеточной популяции гейтировали живые клетки. Среди живых клеток NK-клетки идентифицировали как CD56+CD3-. Дегрануляцию CD107a и внутриклеточный (IC) IFNγ анализировали в популяции NK-клеток.

Анализы ADCP

**[01000]** Первичные моноциты CD14+ человека получали от BioIVT. Моноциты выделяли из периферической крови посредством негативной селекции с достижением чистоты > 93%. Моноциты культивировали в течение 6 дней в 50 нг/мл rhM-CSF (R&D systems) с добавлением rhM-CSF каждые два дня. Через 6 дней макрофаги отделяли от колбы(колб) для культивирования с помощью TrypLE Express (Gibco) и метили с помощью Celltrace Violet (2 мкМ, ThermoFisher). Клетки-мишени метили с помощью CFSE (2 мкМ, ThermoFisher). В круглодонных 96-луночных планшетах клетки-мишени ($1 \times 10^4$ клеток/лунка) сначала инкубировали с указанными концентрациями каждого тестируемого образца в течение 30 минут. Затем в соответствующие лунки добавляли меченые макрофаги ($8 \times 10^4$ клеток/лунка) и планшеты инкубировали в течение дополнительных 2 часов. Клетки окрашивали красителем Zombie NIR (Biolegend) для различения живых и мертвых клеток и фиксировали. Фагоцитоз количественно определяют посредством Celesta HTS (BD Biosciences) с анализом данных в FlowJo 10.5.3. Данные гейтировали по отдельным живым клеткам и % фагоцитоза рассчитывали следующим образом: % фагоцитоза = 100 x (количество CFSE+ клеток, Celltrace Violet+ клетки)/(общее количество CFSE+ клеток). Данные представляли в виде графиков и анализировали с использованием GraphPad Prism.

Анализы CDC

**[01001]** CDC измеряли в анализе цитотоксичности DELFIA. Раковые клетки-мишени PL21 метили реагентом для мечения BATDA. Затем меченые клетки-мишени инкубировали с указанными концентрациями TriNKET или mAb в течение 30 мин для обеспечения опсонизации. Сыворотку крови человека добавляли до конечной

концентрации 5%. Затем планшет инкубировали в течение 60 минут перед прекращением анализа. Переносили 20 мкл супернатанта клеточной культуры в желтый планшет DELFIA. Добавляли по 200 мкл раствора европия на лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут при встряхивании в темноте. Затем измеряли флуоресценцию на планшетном ридере Spectramax.

**Результаты и обсуждение**

Лизис выдержанными в состоянии покоя NK-клетками человека CLEC12A+ клеток-мишеней

**[01002]** Определяли характеристики видов активности AB0089 и AB0192 с использованием выдержанных в состоянии покоя первичных NK-клеток человека от здоровых доноров при кокультивировании с CLEC12A+ человека линией PL21, либо с линией HL60 . AB0089 и AB0192 сравнивали с их родительскими mAb hIgG1 AB0305 и AB0306 соответственно. На **фиг. 194** показан репрезентативный график лизиса лейкозных клеток-мишеней PL21 выдержанными в состоянии покоя NK-клетками человека в присутствии AB0089. AB0089 продемонстрировало дозозависимую активность усиления лизиса клеток, которая была более мощной и достигала более высокого максимального лизиса, чем демонстрируемая родительским mAb AB0305. Результаты сходных анализов цитотоксичности с использованием NK-клеток, полученных от в общей сложности шести доноров, обобщены в таблице 190. Во всех анализах активность AB0089 в усилении осуществляемого NK-клетками лизиса клеток-мишеней PL21 характеризовалась средним значением EC50, составляющим 0,25 ± 0,24 нМ.

**Таблица 190. Значения EC50 AB0089 и % макс. лизиса для осуществляемого выдержанными в состоянии покоя NK-клетками лизиса клеток PL21** (значения представляют среднее значение по результатам анализов в общей сложности шести доноров ± стандартное отклонение)

| Молекула | EC50 (нМ) | % макс. лизиса |
|---|---|---|
| **AB0089** | 0,25 ± 0,24 | 17 ± 10 |
| **AB0305** | ND | ND |

ND = не определено

**[01003]** На **фиг. 195** показан репрезентативный график лизиса лейкозных клеток-мишеней HL60 выдержанными в состоянии покоя первичными NK-клетками человека в присутствии AB0089. Опять-таки, AB0089 продемонстрировало более мощный дозозависимый лизис и более высокий специфический лизис в целом, чем его родительское mAb AB0305. Результаты анализов с использованием NK-клеток,

полученных от четырех здоровых доноров, продемонстрировали среднее значение EC50, составляющее 0,09 ± 0,05 нМ, как представлено в таблице 191.

**Таблица 191. Значения EC50 и % макс. лизиса для AB0089 в отношении осуществляемого выдержанными в состоянии покоя NK-клетками лизиса клеток HL60** (значения представляют среднее значение по результатам анализов в общей сложности четырех доноров ± стандартное отклонение)

| Молекула | EC50 (нМ) | % макс. лизиса |
|---|---|---|
| **AB0089** | 0,09 ± 0,05 | 47 ± 14 |
| **AB0305** | ND | ND |

ND = не определено

**[01004]** На **фиг. 196** показан репрезентативный график лизиса лейкозных клеток-мишеней PL21 выдержанными в состоянии покоя NK-клетками человека в присутствии AB0192. AB0192 продемонстрировало дозозависимую активность усиления лизиса клеток, которая была более мощной и достигала более высокого максимального лизиса, чем демонстрируемая родительским mAb AB0306. Результаты сходных анализов цитотоксичности с использованием NK-клеток, полученных от в общей сложности шести здоровых доноров, обобщены в таблице 192. Во всех анализах активность AB0192 в усилении осуществляемого NK-клетками лизиса клеток-мишеней PL21 характеризовалась средним значением EC50, составляющим 0,61 ± 0,60 нМ.

**Таблица 192. Значения EC50 AB0192 и % макс. лизиса для осуществляемого выдержанными в состоянии покоя NK-клетками лизиса клеток PL21** (значения представляют среднее значение по результатам анализов в общей сложности шести доноров ± стандартное отклонение)

| Молекула | EC50 (нМ) | % макс. лизиса |
|---|---|---|
| **AB0192** | 0,61 ± 0,60 | 18 ± 13 |
| **AB0306** | ND | ND |

ND = не определено

**[01005]** На **фиг. 197** показан репрезентативный график лизиса лейкозных клеток-мишеней HL60 выдержанными в состоянии покоя первичными NK-клетками человека в присутствии AB0192. Опять-таки, AB0192 продемонстрировало более мощный

дозозависимый лизис и более высокий специфический лизис в целом, чем его родительское mAb. Результаты анализов с использованием NK-клеток, полученных от четырех здоровых доноров, продемонстрировали среднее значение EC50, составляющее 0,30 ± 0,27 нМ, как представлено в таблице 193.

**Таблица 193. Значения EC50 и % макс. лизиса для AB0192 в отношении осуществляемого выдержанными в состоянии покоя NK-клетками лизиса клеток HL60** (значения представляют среднее значение по результатам анализов в общей сложности четырех доноров ± стандартное отклонение)

| Молекула | EC50 (нМ) | % макс. лизиса |
|---|---|---|
| **AB0192** | 0,30 ± 0,27 | 50 ± 14 |
| **AB0306** | ND | ND |

ND = не определено

Активность AB0089 в присутствии растворимого MIC-A

**[01006]** Авторы настоящего изобретения также тестировали активность AB0089 в присутствии растворимого лиганда NKG2D. Для этих анализов авторы настоящего изобретения отобрали для использования рекомбинантную версию лиганда NKG2D MIC-A. MIC-A характеризуется широкой экспрессией при онкологических заболеваниях и, как известно, отщепляется с клеточной поверхности, что приводит в результате к накоплению в сыворотке крови пациента. Растворимый MIC-A-Fc добавляли в систему для анализа осуществляемого NK-клетками цитолиза в концентрации 20 нг/мл, что является концентрацией, соответствующей физиологической, в сыворотке крови, обнаруживаемой у пациентов, имеющих рак. На **фиг. 198** показаны кривые доза-ответ для AB0089 и родительского mAb AB0305 в анализе цитолиза, осуществляемого первичными NK-клетками в отношении клеток-мишеней PL21 в отсутствие и в присутствии растворимой MIC-A. Добавление MIC-A не оказывало эффекта в отношении активности или максимального лизиса, достигаемых с помощью AB0089 (значения EC50 и максимального лизиса см. в таблице 194).

**Таблица 194. Значения EC50 и % макс. лизиса для AB0089 в отношении лизиса клеток PL21 NK-клетками с sMIC-A-Fc**

| Молекула | EC50 (нМ) | % макс. лизиса |
|---|---|---|
| **AB0089** | 0,32 | 15 |

| | | |
|---|---|---|
| **AB0089 + sMIC-A-Fc** | 0,26 | 13 |
| **AB0305** | ND | ND |
| **AB0305 + sMIC-A-Fc** | ND | ND |

ND = не определено

Обеспечиваемая AB0089 стимуляция выработки IFNγ и дегрануляции в NK-клетках

**[01007]** В дополнение к непосредственному лизису клеток-мишеней, при активации NK-клетки также вырабатывают цитокины. Таким образом, авторы настоящего изобретения хотели изучить альтернативные следствия активации NK в дополнение к лизису клеток-мишеней. Авторы настоящего изобретения решили проанализировать выработку IFNγ и дегрануляцию CD107a в NK-клетках, кокультивируемых с CLEC12A+ клетками AML в присутствии AB0089. Выдержанные в состоянии покоя NK-клетки в PBMC при кокультивировании с клетками-мишенями PL21 и HL60 продемонстрировали небольшую базальную индукцию дегрануляции CD107a или накопление внутриклеточного IFNγ через четыре часа (**фиг. 199** и **фиг. 200** соответственно). Добавление AB0089 к кокультурам приводило к надежной индукции дегрануляции и выработки IFNγ дозозависимым образом. Напротив, ни родительское mAb AB0305, ни не нацеленное на CLEC12A TriNKET F3'-паливизумаб не продемонстрировали устойчивого увеличения количества CD107a+IFNγ+ NK-клеток. Анализы проводили с материалами трех независимых доноров PBMC в кокультурах с клетками-мишенями PL21 или HL60; результаты сведены в таблицах 195 и 196 соответственно.

**Таблица 195. Сводные данные по индукции NK-клетками IFNγ и CD107a при кокультивировании с клетками PL21** (значения представляют среднее значение по результатам анализов в общей сложности трех доноров ± стандартное отклонение)

| **Молекула** | **EC50 (нМ)** | **% макс.** |
|---|---|---|
| **AB0089** | 0,08 ± 0,05 | 15,3 ± 4,0 |
| **AB0305** | ND | ND |
| **F3'-паливизумаб** | ND | ND |

ND = не определено

**Таблица 196. Сводные данные по индукции NK-клетками IFNγ и CD107a при кокультивировании с клетками HL60** (значения представляют среднее значение по результатам анализов в общей сложности трех доноров ± стандартное отклонение)

| Молекула | EC50 (нМ) | % макс. |
|---|---|---|
| **AB0089** | 0,05 ± 0,03 | 15,0 ± 4,6 |
| **AB0305** | ND | ND |
| **F3'-паливизумаб** | ND | ND |

ND = не определено

AB0089 индуцирует ADCP-активность

**[01008]** Fc-домен антитела к IgG1 человека может опосредовать три различных типа эффекторных функций.

**[01009]** Одним типом Fc-опосредованной эффекторной функции является ADCC, которая осуществляется за счет вовлечения CD16 на NK-клетках; для AB0089 были определены всесторонние характеристики стимуляции NK-клеток. Второй Fc-опосредованной эффекторной функцией является ADCP, когда макрофаги атакуют и поглощают клетки, покрытые антителами. Для AB0089 и альтернативных CLEC12A-специфичных TriNKET авторы настоящего изобретения хотели оценить их способность индуцировать ADCP в опсонизированных клетках-мишенях. Авторы настоящего изобретения использовали систему анализа in vitro с макрофагами M0, полученными в результате культивирования очищенных CD14+ моноцитов с M-CSF, в качестве эффекторных клеток. CLEC12A+ клетки-мишени метили красителем CFSE Cell Trace, опсонизировали тестируемыми образцами и кокультивировали с макрофагами M0, мечеными фиолетовым красителем Cell Trace. Фагоцитоз анализировали посредством проточной цитометрии как события регистрации фиолетового красителя Cell Trace+ красителя CFSE Cell Trace+ (двойной положительный результат).

**[01010]** AB0089 и другие CLEC12A-специфичные TriNKET AB0237 и AB0192 усиливали фагоцитоз клеток AML PL21 макрофагами M0. Все родительские mAb для каждого TriNKET также проявляли способность индуцировать осуществляемый макрофагами M0 фагоцитоз опсонизированных клеток-мишеней, однако на более низком максимальном уровне по сравнению с соответствующими им TriNKET (**фиг. 201**). AB0237si, которое несет мутации в домене CH2 для подавления связывания Fcγ-рецептора, служило в качестве отрицательного контроля. Как и ожидалось, AB0237si не

могло опосредовать ADCP опсонизированных клеток-мишеней. Результаты с использованием макрофагов M0, полученных от трех разных доноров, сведены в таблице 197.

**Таблица 197. Сводные данные по значениям EC50 и % макс. для ADCP-активности** (значения представляют среднее значение по результатам анализов в общей сложности трех доноров ± стандартное отклонение)

| **Молекула** | **EC50 (нМ)** | **% макс.** |
|---|---|---|
| AB0237si | ND | ND |
| AB0037 | 0,05 ± 0,06 | 11 ± 9 |
| AB0237 | 0,08 ± 0,07 | 12 ± 8 |
| AB0305 | 0,02 ± 0,01 | 10 ± 7 |
| AB0089 | 0,03 ± 0,02 | 15 ± 10 |
| AB0306 | ND | ND |
| AB0192 | 0,03 ± 0,02 | 15 ± 7 |

ND = не определено

AB0089 не обладает CDC-активностью

**[01011]** Третьей эффекторной функцией антител изотипа IgG1 человека является инициация каскада комплемента, что приводит к запуску комплементзависимой цитотоксичности (CDC). AB0089 сконструировано с использованием домена Fc IgG1 человека; поэтому авторы настоящего изобретения хотели понять способность AB0089 стимулировать CDC-активность. Авторы настоящего изобретения использовали клетки PL21 в качестве мишеней и 5% сыворотку крови человека в качестве источника факторов системы комплемента. Ни AB0089, ни его родительское mAb AB0305 не стимулировали опосредованное комплементом уничтожение клеток AML PL21 (**фиг. 202**). Напротив, для положительного контрольного антитела к MHC класса I (клон W6/32) было показано дозозависимый лизис клеток-мишеней PL21 в присутствии сыворотки крови человека, подтверждая наличие в сыворотке крови активных факторов системы комплемента. Анализ для определения характеристик клеток показал сходные уровни экспрессии CLEC12A и MHC класса I в клетках-мишенях PL21.

**[01012]** AB0089 продемонстрировало мощную активность в различных контекстах, соответствующих физиологическим. AB0089 было впервые протестировано в анализах уничтожения CLEC12A+ клеток-мишеней с использованием выдержанных в состоянии покоя первичных NK-клеток человека. Авторы настоящего изобретения решили протестировать уничтожение CLEC12A+ клеток-мишеней, полученных из клеток при

AML, являющегося заболеванием, при котором сверхэкспрессируется CLEC12A в клинической практике. Для этих экспериментов авторы настоящего изобретения выбрали HL60 и PL21 в качестве репрезентативных клеточных линий AML.

**[01013]** AB0089 усиливало осуществляемый первичными NK-клетками цитолиз обеих клеточных линий-мишеней и превосходило родительское антитело hIgG1 в усилении цитолиза. Авторы настоящего изобретения также исследовали влияние растворимого лиганда NKG2D на активность AB0089 и обнаружили, что физиологические уровни растворимого MIC-A-Fc не изменяли активность AB0089 при лизисе клеток.

**[01014]** В дополнение к лизису клеток, AB0089 также стимулировало выработку цитокинов в NK-клетках, кокультивируемых с CLEC12A+ клетками-мишенями. AB0089 усиливало внутриклеточное накопление IFNγ, а также дегрануляцию NK-клеток в кокультурах PBMC человека с клетками AML PL21 и HL60. Значения EC50 для индукции IFNγ и CD107a с помощью AB0089 соответствовали значениям EC50, полученным в анализах лизиса клеток.

**[01015]** Наконец, авторы настоящего изобретения исследовали дополнительные механизмы действия AB0089. Было продемонстрировано, что AB0089 обеспечивает вовлечение макрофагов для опосредования ADCP AB0089-опсонизированных клеток-мишеней. Напротив, AB0089 не опосредует CDC AB0089-опсонизированных клеток-мишеней.

**[01016]** Было продемонстрировано, что AB0089 обладает мощной активностью в отношении CLEC12A+ раковых клеток, которая осуществляется посредством различных эффекторов, включая NK-клетки и макрофаги. Более того, активность AB0089 сохранялась в присутствии растворимого лиганда MIC-A NKG2D в концентрации, соответствующей физиологической.

## Пример 19. Связывание AB0089 с CLEC12A+ клеточными линиями и клетками первичного AML

**Цели**

**[01017]** Измерить связывание AB0089 с CLEC12A-экспрессирующими клетками человека. Количественно определить удерживание на поверхности CLEC12A после инкубации с AB0089. Продемонстрировать связывание AB0089 с образцами от пациентов с первичным AML и сравнить с паттерном экспрессии CLEC12A.

**План исследования**

**[01018]** Репрезентативные клеточные линии с положительной поверхностной экспрессией CLEC12A использовали для определения характеристик связывания AB0089

с клетками. Образцы от пациентов с первичным AML получали от Creative Bioarray и BioIVT. Связывание AB0089 и родительского mAb AB0305 сравнивали с коммерчески доступным антителом к CLEC12A.

**Материалы и способы**

Первичные клетки и клеточные линии

**[01019]** Раковые клеточные линии человека были получены из исследовательских банков клеток. Использовались следующие клеточные линии (номер изделия; поставщик): PL21 (ACC-536; DSMZ), HL60 (CCL-240; ATCC), Ba/F3-hCLEC12A (полученный самостоятельно) и Ba/F3 (доступный от DSMZ ACC-300).

**[01020]** CLEC12A человека вводили в родительские клетки Ba/F3 путем ретровирусной трансдукции.

Материалы для культивирования клеток

**[01021]** Применялись следующие изделия (поставщик; номер изделия): RPMI-1640 (Corning; 10040CV), DMEM (Corning; 10031CV), инактивированная нагреванием FBS (ThermoFisher; 16140-071), GlutaMax I (ThermoFisher ; 35050-061), пеницил./стрептом.(ThermoFisher; 151450-122) и 2-меркаптоэтанол (MP Biomedicals; 02194705).

Материалы для анализа

**[01022]** Применялись следующие изделия (поставщик; номер изделия): забуференный Hepes солевой раствор (Alfa Aesar; J67502), реагент BATDA (Perkin Elmer; C136-100), 96-луночный круглодонный планшет TC (Corning; 3799), раствор европия (Perkin Elmer; C135-100) и желтые 96-луночные микропланшеты DELFIA (Perkin Elmer; AAAND-0001).

**[01023]** Применялись следующие тестируемые образцы (описание): AB0237 (CLEC12A-нацеленное TriNKET с NKG2D-связывающим Fab (A49) и CLEC12A-связывающим доменом scFv (1602)), AB0300 (AB0237 с мутацией LALAPG в домене CH2), AB0237-Dead-2D (AB0237, NKG2D-связывающий домен, лишенный способности связывания в результате мутации), mAb AB0037 (гуманизированное mAb к CLEC12A 1602), AB0089 (CLEC12A-нацеленное TriNKET с NKG2D-связывающим Fab (A49) и CLEC12A-связывающим доменом scFv (1739)), mAb AB0305 (гуманизированное mAb к CLEC12A 1739), AB0192 (CLEC12A-нацеленное TriNKET с NKG2D-связывающим Fab (A49) и CLEC12A-связывающим доменом scFv (1797)), mAb AB0306 (гуманизированное mAb к CLEC12A 1797), hcFAE-A49.h6E7 (CLEC12A-нацеленное TriNKET с NKG2D-связывающим Fab (A49) и CLEC12A-связывающий домен Fab (Genentech 6E7)) и hcFAE-A49.CLL1-Merus (CLEC12A-нацеленное TriNKET с NKG2D-связывающим Fab (A49) и CLEC12A-связывающим доменом Fab (средство связывания CLL-1 Merus)).

**[01024]** Применялись следующие приборы (серийный номер): Attune NxT (2AFC228271119), BD Celesta (H66034400085) и BD Celesta (H66034400160).

Получение реагентов

**[01025]** Среды RPMI для культивирования первичных клеток получали, начиная с RPMI-1640. Для получения полных сред добавляли 10% HI-FBS, 1x GlutaMax, 1x пеницил./стрептом. и 50 мкМ 2-меркаптоэтанола. Среды RPMI для культивирования клеток получали, начиная с RPMI-1640. Для получения полных сред добавляли 10% HI-FBS, 1x GlutaMax и 1x пеницил./стрептом. 1x HBS получали путем разбавления 1 части 5x HBS в 4 частях DI-воды. Раствор стерилизовали фильтрованием перед применением.

Связывание и выявление связанного с поверхностью mAb/TriNKET

**[01026]** Высевали 100000 клеток на лунку в 96-луночный планшет для окрашивания для FACS. Клетки промывали с помощью PBS. Клетки инкубировали в красителе для живых/мертвых клеток, разбавленном в PBS в соотношении 1:2000, в течение 15 минут, затем промывали с помощью буфера для FACS. TriNKET или mAb разбавляли в буфере для FACS и к клеткам добавляли 50 мкл смеси, содержащие разбавленные TriNKET или mAb. Клетки инкубировали на льду в течение 20 минут. После инкубации клетки промывали с помощью буфера для FACS. Вторичное антитело к Fc IgG человека разбавляли в буфере для FACS и добавляли по 50 мкл на лунку для выявления связанных TriNKET или mAb. Клетки инкубировали в течение 20 минут на льду, затем промывали с помощью буфера для FACS. В каждую лунку добавляли по 50 мкл фиксирующего буфера и инкубировали клетки в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки промывали с помощью буфера для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS для анализа с использованием BD FACS Celesta SN № H66034400085 или BD FACS Celesta SN № H66034400160. Клетки, представляющие интерес, идентифицировали с использованием графика зависимости FSC и SSC и вокруг клеток рисовали гейт соответствующей формы. Среди гейтированных клеток дублетные клетки удаляли путем просмотра графика зависимости FSC-H и FSC-A. В пределах одноклеточной популяции гейтировали живые клетки. В гейтах живых клеток рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) каждого образца и контроля, представляющего собой отдельно вторичное антитело. Кратное изменение по сравнению с фоновым значением (FOB) рассчитывали как соотношение MFI тестируемого образца и фонового MFI контроля, представляющего собой отдельно вторичное антитело. Данные аппроксимировали согласно четырехпараметрической кривой нелинейной регрессии с использованием GraphPad Prism 7.0.

Анализы удерживания на поверхности

**[01027]** Высевали 100000 клеток на лунку в дублированные 96-луночные планшеты для окрашивания для FACS. Клетки промывали с помощью буфера для FACS. Тестируемые образцы разбавляли до 40 нМ и добавляли в каждый из дублированных планшетов. Первый планшет инкубировали на льду в течение 2 часов, тогда как второй планшет перемещали на два часа в среду с 37°C. После инкубации клетки промывали с помощью PBS и клетки инкубировали в красителе для живых/мертвых клеток, разбавленном в PBS в соотношении 1:2000, в течение 15 минут, затем промывали с помощью буфера для FACS. Вторичное антитело к Fc IgG человека разбавляли в буфере для FACS и добавляли по 50 мкл на лунку для выявления связанных TriNKET или mAb. Клетки инкубировали в течение 20 минут на льду, затем промывали с помощью буфера для FACS. В каждую лунку добавляли по 50 мкл фиксирующего буфера и инкубировали клетки в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки промывали с помощью буфера для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS для анализа с использованием BD FACS Celesta SN № H66034400085 или BD FACS Celesta SN № H66034400160. Клетки, представляющие интерес, идентифицировали с использованием графика зависимости FSC и SSC и вокруг клеток рисовали гейт соответствующей формы. Среди гейтированных клеток дублетные клетки удаляли путем просмотра графика зависимости FSC-H и FSC-A. В пределах одноклеточной популяции гейтировали живые клетки. В гейтах живых клеток рассчитывали MFI каждого образца. MFI изотипического контроля hIgG1 вычитали из MFI всех тестируемых образцов. Затем удерживание на поверхности рассчитывали следующим образом:

% удерживания на поверхности = (MFI образцов "2 часа при 37°C"/ MFI образцов "2 часа на льду") * 100

Анализ связывания AB0089 в образцах первичного AML

**[01028]** Замороженные образцы от пациентов с AML размораживали при 37°C и немедленно использовали в анализах связывания. Тестируемые образцы, hIgG1 изотипического контроля и коммерческий реагент клона антитела к CLEC12A 50C1 метили с применением набора для мечения Biotium Mix-n-Stain CF568; при этом следовали инструкциям изготовителя. Образцы AML окрашивали смесью антител, как описано в таблицах 198 и 199. Образцы анализировали с применением цитометра Attune NxT, оснащенного автоматическим пробоотборником CytKick Max. Исходные данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo X.

**Таблица 198. Панель образцов от пациентов с AML для проточной цитометрии**

| Флуорофор | Антиген | Коэффициент разбавления | Поставщик | № по катал. |
|---|---|---|---|---|
| **BV421** | CD38 | 100 | BioLegend | 368514 |
| **BV510** | CD33 | 100 | BioLegend | 366610 |
| **BV605** | CD15 | 100 | BioLegend | 323032 |
| **BV650** | CD14 | 100 | BioLegend | 301836 |
| **BV785** | CD45 | 50 | BioLegend | 368528 |
| **FITC** | CD34 | 50 | StemCell | 60013FI |
| **PE или CF568** | CLEC12A | | См. таблицу 200 | |
| **PE-Cy7** | CD117 | 100 | BioLegend | 313212 |
| **APC** | CD13 | 100 | BioLegend | 301706 |
| **NIR** | Живые-мертвые | 1000 | BioLegend | 423105 |
| | TruStain FcX | 25 | BioLegend | 422302 |
| | Буфер BV | 25 | BD | 566349 |
| | Средство блокирования моноцитов | 25 | BioLegend | 426103 |

**Таблица 199. Антитела к CLEC12A и меченые тестируемые образцы**

| Молекула | № партии |
|---|---|
| **hIgG1** | EXP20000921 – RMR 18Mar2020 |
| **AB0305** | EXP200001542 – RMR 22May2020 |
| **AB0089** | EXP200001542 – RMR 22May2020 |
| **AB0306** | EXP200001542 – RMR 22May2020 |
| **AB0192** | EXP200001542 – RMR 22May2020 |
| **50C1** | EXP200001542 – RMR 22May2020 |

**Таблица 200. Образцы от пациентов с первичным AML**

| ID образца | Ткань | Подтип AML | Поставщик |
|---|---|---|---|
| 19217S | PBMC | M3 | Creative Bioarray |
| 19224S | PBMC | M1 | Creative Bioarray |
| 19233S | PBMC | M1 | Creative Bioarray |
| 19246S | PBMC | M5a | Creative Bioarray |
| 19258S | Костный мозг | M5b | Creative Bioarray |
| Y1724 | PBMC | M4 | Creative Bioarray |
| W5299 | PBMC | M2 | Creative Bioarray |
| W5300 | PBMC | M3 | Creative Bioarray |
| W5313 | Костный мозг | M1 | Creative Bioarray |
| W5294 | PBMC | M0 | Creative Bioarray |

**Результаты и обсуждение**

CLEC12A-специфичные TriNKET связывают клеточные линии, экспрессирующие CLEC12A человека

**[01029]** Связывание CLEC12A-специфичных TriNKET и их родительских mAb тестировали с использованием трех клеточных линий, экспрессирующих CLEC12A человека (**фиг. 203**). Клетки Ba/F3 мыши были сконструированы для экспрессии CLEC12A человека, тогда как PL21 и HL60 представляют собой клеточные линии AML человека с экспрессией эндогенного CLEC12A.

**[01030]** В качестве компараторов были созданы два инструмента TriNKET с использованием CLEC12A-связывающих доменов от Genentech (h6E7) и Merus (CLL1-Merus), известных в открытом доступе. TriNKET Duobody с CLEC12A-связывающими доменами Fab объединяли в пару с NKG2D-связывающим Fab A49. TriNKET Duobody hcFAE-A49.h6E7 получали из связующего средства Genentech, а hcFAE-A49.CLL1-Merus получали из связующего средства Merus.

**[01031]** Ведущее TriNKET AB0089 и альтернативные CLEC12A-специфичные TriNKET AB0237 и AB0192 связывали CLEC12A-экспрессирующие клетки со значениями активности, находящимися в наномолярном диапазоне (таблица 4). AB0089 обладало сниженной активностью, однако обеспечивало достижение более высокого максимального значения FOB по сравнению с родительским mAb AB0305 в трех протестированных клеточных линиях. AB0237 продемонстрировало связывание, сравнимое с таковым у родительского mAb AB0037, обеспечивая достижение значений активности в пределах 2-кратного отличия друг от друга для всех трех клеточных линий. Варианты AB0237, AB0237-Dead 2D и AB0300, несущие мутации в доменах связывания

NKG2D и CD16 соответственно, продемонстрировали сходное связывание клеток по сравнению с AB0237. Напротив, AB0192 продемонстрировало сниженную активность и максимальное значение FOB по сравнению с его родительским mAb AB0306.

**[01032]** По сравнению с инструментами TriNKET, AB0089 продемонстрировало клеточную нагрузку, сравнимую с таковой в случае hcFAE-A49.CLL1-Merus, и более высокую клеточную нагрузку, чем в случае hcFAE-A40.h6E7. Кроме того, AB0237, связывающее клеточные линии с CLEC12A, было более активным, чем hcFAE-A49.CLL1-Merus, и сравнимым по активности с hcFAE-h6E7. Все значения EC50 для активности связывания и максимальные значения FOB для связывания сведены в таблице 201.

**Таблица 201. Сводные данные по значениям связывания клеток**

Средние значения EC50 в нМ и средние значения FOB с ± стандартным отклонением из трех независимых экспериментов.

| | **HL60** | | **PL21** | | **Ba/F3-hCLEC12A** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **EC50, нМ** | **FOB** | **EC50, нМ** | **FOB** | **EC50, нМ** | **FOB** |
| **AB0089** | 1,08 ± 0,24 | 70 ± 28 | 0,34 ± 0,13 | 16 ± 8 | 2,28 ± 0,59 | 434 ± 258 |
| **AB0305** | 0,12 ± 0,01 | 53 ± 16 | 0,12 ± 0,01 | 15 ± 9 | 0,67 ± 0,20 | 279 ± 182 |
| **AB0192** | 0,61 ± 0,15 | 42 ± 14 | 0,37 ± 0,08 | 12 ± 5 | 1,33 ± 0,41 | 325 ± 242 |
| **AB0306** | 0,26 ± 0,08 | 47 ± 10 | 0,18 ± 0,05 | 12 ± 5 | 0,68 ± 0,09 | 303 ± 205 |
| **AB0237** | 1,01 ± 0,14 | 66 ± 18 | 0,52 ± 0,09 | 15 ± 6 | 1,54 ± 0,35 | 341 ± 249 |
| **AB0037** | 0,52 ± 0,12 | 51 ± 14 | 0,52 ± 0,09 | 13 ± 7 | 1,40 ± 0,24 | 301 ± 173 |
| **AB0237 Dead-2D** | 1,19 ± 0,15 | 59 ± 14 | 0,63 ± 0,14 | 14 ± 6 | 2,35 ± 0,62 | 357 ± 233 |
| **AB0300** | 1,50 ± 0,19 | 65 ± 20 | 1,58 ± 0,14 | 18 ± 6 | 2,92 ± 0,57 | 368 ± 249 |
| **hcFAE-A49.h6E7** | 1,33 ± 0,22 | 31 ±10 | 0,55 ± N/A | 10 ± 5 | 2,87 ± 0,56 | 318 ± 212 |
| **hcFAE-A49.CLL1-Merus** | 2,79 ± 1,04 | 59 ± 24 | 1,13 ± 0,14 | 15 ± 10 | 4,45 ± 0,78 | 369 ± 186 |

Удерживание на поверхности CLEC12A-TriNKET

**[01033]** В литературе описана интернализация CLEC12A после лигирования антител. С использованием этого явления были разработаны конъюгаты антитело-лекарственное средство, нацеливающиеся на CLEC12A, в случае которых для уничтожения клеток-мишеней требуется интернализация конъюгированных лекарственных средств. Однако

активность TriNKET требует удерживания CLEC12A на клеточной поверхности в комплексе с TriNKET, чтобы обеспечить вовлечение NK-клеток и эффекторную активность в отношении CLEC12A+ раковых клеток. Чтобы лучше понять удерживание CLEC12A на клеточных поверхностях в присутствии CLEC12A-специфичные TriNKET, авторы настоящего изобретения исследовали связывание насыщающих концентраций каждого TriNKET и родительского mAb с CLEC12A+ клеточными линиями после двухчасовой инкубации при 37°C по сравнению с инкубацией на льду.

**[01034]** В случае связывания с клетками в течение 2 часов при 37°C, 90% или больше CLEC12A удерживались на клеточной поверхности с каждым из TriNKET. На **фиг. 204** показаны примеры удерживания на поверхности AB0089, AB0192, AB0237 и их родительских антител в линиях AML HL60 и PL21. Данные из трех независимых экспериментов сведены в таблице 202. Оказалось, что AB0089 демонстрирует превосходящее удерживание на поверхности по сравнению с другими CLEC12A-специфичные TriNKET и родительскими mAb.

**[01035]** Хотя AB0089 продемонстрировало более низкий сигнал связывания после инкубации на льду по сравнению с AB0237, но характеризовалось сходным сигналом после инкубации при 37°C в течение двух часов, что могло приводить к завышенным значениям удерживания на поверхности для AB0089 (**фиг. 205**). Тем не менее, эти данные предполагают температурно-зависимое связывание AB0089 для достижения равновесного состояния, которое может быть результатом двухстадийного механизма связывания согласно данным по кинетике связывания (пример 17).

**[01036]** Напротив, AB0192 и его родительское mAb AB0306, которое происходит из другого родительского mAb мыши, демонстрировали сходное удерживание на поверхности клеток HL60 и PL21. Эти данные показывают, что удерживание CLEC12A на поверхности может зависеть от того, связано ли оно одновалентно (как в случае F3' TriNKET) или двухвалентно (как действует mAb), а также от эпитопа специфического связующего средства.

**Таблица 202. Сводные данные по удерживанию CLEC12A на клеточной поверхности**

Значения показывают среднее процентное значение удерживания на поверхности для данного тестируемого образца после двух часов при 37°C по сравнению с тем же тестируемым образцом после двух часов на льду в трех экспериментах ± стандартное отклонение.

| | **HL60** | **PL21** |
|---|---|---|
| **AB0089** | 147 ± 13 | 124 ± 12 |

| | | |
|---|---|---|
| **AB0305** | 90 ± 7 | 92 ± 2 |
| **AB0192** | 103 ± 8 | 101 ± 10 |
| **AB0306** | 114 ± 4 | 106 ± 9 |
| **AB0237** | 106 ± 4 | 91 ± 9 |
| **AB0037** | 74 ± 1 | 79 ± 3 |

AB0089 связывает CLEC12A в образцах от пациентов с AML человека

**[01037]** Первичные образцы костного мозга и PBMC получили от 10 пациентов с AML (информацию об образцах см. в таблице 200) для изучения связывания AB0089 и его родительского mAb AB0305 на клетках первичного AML. Авторы настоящего изобретения сравнивали паттерны связывания меченых флуорофором тестируемых образцов AB0089 и AB0305 с коммерчески доступными клоном 50C1 антитела к CLEC12A (Lahoud et al, The Journal of Immunology. 2009; 182:7587-7594). Среди 10 доноров процентное содержание CLEC12A+ клеток в гейте бластов AML варьировало в широком диапазоне, от ~40 до 95%. Авторы настоящего изобретения анализировали образцы от пациентов с AML, относящиеся к разным FAB-подтипам, что могло послужить причиной вариации в наблюдаемых значениях экспрессии CLEC12A и соотношения.

**[01038]** AB0089 и AB0305 демонстрируют сравнимый паттерн связывания с клоном 50C1 антитела к CLEC12A в 10 тестируемых образцах от пациентов с AML (**фиг. 206**). Авторы настоящего изобретения дополнительно гейтировали бласты для исследования CD34+CD38- субпопуляции, которая обогащена в случае лейкозных стволовых клеток, для каждого образца. Опять-таки, AB0089 и AB0305 характеризовались окрашиванием на CD34+CD38- бластах, сходным с таковым для клона 50C1 (**фиг. 207**). В целом эти данные подтверждают, что AB0089 способно связывать CLEC12A на бластах первичного AML, а также на CD34+CD38- субпопуляции, которая является обогащенной в случае LSC.

**[01039]** AB0089 и другие CLEC12A-специфичные TriNKET связывались с Ba/F3 клетками, эктопически экспрессирующими CLEC12A человека, а также с клетками AML PL21 и HL60, экспрессирующими эндогенный CLEC12A, дозозависимым образом со сходными значениями активности, находящимися в наномолярном диапазоне, во всех линиях. Несмотря на сообщения в литературе об интернализации CLEC12A после лигирования с антителом, AB0089 и оба альтернативных CLEC12A-специфичных TriNKET AB0237 и AB0192 продемонстрировали высокое удерживание CLEC12A на клеточной поверхности после двух часов инкубации с CLEC12A+ клеточными линиями HL60 и PL21. Наконец, AB0089 и его родительское mAb AB0305 связывались сходно с

коммерческим реагентом, представляющим собой клон 50C1 антитела к CLEC12A, на суммарных и CD34+CD38- бластах в образцах от пациентов с первичным AML от 10 доноров. Взятые вместе, эти данные подтверждают сильное связывание AB0089 с клетками, экспрессирующими CLEC12A, и указывают на то, что AB0089 связывается с бластами первичного AML.

**Пример 20. CLEC12A-специфичное TriNKET AB0089**

**Цели**

**[01040]** Целями данного исследования являются описание молекулярного формата, дизайна, структуры и характеристик CLEC12A-специфичного TriNKET AB0192. В частности, в данном отчете авторы настоящего изобретения a) описывают молекулярный формат и дизайн AB0192, b) предоставляют информацию об экспрессии и очистке AB0192, c) описывают основные биохимические и биофизические характеристики молекулы, d) определяют аффинность AB0192 в отношении рекомбинантных человеческих мишеней (CLEC12A, NKG2D и CD16a), e) демонстрируют связывание AB0192 с изогенными линиями и раковыми клеточными линиями AML, экспрессирующими CLEC12A человека, f) демонстрируют избирательность AB0192, g) определяют активность AB0192 в уничтожении раковых клеток AML, h) оценивают связываемый эпитоп, i) оценивают связывание с FcγR и FcRn и сравнивают с контрольным mAb к IgG1, j) описывают характеристики AB0192, установленные в исследованиях реализуемости, в том числе в испытании стабильности методом ускоренного старения, испытании при принудительном разложении и испытании технологичности.

**План исследования**

**[01041]** Мышиное mAb к CLEC12A человека (9F11.B7) было обнаружено при иммунизации мышей. 9F11.B7 гуманизировали, преобразовали в scFv и объединяли со связывающим плечом, представляющим собой Fab к NKG2D A49M-I, с получением F3'-TriNKET (AB0192). AB0192 оценивали по связыванию с рекомбинантным CLEC12A человека и яванского макака, связыванию с изогенными и раковыми клетками, экспрессирующими CLEC12A, а также по активности молекулы в отношении CLEC12A+ раковых клеток AML. Определяли биофизические и биохимические характеристики AB0192, включая термостабильность (DSC), гидрофобность (HIC) и pI (cIEF). Специфичность связывания оценивали посредством PSR, связывания с клетками, не экспрессирующими мишень, представляющую интерес, и посредством чипа HuProt™. AB0192 экспрессировали в двух разных клеточных линиях млекопитающих (Expi293 и ExpiCHO) и очищали с применением 2-стадийного способа очистки с использованием

платформы DragonflyTx. В полном объеме определяли характеристики связывающих свойств AB0192, включая CLEC12A, NKG2D, CD16a (V158 и F158), расширенную панель рецепторов Fcγ (CD32a (H131 и R131), CD16b, CD32b, CD16 яванского макака, CD64 человека и яванского макака) и FcRn (человека и яванского макака). Определяли характеристики связываемого эпитопа в эксперименте по сортировке с CLEC12A-связывающими молекулами от Merus и Genentech. И наконец, оценивали AB0192 в полной панели анализов реализуемости, включающей испытание стабильности методом ускоренного (40°C) старения в составе для платформы Dragonfly Tx (20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 6,0) и буфере 20 мМ цитрата, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0, испытание при принудительном разложении (длительное воздействие стрессового условия pH 5, pH 8, принудительное окисление) и испытание технологичности (замораживание/оттаивание, перемешивание, выдерживание при низком уровне pH).

**Материалы и способы**

**[01042]** Способы, применяемые для получения и определения характеристик AB0192, сходны с применяемыми в примере 17.

Тестируемые образцы

**[01043]** AB0192-002 (название записи в Benchling – AB0192), гуманизированное TriNKET, экспрессируемое в Expi293 (партия AB0192-002).

**[01044]** AB0192-005 (название записи в Benchling – AB0192), гуманизированное TriNKET, экспрессируемое в ExpiCHO (партия AB0192-005).

Белковые реагенты

**Таблица 203. Сводные данные по белковым реагентам**

| **Название** | **Изготовитель** | **Партия** |
|---|---|---|
| CLEC12A-His человека | Dragonfly Tx | 16Oct18GL |
| CLEC12A-K244Q-His человека | Dragonfly Tx | 30Apr18AC |
| CLEC12A-His яванского макака | Dragonfly Tx | 30May18AC |
| mFc-hNKG2D | Dragonfly Tx | 01Dec17AB |
| mFc-cNKG2D | Dragonfly Tx | 28Sep18GL |
| Гуманизированное mAb 16B8.C8 | Dragonfly Tx | AB0037-001 |
| hcFAE-A49.CLL1-Merus (TriNKET Duobody) | Dragonfly Tx | 10May18DF |
| hcFAE-A49.h6E7 (TriNKET Duobody) | Dragonfly Tx | 05Feb19DF |
| hcFAE-A49.теподитамаб (TriNKET Duobody) | Dragonfly Tx | 27Aug19XL |
| Трастузумаб | Roche | N3017H05 |
| Адалимумаб | AbbVie | 83364XH07 |

| Название | Изготовитель | Партия |
|---|---|---|
| Ритуксимаб | Dragonfly Tx | 19Apr19 MH |

**Результаты**

Обнаружение TriNKET AB0192

**[01045]** Субклон гибридомы 9F11.B7 был обнаружен посредством иммунизации линии мышей BALB/c с помощью рекомбинантного CLEC12A-his человека, ранее полученного в Green Mountain Antibodies (Берлингтон, Вирджиния, США).

**[01046]** Мышиный 9F11.B7 гуманизировали путем пересаживания мышиных CDR в соответствующий человеческий каркас (VH3-30*02 и VK1-33) без потери аффинности в отношении рекомбинантного CLEC12A или мишени, экспрессируемой на клеточной поверхности (фиг. 208). Вводили 7 мышиных обратных мутаций для сохранения архитектуры CDR. Гуманизированное mAb 9F11.B7 преобразовали в scFv и объединили в пару с NKG2D-нацеливающимся Fab A49 M-I с получением TriNKET F3' (AB00192). Для этого TriNKET были определены всесторонние характеристики и оно было назначено в качестве кандидата для участия в программе CLEC12A AB0192.

Молекулярный формат и дизайн

**[01047]** AB0192 представляет собой гетеродимерное трифункциональное антитело, которое перенаправляет активность NK- и T-клеток в отношении CLEC12A-экспрессирующих раковых клеток. AB0192 содержит три цепи: цепь H, цепь L и цепь S. Схематическое представление молекулы AB0192 представлено на фиг. 209. Цепь H представляет собой тяжелую цепь A49M-I, которая была выбрана из-за того, что она характеризуется низкой аффинностью, но при этом является мощным агонистом рецепторов NKG2D на NK- и цитотоксических T-клетках. Мутацию M-I вводили для замены остатка Met102 в CDRH3, который чувствителен к окислению, а следовательно может сообщать предрасположенность к неблагоприятной модификации. Цепь L представляет собой легкую цепь нацеливающегося антитела к NKG2D A49M-I. Цепь S содержит scFv, который с высокой аффинностью связывается с CLEC12A на раковых клетках AML. Оба домена scFv и Fab слиты с Fc IgG1 человека, который имеет нативную немодифицированную последовательность в домене CH2, где антитела связываются с Fc-рецепторами. Обе цепи несут несколько мутаций в домене CH3, введенных для обеспечения стабильной гетеродимеризации двух мономеров Fc. Имеется семь таких мутаций в Fc IgG1 AB0192: три мутации в цепи H (K360E, K409W, Y349C) и четыре мутации в цепи S (Q347R, D399V, F405T и S354C). Две из этих мутаций участвуют в образовании стабилизирующего мостика S-S (Y349C и S354C) между цепями H и цепью S (номенклатура согласно EU). scFv (ориентация VH-VL) в цепи S стабилизирован двумя

мутациями, вводящими мостик S-S ((H44)C и (L100)C, номенклатура согласно Chothia). Цепь S также содержит неиммуногенный линкер (G4S)4 между VH и VL scFv. Аминокислотная последовательность CLEC12A-нацеливающегося scFv основана на последовательности гуманизированного антитела 9F11.B7, полученного из гибридомы (Green Mountain Antibodies, Берлингтон, Вермонт, США). Аминокислотная последовательность Fab к NKG2D основана на полностью человеческом антителе A49M-I, полученном с применением технологии дрожжевого дисплея для белков человека (Adimab, Ливан, Нью-Гэмпшир, США).

*Описание вариантов с мутациями, касающимися гетеродимеризации*

**[01048]** Для аннотирования аминокислотных остатков в Fc использовалось соглашение о нумерации согласно EU.

**[01049]** Цепь H содержит следующие мутации:

K360E – мутация, обеспечивающая гетеродимеризацию, в домене CH3 Fc-области.

K409W – мутация, обеспечивающая гетеродимеризацию, в домене CH3 Fc-области.

Y349C – мутация, обеспечивающая стабилизацию дисульфидных связей между субъединицами, в домене CH3 Fc-области.

**[01050]** Мутации K360E/K409W в Fc-области цепи H предназначены для обеспечения взаимодействий, способствующих предпочтительному образованию гетеродимеров, с цепью S за счет гидрофобной/стерической комплементарности, а также электростатических взаимодействий дальнего действия (Choi *et al.*, (2013) *Mol Cancer Ther* 12(12):2748–59; Choi *et al.*, (2015) *Mol Immunol* 65(2):377–83). Мутацию Y349C вводили для образования дополнительной межцепочечной дисульфидной связи, представленной парой Y349C-(CH3-цепь-H) – S354C(CH3-цепь-S) (Choi e*t al.*, (2015) *Mol Immunol* 65(2):377–83.).

**[01051]** Цепь S содержит следующие мутации:

G44C – мутация, обеспечивающая стабилизацию дисульфидной связи в области VH scFv.

Q100C – мутация, обеспечивающая стабилизацию дисульфидной связи в области VL scFv.

Q347R – мутация, обеспечивающая гетеродимеризацию, в домене CH3 Fc-области.

D399V – мутация, обеспечивающая гетеродимеризацию, в домене CH3 Fc-области.

F405T – мутация, обеспечивающая гетеродимеризацию, в домене CH3 Fc-области.

S354C – мутация, обеспечивающая стабилизацию дисульфидных связей между субъединицами, в домене CH3 Fc-области.

**[01052]** Мутации G(H44)C и Q(L100)C вводили для стабилизации scFv за счет сконструированной дисульфидной связи между VH и VL. Стабилизация дисульфидной связи улучшает структурную и термическую стабильность scFv. Мутации Q347R/D399V/F405T в Fc-области цепи S были предназначены для обеспечения взаимодействий, способствующих предпочтительному образованию гетеродимеров, с цепью H за счет гидрофобной/стерической комплементарности, а также электростатических взаимодействий дальнего действия (Choi *et al*, (2013) *Mol Cancer Ther* 12(12):2748–59). Мутацию S354C вводили для образования дополнительной дисульфидной связи между CH3, представленной парой Y349C(CH3-цепь-H) – S354C(CH3-цепь-S) (Choi *et al*., (2015) *Mol Immunol* 65(2):377–83).

*Аминокислотная последовательность*

**[01053]** Аминокислотные последовательности трех полипептидных цепей, составляющих AB0192, показаны ниже на фиг. 210. CDR выделены в таблице 204.

**Таблица 204. Последовательности CDR AB0192***

| **AB0192** | **Вариабельная область** | **Каркасная область** | **CDR1** | **CDR2** | **CDR3** |
|---|---|---|---|---|---|
| Цепь S | VH | VH3-30 | GFTFNAF (SEQ ID NO:195) | SSGSTS (SEQ ID NO:196) | DGYPTGGAMDY (SEQ ID NO:187) |
| Цепь S | VL | VK1-33 | KASQDIYNYLS (SEQ ID NO:198) | RANILVS (SEQ ID NO:199) | LQFDAFPFT (SEQ ID NO:201) |
| Цепь H | VH | VH3-21 | GFTFSSY (SEQ ID NO: 297) | SSSSY (SEQ ID NO:338) | GAPMIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:339) |
| Цепь L | VL | VK1-12 | RASQGISSWA (SEQ ID NO:337) | AASSLQS (SEQ ID NO:77) | QQGVSFPRT (SEQ ID NO:87) |

* CDR идентифицированы согласно Chothia

Анализ потенциальных участков неблагоприятных модификаций в последовательности

**[01054]** Цепь L (NKG2D-связывающая легкая цепь) не содержит прогнозируемых участков неблагоприятных модификаций. Цепь H (NKG2D-связывающая тяжелая цепь) содержит DP в CDRH3. Этот мотив не затрагивается при принудительном разложении.

Соответственно, эта последовательность не была изменена в AB0089. Цепь S содержит Met (потенциальный сайт окисления) и DG (потенциальный сайт изомеризации) в CDRH3. Никаких попыток упреждающего удаления M или DG в CDRH3 не предпринималось. Авторы настоящего изобретения тщательно отслеживали модификацию этих остатков во время исследования стабильности методом ускоренного старения и исследования при принудительном разложении. Как показано ниже, никаких модификаций Met или DG не наблюдалось при любых протестированных стрессовых условиях.

Оценка каркасной области

**[01055]** CLEC12A-связывающее плечо AB0192 было обнаружено посредством иммунизации мышей. Каркасные области, выбранные для гуманизации, часто применяются в терапевтических моноклональных антителах, исследуемыми на стадии клинического испытания (фиг. 211). NKG2D-связывающее плечо является полностью человеческим, создано на основе каркасной области, часто применяемой в mAb на продвинутой стадии, и не содержит каких-либо необычных остатков или отклонений от зародышевой линии.

Обратные мутации

**[01056]** Молекулярное моделирование применяли для выбора мышиных обратных мутаций, которые помогают сохранить архитектуру CDR (таблица 205). Вводили семь обратных мутаций: 3 в HC и 4 в LC.

**Таблица 205. Сводные данные по мышиным обратным мутациям, введенным в человеческую каркасную область в AB0192**

| **Каркасная область** | **Количество обратных мутаций** | **Остатки мышиной каркасной области (Chothia)** |
|---|---|---|
| VH | 3 | E(H1), R(H94), S(H108) |
| VL | 4 | F(L36), P(L46), Q(L69), Y(L71) |

Структурное моделирование

**[01057]** В отсутствие кристаллической структуры для сравнения создавали структурные модели вариабельных сегментов плеча, связывающего CLEC12A и NKG2D. Построение модели осуществляли с использованием веб-сайта SAbPred (opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdab/sabpred/).

*Анализ распределения поверхностного заряда и гидрофобных зон для CLEC12A-связывающего плеча AB0192*

**[01058]** На фиг. 212 демонстрируется представленная в виде ленточной диаграммы модель CLEC12A-связывающего scFv в трех различных ориентациях (верхняя панель) и их соответствующее распределение поверхностного заряда для той же ориентации

(нижняя панель). Распределение заряда scFv антитела к CLEC12A является поляризованным ("вид сверху", нижняя панель) с отрицательно заряженными остатками, находящимися преимущественно в CDRH3 и CDRL2. Неравномерное распределение электростатических зон на паратопе очевидно связано с мишенью и отражает комплементарность распределения заряда на его родственном эпитопе, что вероятно может способствовать высокоаффинному взаимодействию между CLEC12A и scFv AB0192.

**[01059]** На фиг. 213 показаны результаты анализа длины CDR и зон поверхностной гидрофобности CLEC12A-нацеливающегося плеча AB0192. Анализы осуществляли с применением профилей терапевтических антител (TAP): opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdab/sabpred/tap. При этом сравнивается кандидат относительно 377 терапевтических антител, исследуемых на поздней стадии их испытания. Длины CDR для CLEC12A-связывающего плеча AB0192 находятся в пределах типичных значений для терапевтических антител, исследуемых на поздней стадии их испытания. Анализ гидрофобных зон CDR антитела дает возможность прогнозировать его реализуемость. Теоретические гидрофобные свойства плеча TAA AB0192 находятся в пределах нормы производимых в промышленных масштабах биотерапевтических препаратов и терапевтических антител-кандидатов, исследуемых на поздней стадии их испытания.

**[01060]** На фиг. 214 показаны результаты анализа зон, содержащих положительные и отрицательные заряды, а также симметрия этих зарядов относительно областей CDR. Все три графика показывают, что распределения заряда находятся в пределах нормы по сравнению с терапевтическими антителами, исследуемыми на продвинутой стадии их испытания.

*Распределение поверхностного заряда и анализ гидрофобных зон NKG2D-связывающего плеча AB0192*

**[01061]** NKG2D-связывающее плечо Fab показано на ленточных диаграммах с тремя разными ориентациями (фиг. 215, верхняя панель), и их соответствующее распределение поверхностного заряда одинаковой ориентации представлено на фиг. 215, нижней панели. Распределение поверхностного заряда на плече A49M-I, связывающем NKG2D, является более равномерным, чем распределение зарядов на плече, нацеливающемся на CLEC12A, данной молекулы.

**[01062]** На фиг. 216 показаны результаты анализов длины CDR и зон поверхностной гидрофобности NKG2D-нацеливающегося плеча AB0192. Очевидно, длина CDR, гидрофобные свойства, распределения положительных/отрицательных зарядов NKG2D-

нацеливающегося плеча AB0192 находятся в пределах нормы существующих терапевтических антител.

**[01063]** На фиг. 217 показаны результаты анализов зон, содержащих положительные и отрицательные заряды, а также симметрия этих зарядов относительно областей CDR. Все три графика показывают, что распределения заряда находятся в пределах нормы по сравнению с популяцией терапевтических антител.

Прогнозирование иммуногенности

**[01064]** Белковые последовательности трех цепей AB0192 исследовали в отношении присутствия потенциально иммуногенных Т-клеточных эпитопов с применением алгоритма EpiMatrix и ранжировали потенциал иммуногенности (фиг. 218). Для AB0192 получены благоприятные показатели по шкале иммуногенности белка с поправкой на Treg. Показатель иммуногенности белка по шкале Epimatrix с поправкой на Treg для последовательностей трех цепей AB0192 составляет для цепи H: -33,39, цепи S: -19,94 и цепи L: -23,49 (таблица 206). Прогнозируемый риск иммуногенности для AB0192 оценивается как низкий.

**Таблица 206. Анализ иммуногенности EpiVax для AB0192**

| **Последовательность белка** | **Длина** | **Хиты в EpiMatrix** | **Показатель EpiMatrix** | **Показатель с поправкой на Treg** |
|---|---|---|---|---|
| AB0192_ЦЕПЬ_H | 451 | 207 | 5,99 | -33,39 |
| AB0192_ЦЕПЬ_L | 214 | 98 | 11,17 | -23,49 |
| AB0192_ЦЕПЬ_S | 475 | 227 | 12,13 | -19,94 |

Экспрессия

**[01065]** Экспрессия AB0192 достигалась с применением способа очистки с использованием платформы Dragonfly Tx для F3' TriNKET. Вкратце, AB0192 экспрессировали путем временной трансфекции клеток Expi293 и ExpiCHO с помощью трех плазмид, кодирующих NKG2D-нацеливающуюся легкую цепь (цепь L), NKG2D-нацеливающуюся тяжелую цепь IgG (цепь H) и CLEC12A-нацеливающийся слитый scFv-Fc (цепь S). Для экспрессии как в Expi293, так и в ExpiCHO, цепь S: цепь H: цепь L трансфицировали при соотношении плазмид 4:1:1, чтобы максимизировать процент требуемого гетеродимерного продукта. Это соотношение было получено эмпирически на основе предыдущих разработанных гуманизированных TriNKET и не было специально оптимизировано для AB0192.

Очистка

**[01066]** Очистку AB0192 осуществляли с применением двухстадийного способа очистки с использованием платформы для F3' TriNKET. Какой-либо оптимизации или расширенной разработки процесса очистки AB0192 не проводили. Схематическое представление очистки AB0192 (партия AB0192-005), экспрессируемого в ExpiCHO, показано на фиг. 219.

**[01067]** Две партии AB0192 получали во временно трансфицированных клетках ExpiCHO и Expi293. В таблице 207 представлены сводные данные по титру и чистоте конечного продукта для обеих партий.

**Таблица 207. Сводные данные по титрам экспрессии и конечной чистоте двух партий AB0192**

| **Партия AB0192** | **Хозяин для экспрессии** | **Титр (мг/л)** | **Чистота, % мономера** |
|---|---|---|---|
| AB0192-002 | Expi293 | 16 | 99,5 |
| AB0192-005 | ExpiCHO | 26 | 100,0 |

**[01068]** Идентичность AB0192 подтверждали посредством масс-спектрометрии. Анализ LC-MS интактного AB0192 (партия AB0192-005) продемонстрировал наблюдаемую массу (126429,9 Да) (фиг. 220), которая хорошо согласуется с теоретической массой 126429,5 Да. Основной наблюдаемый паттерн гликозилирования (G0F/G0F) является типичным для Fc-содержащей молекулы, экспрессируемой в клетках CHO.

Биохимические и биофизические свойства

**[01069]** Характеристики AB0192 определяли посредством SEC, CE, cIEF, HIC и DSC для подтверждения того, что оно характеризуется надлежащей чистотой и обладает характеристиками предварительной реализуемости, присущими качественному биологическому терапевтическому средству.

*Чистота*

**[01070]** Чистота AB0192 (партия AB0192-005), оцененная посредством SEC, CE-SDS в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, представлена в таблице 208.

**Таблица 208. Чистота AB0192, определенная посредством анализа SEC и CE-SDS**

| Тестируемый образец | SEC | | | NR CE-SDS | R CE-SDS |
|---|---|---|---|---|---|
| | HMW (%) | Мономер (%) | LMW (%) | Чистота (%) | Чистота (%) |
| AB0192 (партия AB0192-005) | ND | 100 | ND | 95 | 98,8 |

Эксклюзионная хроматография

**[01071]** SEC-анализ очищенного AB0192 (партия AB0192-005) показал > 99%-ое содержание мономера, как определено посредством интегрированной площади пика (фиг. 221).

CE-SDS в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях

**[01072]** AB0192 характеризуется высокой степенью очистки, определенной посредством CE-SDS (фиг. 222). В невосстанавливающих условиях (левая панель) основные примеси являются обусловленными способом получения (свободная легкая цепь и TriNKET – LC). В восстанавливающих условиях (правая панель) наблюдаются три ожидаемые цепи (легкая цепь (L), тяжелая цепь (H) и цепь scFv-Fc (S)).

*Экспериментальная pI и профиль заряда, определенные посредством cIEF*

**[01073]** Профиль cIEF AB0192 (партия AB0192-005) показан на (фиг. 223). AB0192 характеризуется основным пиком при pI 8,9 ± 0,0. Также наблюдаются несколько менее распространенных, перекрывающихся пиков кислых вариантов и второстепенных пиков основных вариантов.

*Оценка гидрофобности посредством HIC*

**[01074]** Гидрофобность AB0192 оценивали с применением хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) (фиг. 224 и таблица 209). На хроматограмме обнаруживается один узкий пик, указывающий на высокую чистоту и гомогенность молекулы. Время удерживания AB0192 сравнимо со временем удерживания Humira (терапевтическое моноклональное антитело с хорошим характеристиками).

**Таблица 209. Оценка гидрофобности AB0192 посредством HIC**

Humira используется в качестве внутреннего контроля mAb к IgG1 с надлежащими характеристиками.

| Тестируемый образец | Время удерживания (мин) |
|---|---|
| AB0192 | 9,9 |
| Humira | 8,9 |

*Оценка термической стабильности посредством DSC*

**[01075]** Термическую стабильность AB0192 оценивали посредством DSC в нескольких буферах (PBS, pH 7,4, HST, pH 6,0, CST, pH 7,0). AB0192 продемонстрировало высокую термостабильность во всех протестированных буферах (фиг. 225, таблица 210). Значение Tm1, соответствующее развертыванию scFv, удовлетворяло критериям ≥ 65°C, требующимся при оценке термостабильности.

**Таблица 210. Анализ термической стабильности AB0192 в трех различных буферных системах посредством DSC**

| **Тестируемый образец** | **Буфер** | **$T_{начала}$ (°C)** | **$T_{m1}$ (°C)** | **$T_{m2}$ (°C)** | **$T_{m3}$ (°C)** | **$T_{m4}$ (°C)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0192 | PBS, pH 7,4 | 60,0 | 67,3 | 76,5 | 81,4 | 83,3 |
| AB0192 | HST, pH 6,0 | 60,8 | 69,0 | 78,8 | 84,0 | 86,1 |
| AB0192 | CST, pH 7,0 | 61,2 | 68,0 | 77,4 | 82,0 | 83,9 |

Размещение дисульфидной связи

**[01076]** AB0192 представляет собой молекулу, сконструированную на основе остова моноклонального антитела к IgG1. В то время как типичный IgG1 содержит 16 дисульфидных связей, формат F3' AB0192 имеет только 15 дисульфидных связей. Половина AB0192 представляет собой полуантитело к NKG2D, поскольку оно содержит ожидаемые семь дисульфидных связей (по одной в каждом домене IgG и межмолекулярный дисульфид, соединяющий LC с HC). Другая половина AB0192 представляет собой слитый scFv-Fc, связывающий CLEC12A. scFv содержит три дисульфидные связи (по одной в каждом домене VH и VL антитела к CLEC12A и сконструированную стабилизирующую дисульфидную связь, соединяющую вариабельные домены), и Fc содержит две ожидаемых дисульфидных связи в доменах IgG. Части в гетеродимере удерживаются вместе двумя дисульфидами шарнира и одним дополнительным межмолекулярным сконструированным дисульфидом, соединяющим Fab-Fc с scFv-Fc в домене CH3. Вместе это дает в результате 15 ожидаемых дисульфидных связей в AB0192. Прогностическая карта дисульфидов для AB0192 показана на фиг. 226.

**[01077]** Связность дисульфидной связи AB0192 подтверждали посредством анализа пептидного картирования с использованием LC-MS/MS гидролизата в

невосстанавливающих условиях. Пептиды, связанные дисульфидной связью, идентифицировали посредством поиска в базе данных MS/MS и подтверждали посредством сравнения их интенсивности в нативном гидролизате и гидролизате в восстанавливающих условиях. Для выявления стабилизирующего дисульфида сконструированного scFv AB0192 расщепляли как трипсином, так и химотрипсином. На фиг. 227 показана экстракционная ионная хроматограмма (XIC) для сконструированной дисульфидной пары в scFv (в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях) и наиболее интенсивное зарядовое состояние для этой пептидной пары. Все остальные дисульфиды идентифицировали после ферментативного расщепления только трипсином. Значения XIC на фиг. 228 подтверждают существование сконструированного мостика S-S, введенного для стабилизации гетеродимеризации Fc. Сводные данные о выявленных пептидах, связанных дисульфидными связями, в AB0192 показаны в таблице 211. Выявление всех теоретических пептидов, связанных дисульфидными связями, осуществляли с высокой точностью определения масс (< 5 ppm), они являлись восстанавливаемыми, и их последовательность подтверждалась посредством фрагментации MS/MS.

**Таблица 211. Теоретические и экспериментальные массы пептидов, связанных дисульфидными связями**

| **Домен** | **Пептид** | **Теоретическая масса (Да)** | **Экспериментальная масса (Да)** | **Точность определения масс (ppm)** |
|---|---|---|---|---|
| VL | L2:L7 | 4482,0784 | 4482,0791 | 0,5 |
| CL | L12:L19 | 3555,7490 | 3555,7527 | 1,4 |
| Межмолекулярный CL-CH1 | L20-21:H19 | 1260,4863 | 1260,4862 | 0,2 |
| VH | H3:H10 | 3371,4686 | 3371,4728 | 1,3 |
| CH1 | H13:H14-15 | 7916,9194 | 7916,9162 | 0,2 |
| Шарнирный участок | H20-21:S20-21 | 5454,7834 | 5454,7899 | 1,6 |
| CH2 | H23:H30 | 2328,0977 | 2328,1015 | 1,5 |
| Межмолекулярный CH3-CH3[a] | H36:S37-38 | 2757,3830 | 2757,3866 | 1,7 |
| CH3 | H37:H41 | 4432,0675 | 4432,073 | 1,3 |
| VL scFv | S26:S42-44[b] | 1747,8314 | 1747,8381 | 3,8 |

| Домен | Пептид | Теоретическая масса (Да) | Экспериментальная масса (Да) | Точность определения масс (ppm) |
|---|---|---|---|---|
| VH scFv | S2:S9 | 3359,4951 | 3359,4993 | 1,3 |
| Стабилизирующий scFv[a] | S8:S46[b] | 1011,4154 | 1011,4198 | 4,4 |
| CH2 | S23:S30 | Не являющийся уникальным, см. H23:H30 | | |
| CH3 | S39:S44 | 3844,8236 | 3844,8287 | 1,2 |

a Сконструированной дисульфид

[b] Двойное ферментативное расщепление трипсином/химотрипсином

Характеристики связывания

*Связывание с CLEC12A человека*

**[01078]** Аффинность AB0089 к CLEC12A человека определяли посредством SPR при 37°C. AB0089 с высокой аффинностью связывается с CLEC12A человека (фиг. 229, таблица 212). В соответствии с механизмом действия TriNKET, молекула разработана для обеспечения прочного связывания с TAA и слабого связывания с NKG2D и CD16a. Комплекс, образуемый AB0192 и CLEC12A человека, является прочным, о чем свидетельствует низкая константа скорости диссоциации, составляющая $1,40 \pm 0,09 \times 10^{-3}$ $c^{-1}$. Равновесная аффинность связывания $K_D$ для AB0192 составляет 1,81 ± 0,16 нМ.

**Таблица 212. Кинетические параметры и аффинность связывания AB0192 с hCLEC12A, измеренные посредством SPR**

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192 | hCLEC12A-His | $7,87x10^5$ | $1,36x10^{-3}$ | 1,72 |
| AB0192 | hCLEC12A-His | $7,57x10^5$ | $1,51x10^{-3}$ | 1,99 |
| AB0192 | hCLEC12A-His | $7,85x10^5$ | $1,34x10^{-3}$ | 1,71 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **hCLEC12A-His** | **$(7,76\pm0,17) x10^5$** | **$(1,40\pm0,09) x10^{-3}$** | **1,81 ± 0,16** |

Среднее значение для 3 повторов

*Связывание с полиморфным вариантом CLEC12A (Q244) человека*

**[01079]** Полиморфный вариант CLEC12A (Q244) распространен у 30% населения. Авторы настоящего изобретения протестировали связывание AB0192 с данным генетическим вариантом посредством SPR и сравнили аффинность в отношении него с таковой в отношении CLEC12A (K244) WT (фиг. 230). Значения аффинности связывания

AB0192 с CLEC12A WT и вариантом CLEC12A (K244Q) находятся в пределах 2,5-кратного отличия (таблица 213). Также тестировали связывание AB0192 с CLEC12A яванского макака (cCLEC12A). При концентрации 100 нМ не наблюдалось поддающегося количественному определению связывания.

**Таблица 213. Кинетические параметры и значения аффинности связывания в отношении вариантов (K244) и (Q244) CLEC12A человека**

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | KD (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192 | hCLEC12A (K244) WT | (6,98±0,09) × $10^5$ | (1,15±0,01) × $10^{-3}$ | 1,65 ± 0,04 |
| AB0192 | hCLEC12A (Q244) | (8,24±1,33) × $10^5$ | (3,70±0,38) × $10^{-3}$ | 4,51 ± 0,26 |

*Связывание с дифференциально гликозилированным CLEC12A*

**[01080]** CLEC12A человека представляет собой высокогликозилированный белок (6 потенциальных участков N-гликозилирования с ECD, состоящим из 201 аминокислоты). Вариации статуса гликозилирования CLEC12A на поверхности различных типов клеток описаны в литературе (Marshall *et al.*, 2006) *Eur. J. Immunol.*, 36: 2159-2169). CLEC12A, экспрессируемый на поверхности клеток AML у разных пациентов, также может иметь разные паттерны гликозилирования. Чтобы определить, что AB0089 связывается с различными гликозилированными вариантами CLEC12A человека, антиген обрабатывали нейраминидазой (для удаления концевых сиаловых кислот) или PNGазой-F (для удаления N-связанных гликанов) и аффинность сравнивали с таковой в отношении необработанного CLEC12A посредством SPR. AB0192 связывалось как с гликозилированными, так и с дегликозилированными вариантами CLEC12A (фиг. 231 и таблица 214), и предполагается, что на него не повлияет гетерогенность состава целевого гликана.

**Таблица 214. Кинетические параметры и аффинность связывания AB0192 с дифференциально гликозилированным CLEC12A**

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | KD (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192 | Необработанный CLEC12A | (6,98±0,09) × $10^5$ | (1,15±0,01) × $10^{-3}$ | 1,65 ± 0,04 |
| AB0192 | Десиалилированный CLEC12A | (1,01±0,03) × $10^6$ | (1,04±0,00) × $10^{-3}$ | 1,04 ± 0,03 |

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **KD (нМ)** |
|---|---|---|---|---|
| AB0192 | Дегликозилированный CLEC12A | (1,31±0,02) × $10^6$ | (3,48±0,11) × $10^{-4}$ | 0,27 ± 0,01 |

Среднее значение для 3 повторов

*Связывание с CLEC12A+ изогенными и раковыми клеточными линиями*

**[01081]** Оценку связывания AB0192 как с изогенными клеточными линиями, экспрессирующими CLEC12A, так и с раковыми клетками AML отслеживали посредством FACS (фиг. 232, и таблица 215). AB0192 продемонстрировало высокую аффинность в отношении CLEC12A, экспрессируемого на клеточной поверхности изогенных клеток Ba/F3-CLEC12A, и связывает клеточные линии AML PL-21 и HL-60 с EC50, составляющей менее чем 1 нМ. Специфичность AB0089 в отношении CLEC12A была продемонстрирована отсутствием связывания с родительскими Ba/F3 клетками, которые не экспрессируют эту мишень.

**Таблица 215. Связывание AB0192 с изогенными Ba/F3-CLEC12A и раковыми клеточными линиями, экспрессирующими CLEC12A**

| **Клеточная линия** | **EC50 (нМ)** |
|---|---|
| Ba/F3-hCLEC12A | 0,91 |
| Родительская Ba/F3 | Связывание отсутствует |
| PL21 | 0,43 |
| HL-60 | 0,6 |

*Связывание с NKG2D человека*

**[01082]** Связывание AB0192 с ECD NKG2D человека, определенное посредством SPR при 37°C (Biacore) (фиг. 233). NKG2D по своей природе является димером, поэтому для данного эксперимента использовали рекомбинантный димер NKG2D, меченный mFc. Аффинность определяли с использованием AB0192. На фиг. 233 показаны сенсограммы связывания AB0192 с NKG2D человека. Для получения данных равновесной аффинности использовали два разных типа моделей аппроксимации: аппроксимация с использованием аффинности в стационарном состоянии и аппроксимация данных кинетики. Кинетические константы и константы равновесной аффинности показаны в таблице 216. AB0192 было разработано для связывания с NKG2D человека с низкой аффинностью, но что наиболее важно с высокой скоростью диссоциации. Константа скорости диссоциации составляла (1,46 ± 0,06) x 10-1 c-1. Константы равновесной аффинности (KD), полученные с помощью аппроксимации данных кинетики и аппроксимации с использованием

аффинности в стационарном состоянии, были очень сходными, 779 ± 10 нМ и 781 ± 9 нМ соответственно, что указывает на высокую достоверность в измеренных параметрах.

**Таблица 216. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0192 с NKG2D человека, измеренные посредством SPR**

| **Тестируемый образец** | **Мишень** | $k_a$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | $k_d$ **($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации данных кинетики** | **$K_D$ (нМ) из аппроксимации в стационарном состоянии** |
|---|---|---|---|---|---|
| AB0192 | hNKG2D | $1,86x10^5$ | $1,43x10^{-1}$ | 770 | 770 |
| AB0192 | hNKG2D | $1,96x10^5$ | $1,53x10^{-1}$ | 778 | 783 |
| AB0192 | hNKG2D | $1,81x10^5$ | $1,43x10^{-1}$ | 790 | 788 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **hNKG2D** | **(1,88±0,08) $x10^5$** | **(1,46±0,06) $x10^{-1}$** | **779 ± 10** | **781 ± 9** |

*Связывание с CD16a человека (аллель V158)*

**[01083]** Один из вариантов механизма действия AB0192 заключается в вовлечении CD16a (FcγRIIIa) человека, который экспрессируется на NK-клетках, посредством его Fc. Связывание AB0192 с CD16a человека тестировали посредством SPR (фиг. 234, таблица 217). В данном эксперименте использовали высокоаффинный аллель V158 CD16a. Поскольку представленные в литературе значения аффинности Fc-рецептора к IgG1 различаются в зависимости от плана эксперимента и источника рецепторов, то трастузумаб (герцептин) был включен в качестве контроля IgG1 человека. Аффинность AB0192 в отношении обоих аллелей является сопоставимой (отличается примерно в два раза) с аффинностью трастузумаба в отношении того же рецептора. Авторы настоящего изобретения не ожидают, что данное различие будет иметь какое-либо значимое физиологическое значение.

**Таблица 217. Кинетика и значения аффинности AB0192 в отношении hCD16a (V158) и трастузумаба, измеренные посредством SPR**

| **Тестируемый образец** | $k_a$ **($M^{-1}c^{-1}$)** | $k_d$ **($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|
| AB0192 | $1,03 \times 10^5$ | $1,90 \times 10^{-2}$ | 184 |
| AB0192 | $1,16 \times 10^5$ | $2,01 \times 10^{-2}$ | 173 |

| **Тестируемый образец** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **$K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|---|
| AB0192 | $1{,}16 \times 10^5$ | $2{,}06 \times 10^{-2}$ | 177 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(1{,}12 \pm 0{,}08) \times 10^5$** | **$(1{,}99 \pm 0{,}08) \times 10^{-2}$** | **178 ± 6** |
| | | | |
| Трастузумаб | $1{,}31 \times 10^5$ | $1{,}12 \times 10^{-2}$ | 86 |
| Трастузумаб | $1{,}22 \times 10^5$ | $1{,}08 \times 10^{-2}$ | 89 |
| Трастузумаб | $1{,}30 \times 10^5$ | $1{,}13 \times 10^{-2}$ | 87 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(1{,}28 \pm 0{,}05) \times 10^5$** | **$(1{,}11 \pm 0{,}03) \times 10^{-2}$** | **87 ± 1** |

*Тестирование синергизма CD16a-NKG2D*

**[01084]** AB0192 представляет собой трехфункциональный биологический препарат на основе IgG с двумя вариантами связывания с NK-клетками: связывание CD16a достигается за счет Fc, а связывание NKG2D достигается за счет Fab A49M-I. Оба взаимодействия важны для оптимальной цитотоксической активности AB0192. Чтобы продемонстрировать синергизм совместного вовлечения в связывание CD16a человека и связывания NKG2D человека авторы настоящего изобретения провели эксперимент с использованием SPR, в котором они качественно сравнивали связывание AB0192 с NKG2D, CD16a и смешанными NKG2D-CD16a на поверхностях чипов Biacore. Аффинность AB0192 к NKG2D человека и CD16a человека является низкой в отношении обеих данных мишеней, однако одновременное связывание с обеими мишенями дает в результате эффект авидности, который проявляется в более медленной скорости диссоциации (фиг. 235). Таким образом, AB0192 может авидно взаимодействовать с CD16a и NKG2D.

*Совместное вовлечение во взаимодействие CLEC12A и NKG2D*

**[01085]** Чтобы определить, препятствует ли связывание одной мишени связыванию другой мишени с AB0192 последовательно вводили CLEC12A и NKG2D поверх AB0192, захваченного на чипе SPR с IgG к hFc (фиг. 236). Сенсограммы связывания мишени демонстрируют, что статус занятости CLEC12A не препятствует связыванию NKG2D (фиг. 236, верхняя панель) и наоборот (фиг. 236, нижняя панель). Подобие форм соответствующих участков сенсограмм, изображающих связывание каждой мишени со свободным AB0192 и AB0192, который был насыщен другой мишенью, позволяет предположить, что статус занятости мишенью молекулы AB0192 не оказывал значимого

влияния на кинетические параметры. Например, форма участка, соответствующего связыванию CLEC12A, на сенсограммах является сходной на обеих панелях. Кроме того, отсутствие какого-либо влияния на относительную стехиометрию связывания каждой мишени (по сравнению со связыванием с незанятым AB0192) означает полную независимость участков связывания NKG2D и CLEC12A на AB0192 (таблица 218). Таким образом, AB0192 может успешно обеспечивать одновременное совместное вовлечение во взаимодействие опухолевого антигена и NKG2D-нацеливающегося плеча.

**Таблица 218. Относительные значения стехиометрии связывания AB0192 в отношении CLEC12A и NKG2D**

Стехиометрия связывания выражается относительно связывания каждой мишени с незанятым захваченным AB0192.

| | **CLEC12A,** относительная стехиометрия связывания | **NKG2D,** относительная стехиометрия связывания |
|---|---|---|
| Мишень связана с AB0192, незанятым другой мишенью (вводили первой) | 1,00 | 1,00 |
| Мишень связана с AB0192, насыщенным другой мишенью (вводили второй) | 1,03 ± 0,07 | 1,15 ± 0,20 |

*Связывание с рецепторами Fcγ*

**[01086]** Поскольку AB0192 является кандидатным биологическим лекарственным средством, полученным из IgG1, то важно, чтобы оно сохраняло соответствующие свойства связывания с Fc-рецептором. Данные SPR свидетельствуют о том, что AB0089 связывает рецепторы Fcγ человека и яванского макака со значениями аффинности, сопоставимыми с трастузумабом – коммерческим биологическим препаратом на основе IgG1, который служил в качестве экспериментального контроля (таблица 219). Подробное описание связывания каждого отдельного рецептора представлено ниже.

**Таблица 219. Связывание AB0192 и трастузумаба, связывающего рекомбинантные FcγR человека и яванского макака**

| Рецептор Fcγ | AB0192 $K_D$ (нМ) | Трастузумаб, контроль hIgG1 $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|
| hFcγRI | 5,2 ± 1,2 | 2,9 ± 0,4 |
| cFcγRI | 1,9 ± 0,3 | 1,0 ± 0,1 |
| H131 hFcγRIIa | 1011,3 ± 63,3 | 1045,1 ± 62,2 |
| R131 hFcγRIIa | 1398,8 ± 286,1 | 1493,2 ± 265,9 |
| V158 $hFc\gamma^{RIIIa}$ | 178,3 ± 5,5 | 87,1 ± 1,4 |
| F158 hFcγRIIIa | 680,0 ± 69,6 | 331,4 ± 3,3 |
| cFcγRIII[a] | 203,8 ± 1,0 | 128,8 ± 2,1 |
| hFcγRIIb | 6062,3 ± 827,0 | 6270,3 ± 1031,7 |
| hFcγRIIIb[a] | 6014,8 ± 735,5 | 3872,4 ± 486,3 |

[a]n = 3, в остальном n = 4

Связывание с CD64 (FcγRI) человека и яванского макака

**[01087]** В таблице 220 продемонстрировано, что AB0089 связывает рекомбинантный CD64 (FcγRI) человека и яванского макака со значениями аффинности, сопоставимыми (разница в менее чем два раза) с трастузумабом. На фиг. 237 и фиг. 238 изображено связывание AB0089 с CD64 человека и яванского макака соответственно.

**Таблица 220. Связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным CD64 (FcγRI) человека и яванского макака**

| Тестируемый образец | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|
| **CD64 (FcγRI) человека** | | | |
| AB0192 из партии AB0192-005 | $4,7 \times 10^4$ | $2,9 \times 10^{-4}$ | 6,1 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | $4,7 \times 10^4$ | $2,6 \times 10^{-4}$ | 5,5 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | $4,7 \times 10^4$ | $2,6 \times 10^{-4}$ | 5,5 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | $5,2 \times 10^4$ | $1,8 \times 10^{-4}$ | 3,5 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(4,8 \pm 0,3) 10^4$** | **$(2,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$** | **5,2 ± 1,2** |

| **Тестируемый образец** | **$k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$)** | **$k_d$ ($c^{-1}$)** | **KD (нМ)** |
|---|---|---|---|
| Трастузумаб | $9,0 \times 10^4$ | $2,3 \times 10^{-4}$ | 2,5 |
| Трастузумаб | $8,6 \times 10^4$ | $2,1 \times 10^{-4}$ | 2,5 |
| Трастузумаб | $8,3 \times 10^4$ | $2,7 \times 10^{-4}$ | 3,2 |
| Трастузумаб | $8,8 \times 10^4$ | $2,8 \times 10^{-4}$ | 3,2 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(8,1 \pm 0,0) \times 10^4$** | **$(2,5 \pm 0,3) \times 10^{-4}$** | **2,9 ± 0,4** |
| **CD64 (FcγRI) яванского макака** | | | |
| AB0192 из партии AB0192-005 | $5,4 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^{-4}$ | 2,2 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | $8,0 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^{-4}$ | 1,5 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | $5,7 \times 10^4$ | $1,1 \times 10^{-4}$ | 1,9 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | $5,5 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^{-4}$ | 2,1 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(6,2 \pm 1,3) \times 10^4$** | **$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-4}$** | **1,9 ± 0,3** |
| Трастузумаб | $1,3 \times 10^5$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | 1,1 |
| Трастузумаб | $1,3 \times 10^5$ | $1,2 \times 10^{-4}$ | 0,9 |
| Трастузумаб | $1,3 \times 10^5$ | $1,1 \times 10^{-4}$ | 0,8 |
| Трастузумаб | 1,3 x 105 | $1,3 \times 10^{-4}$ | 1,0 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **$(1,3 \pm 0,1) \times 10^5$** | **$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$** | **1,0 ± 0,1** |

Связывание с CD32a (FcγRIIa) человека

**[01088]** Отсутствовало значимое отличие между значениями аффинности обоих аллелей CD32a человека в отношении AB0089 и трастузумаба (таблица 221). На фиг. 239 и фиг. 240 изображено связывание AB0089 и трастузумаба с CD32a (аллели H131 и R131) соответственно, протестированное посредством SPR.

**Таблица 221. Связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантными аллелями H131 и R131 CD32a (FcγRIIa) человека**

| **Тестируемый образец** | **$K_D$ (нМ)** | |
|---|---|---|
| | **H131 FcγRIIa** | **R131 FcγRIIa** |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 1035,5 | 1376,1 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 921,1 | 1286,2 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 1068,0 | 1800,6 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 1020,6 | 1132,4 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **1011,3 ± 63,3** | **1398,8 ± 286,1** |
| | | |
| Трастузумаб | 1069,2 | 1488,2 |
| Трастузумаб | 953,1 | 1381,0 |
| Трастузумаб | 1090,2 | 1862,1 |
| Трастузумаб | 1068,0 | 1241,4 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **1045,1 ± 62,2** | **1493,2 ± 265,9** |

Связывание с CD16a F158 человека (FcγRIIIa F158) и CD16 яванского макака

**[01089]** Подробное описание связывания AB0192 с V158 CD16a представлено в разделе 6.9.6. Связывание AB0192 с низкоаффинным аллелем F158 FcγRIIIa человека и FcγRIII яванского макака представлено в таблице 222, на фиг. 241 и фиг. 242. Значения аффинности связывания AB0192 в отношении рекомбинантного CD16a человека (аллель F158) и CD16 яванского макака являются сопоставимыми, различаясь по аффинности менее чем в два раза с таковыми для трастузумаба (таблица 222).

**Таблица 222. Связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным аллелем F158 CD16a (FcγRIIIa) человека и CD16 (FcγRIII) яванского макака**

| **Тестируемый образец** | **FcγRIIIa F158 человека $K_D$ (нМ)** | **FcγRIII яванского макака $K_D$ (нМ)** |
|---|---|---|
| AB0192 из партии AB0192-005 | 772,9 | 202,7 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 633,7 | 204,6 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 693,3 | 204,1 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 620,0 | n/a |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **680,0 ± 69,6** | **203,8 ± 1,0** |
| | | |
| Трастузумаб | 332,3 | 127,1 |
| Трастузумаб | 326,6 | 128,1 |
| Трастузумаб | 333,8 | 131,1 |
| Трастузумаб | 333,1 | n/a |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **331,4 ± 3,3** | **128,8 ± 2,1** |

Связывание с CD32b (FcγRIIb) человека

**[01090]** Отсутствовало значимое отличие между значениями аффинности CD32b в отношении AB0089 и трастузумаба (таблица 223). На фиг. 243 изображено связывание AB0089 и трастузумаба с CD32b, протестированное посредством SPR.

**Таблица 223. Связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным CD32b (FcγRIIb) человека**

| **Тестируемый образец** | **$K_D$ (мкМ)** |
|---|---|
| AB0192 из партии AB0192-005 | 6,5 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 5,6 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 5,2 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 7,0 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **6,1 ± 0,8** |
| | |
| Трастузумаб | 7,1 |
| Трастузумаб | 5,6 |
| Трастузумаб | 5,2 |
| Трастузумаб | 7,2 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **6,3 ± 1,0** |

Связывание с CD16b (FcγRIIIb) человека

**[01091]** AB0089 связывает CD16b (FcγR3b) человека с аффинностью, сопоставимой (разница в менее чем два раза) с аффинностью трастузумаба (таблица 224). На фиг. 244 изображено связывание AB0089 и трастузумаба с CD16b, протестированное посредством SPR.

**Таблица 224. Связывание AB0192 и трастузумаба с рекомбинантным CD16b (FcγRIIIb) человека**

| | **$K_D$ (мкМ)** |
|---|---|
| AB0192 из партии AB0192-005 | 6,8 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 6,0 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 5,3 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **6,0 ± 0,7** |
| | |
| Трастузумаб | 4,3 |
| Трастузумаб | 3,9 |
| Трастузумаб | 3,4 |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **3,9 ± 0,5** |

*Связывание с FcRn человека и яванского макака*

**[01092]** На фиг. 245 и фиг. 246 изображено связывание AB0192 с FcRn человека и яванского макака соответственно, протестированное посредством SPR. Значения аффинности AB0192 к FcRn человека и яванского макака сходны с такими значениями у

трастузумаба, коммерческого биологического препарата на основе IgG1, который служил в качестве экспериментального контроля (таблица 225).

**Таблица 225. Связывание AB0192 и трастузумаба с FcRn человека и яванского макака**

| | **FcRn человека, $K_D$ (мкМ)** | **FcRn яванского макака, $K_D$ (мкМ)** |
|---|---|---|
| AB0192 из партии AB0192-005 | 1,5 | 1,5 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 1,3 | 1,4 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 1,5 | 1,2 |
| AB0192 из партии AB0192-005 | 1,5 | n/a |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **1,5 ± 0,1** | **1,4 ± 0,1** |
| | | |
| Трастузумаб | 1,8 | 1,6 |
| Трастузумаб | 1,5 | 1,6 |
| Трастузумаб | 2,0 | 1,5 |
| Трастузумаб | 1,7 | n/a |
| **Среднее значение ± станд. отклон.** | **1,7 ± 0,2** | **1,5 ± 0,1** |

*Эпитоп-специфическая сортировка*

**[01093]** Авторы настоящего изобретения сравнивали связываемый эпитоп AB0192 по отношению к AB0237, AB0089 и трем эталонным контролям TriNKET посредством SPR (фиг. 247). cFAE-A49. теподитамаб получен на основе CLEC12A-связывающего плеча теподитамаба от Merus (WO_2014_051433_A1), cFAE-A49.CLL1-Merus получено на основе клона 4331 от Merus (WO_2014_051433_A1), и cFAE-A49.h6E7 получено на основе mAb h6E7 от Genentech (h6E7) (US_2016_0075787_A1). Взаимодействие AB0192 с hCLEC12A блокировалось всеми тремя контрольными молекулами – cFAE-A49.теподитамаб, cFAE.A49.h6E7 и cFAE-A49.CLL1-Merus, что позволяет предположить, что эпитоп, связываемый AB0192, является широким и перекрывается с таковыми как для молекулы Merus, так и для молекулы Genentech. Эта область узнавания отличается от таковых для AB0237 и AB0089, которые перекрестно блокируются только молекулами

Merus. Таким образом, связываемый эпитоп для AB0192 отличается от таковых для AB0089 и AB0237.

Активность

**[01094]** Способность AB0192 лизировать человеческие раковые клетки, экспрессирующие CLEC12A, определяли в анализе цитотоксичности, опосредованной NK-клетками человека. AB0192 продемонстрировало высокую активность в уничтожении клеток AML PL21 и значительно превзошло соответствующее моноклональное антитело (фиг. 248 и таблица 226).

**Таблица 226. Активность AB0192 в анализе цитотоксичности, опосредованной первичными NK-клетками, по сравнению с соответствующим контрольным mAb**

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|
| AB0192 | 1,72 | 24 |
| Родительское mAb (AB0306) | ND | ND |

Специфичность

*Неспецифическое связывание, оцененное посредством анализа с использованием PSR*

**[01095]** Неспецифическое связывание AB0192 оценивали посредством анализа с использованием PSR на основе проточной цитометрии, в котором измеряют связывание с препаратом на основе мембранных белков клеток CHO, солюбилизированных детергентом (фиг. 249). Известно, что анализ с использованием PSR хорошо коррелирует с хроматографией перекрестного взаимодействия, суррогатным методом анализа растворимости антител, а также с твердофазным иммуноферментным анализом с использованием бакуловирусных частиц, суррогатным методом анализа клиренса *in vivo*, и поэтому служит хорошим прогностическим фактором реализуемости. AB0192 продемонстрировало отсутствие неспецифического связывания, сходно с таковым в контроле с низким показателем в анализе с использованием PSR (трастузумаб), что свидетельствует о высокой специфичности и отсутствии неспецифического связывания с неродственными белками.

*Оценка специфичности AB0192 в анализе с использованием микрочипа HuProt™.*

**[01096]** Для оценки специфичности AB0192 авторы настоящего изобретения разработали технологию на основе белкового микрочипа. Микрочип протеома человека HuProt™ предоставляет самую большую базу данных индивидуально очищенных

полноразмерных человеческих белков на одном предметном стекле для микроскопа. Массив, состоящий из 22000 полноразмерных человеческих белков, экспрессировали в дрожжах рода *Cerevisiae*, очищали и затем наносили в двух параллелях на предметное стекло в виде микрочипа, что дает возможность определять профили тысяч взаимодействий посредством высокопроизводительного способа. На фиг. 250 показано относительное связывание (Z-показатель) AB0192 при 1 мкг/мл с CLEC12A человека по сравнению с микрочипом полного протеома человека. Z-показатель представляет собой средний показатель связывания данного белка в двух повторах. В целях сравнения 24 основных белка с остаточным фоновым связыванием с AB0192 также представлены на фиг. 250. В таблице 227 представлены Z- и S-показатели для AB0192 в отношении CLEC12A человека и 6 основных белков из микрочипа. S-показатель представляет собой разницу между Z-показателем для указанного белка и для следующего в одном ряду с ним. Основываясь на критериях показателей Z и S, AB0192 продемонстрировало высокую специфичность по отношению к белкам человека и отсутствие нецелевого связывания в анализе с использованием протеома человека HuProt™.

**Таблица 227. Сводные данные по основным хитам, полученным посредством микрочипа HuProt™**

| Название | Место в ряду | ID белка | Z-показатель | S-показатель |
|---|---|---|---|---|
| hCLEC12A | 1 | hCLEC12A | 150,06 | 144,04 |
| MFF | 2 | JHU15965.P168B06 | 6,05 | 0,81 |
| POLR2E | 3 | JHU02080.P189F02 | 5,24 | 0,22 |
| HMGA1_frag | 4 | JHU16418.P173B08 | 5,02 | 0,12 |
| PARS2 | 5 | JHU06781.P071H01 | 4,90 | 0,24 |
| THEMIS_frag | 6 | JHU15201.P160B01 | 4,66 | 0,23 |
| ZNF608 | 7 | JHU13018.P136G04 | 4,43 | 0,006 |

Оценка реализуемости

**[01097]** Стабильность и принудительное разложение AB0192 оценивали при следующих условиях.

**[01098]** Испытание стабильности методом ускоренного (40°C) старения

- 20 мг/мл в 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 6,0, 40°C, 4 недели (SEC, SPR, активность, SDS-CE)
- 20 мг/мл в 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0, 40°C, 4 недели (SEC, SPR, активность, SDS-CE)

**[01099]** Химическая стабильность

- Окисление: 1 мг/мл в 0,02% пероксиде водорода, PBS, комнатная темп., 24 часа (SEC, CE-SDS, SPR, активность, пептидная карта)
- pH 8,0: 1 мг/мл в 20 мМ Tris, 40ºC, 2 недели (cIEF, SPR, активность, пептидная карта).
- pH 5,0: 1 мг/мл в 20 мМ ацетате натрия, 40ºC, 2 недели (cIEF, SPR, активность, пептидная карта).

**[01100]** Технологичность

- Замораживание/оттаивание: 6 циклов по 20 мг/мл, 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0 (SEC, SDS-CE)
- Перемешивание: 20 мг/мл в 20 мМ цитрата натрия, 250 мМ сахарозы, 0,01% Tween-80, pH 7,0 (SEC, SDS-CE)
- Высокая концентрация: > 150 мг/мл, PBS (SEC, A280).
- Выдерживание при низком уровне pH: pH 3,3, 1,0 часа, элюирующий буфер ProA (SEC, cIEF, SDS-CE, масса интактного антитела, SPR, активность)

*Испытание стабильности методом ускоренного (40ºC) старения*

**[01101]** Для оценки стабильности AB0192 молекулу выдерживали при 40°C в течение 4 недель в двух разных буферных условиях: (1) 20 мг/мл в 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,01% PS-80, pH 6,0 (HST) и (2) 20 мг/мл в 20 мМ цитрата, 250 мМ сахарозы, 0,01% PS-80, pH 7,0 (CST). Стабильность в обоих буферах оценивали посредством SEC, CE, SPR и активности.

Стабильность в HST, pH 6,0

**[01102]** Через 4 недели при 40°C AB0192 в HST, pH 6,0, продемонстрировало минимальную агрегацию или фрагментацию, определенные посредством SEC (фиг. 251, таблица 228) или CE-SDS (фиг. 252, таблица 229). Потеря мономера составила 1,6% при определении посредством SEC и 1% при определении посредством CE в невосстанавливающих условиях. Отсутствовала значимая разница в содержании активных соединений или значениях аффинности связывания в отношении hCLEC12A, hNKG2D и hCD16a между контрольными и подвергнутыми воздействию стрессового условия образцами (фиг. 253 и таблица 230). Наконец, отсутствовала разница в активности между контрольными и подвергнутыми воздействию стрессового условия образцами, протестированными в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV (фиг. 254 и таблица 231).

**Таблица 228. Результаты SEC-анализа AB0192 после 2 и 4 недель при 40°C в HST, pH 6,0**

| Тестируемый образец | Конц. (мг/мл) | Мономер (%) | LMWS (%) | HMWS (%) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 20,1 | 98,9 | 1,2 | 0,0 |
| AB0192, 2 недели, 40°C | 20,2 | 98,0 | 2,0 | 0,0 |
| AB0192, 4 недели, 40°C | 21,3 | 97,3 | 2,8 | 0,0 |

**Таблица 229. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0192 через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0**

| Тестируемый образец | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE (%) |
|---|---|---|
| AB0192, контроль | 99,1 | 97,5 |
| AB0192, 4 недели, 40°C | 98,1 | 97,4 |

**Таблица 230. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16a через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0, измеренные посредством SPR**

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | hCLEC12A | (7,76±0,17) x$10^5$ | (1,40 ±0,09) x$10^{-3}$ | 1,81 ± 0,2 |
| AB0192, 4 недели, 40°C | hCLEC12A | (7,76±0,40) x$10^5$ | (1,40 ±0,07) x$10^{-3}$ | 1,81 ± 0,2 |
| AB0192, контроль | hNKG2D | (2,08±0,03) x$10^5$ | (1,22±0,01) x$10^{-1}$ | 588 ± 6 |
| AB0192, 4 недели, 40°C | hNKG2D | (2,11±0,35) x$10^5$ | (1,27±0,19) x$10^{-1}$ | 602 ± 9 |
| AB0192, контроль | CD16aV | (1,17±0,02) x$10^5$ | (1,99±0,05) x$10^{-2}$ | 171 ± 2 |
| AB0192, 4 недели, 40°C | CD16aV | (1,03±0,03) x$10^5$ | (2,01±0,03) x$10^{-2}$ | 194 ± 4 |

Среднее значение для n=3 повторов

**Таблица 231. Активность AB0192 через 4 недели при 40°C в HST, pH 6,0, в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV**

| Тестируемый образец | Буфер | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | HST | 3,3 | 21 |
| AB0192, 40ºC, 4 недели | HST | 1,6 | 17 |

Стабильность в CST, pH 7,0

**[01103]** Через 4 недели при 40°C AB0192 в CST, pH 7,0, продемонстрировало минимальную агрегацию (фиг. 255 и таблица 232) и фрагментацию (фиг. 256 и таблица 233). Снижение содержания мономера, составляющее 1,6% и 0,8%, наблюдалось при определении посредством SEC и CE-SDS в невосстанавливающих условиях соответственно. Отсутствовала значимая разница в содержании активных соединений или значениях аффинности связывания в отношении hCLEC12A, hNKG2D и hCD16a между контрольными и подвергнутыми воздействию стрессового условия образцами (фиг. 257 и таблица 234). Наконец, отсутствовала разница в активности между контрольными и подвергнутыми воздействию стрессового условия образцами в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV (фиг. 258 и таблица 235).

**Таблица 232. Результаты SEC-анализа AB0192 после 1-4 недель при 40°C в CST, pH 7,0**

| Тестируемый образец | Конц. (мг/мл) | Мономер (%) | LMWS (%) | HMWS (%) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 21,3 | 99,0 | 1,1 | ND |
| AB0192, 1 неделя, 40°C | 21,4 | 98,1 | 1,5 | 0,4 |
| AB0192, 2 недели, 40°C | 21,4 | 97,9 | 1,6 | 0,5 |
| AB0192, 3 недели, 40°C | 21,7 | 97,8 | 1,7 | 0,5 |
| AB0192, 4 недели, 40°C | 22,2 | 97,4 | 1,8 | 0,8 |

**Таблица 233. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0192 через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0**

| Тестируемый образец | Конц. (мг/мл) | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE (%) |
|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 21,3 | 98,8 | 97,8 |
| AB0192, 40ºC, 4 недели | 22,4 | 98,0 | 97,0 |

**Таблица 234. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16a через 4 недели при 40°C в CST, pH 7,0, измеренные посредством SPR**

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | hCLEC12A | (7,76±0,17) x$10^5$ | (1,40 ±0,09) x$10^{-3}$ | 1,81 ± 0,2 |
| AB0192, 4 недели, 40°C | hCLEC12A | (7,49±0,22) x$10^5$ | (1,47±0,12) x$10^{-3}$ | 1,96 ± 0,2 |
| AB0192, контроль | hNKG2D | (2,08±0,03) x$10^5$ | (1,22±0,01) x$10^{-1}$ | 588 ± 6 |
| AB0192, 4 недели, 40°C | hNKG2D | (1,85±0,06) x$10^5$ | (1,21±0,04) x$10^{-1}$ | 653 ± 10 |
| AB0192, контроль | CD16aV | (1,17±0,02) x$10^5$ | (1,99±0,05) x$10^{-2}$ | 171 ± 2 |
| AB0192, 4 недели, 40°C | CD16aV | (1,11±0,07) x$10^5$ | (1,94±0,01) x$10^{-2}$ | 174 ± 10 |

Среднее значение для 3 повторов

**Таблица 235. Активность AB0192 через 4 недели при 40ºC в CST, pH 7,0, в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV**

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|
| AB0192, контроль | 3,3 | 21 |
| AB0192, 40ºC, 4 недели | 1,4 | 19 |

*Химическая стабильность*

Принудительное окисление

**[01104]** После 24 ч. воздействия стрессового условия, представляющего собой окисление в 0,02% пероксида водорода, AB0192 не продемонстрировало значительного

снижения содержания мономера (фиг. 259 и таблица 236). Чистота, оцененная посредством CE, оставалась высокой (фиг. 260 и таблица 237). Количество активных соединений и значения аффинности связывания в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16aV не изменялись (фиг. 261 и таблица 238), а активность была сходной с таковой контрольного образца (фиг. 262 и таблица 239).

**Таблица 236. Результаты SEC-анализа AB0192 после принудительного окисления по сравнению с контролем**

| Тестируемый образец | Конц. (мг/мл) | %-ое содержание мономера | LMWS (%) | HMWS (%) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 1,1 | 99,4 | 0,7 | ND |
| AB0192, окисленное | 0,9 | 99,7 | 0,3 | ND |

**Таблица 237. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0192 после принудительного окисления**

| Тестируемый образец | Конц. (мг/мл) | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE (%) |
|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 1,1 | 99,1 | 97,8 |
| AB0192, окисленное | 0,9 | 98,9 | 97,7 |

**Таблица 238. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16a после принудительного окисления, измеренные посредством SPR**

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | hCLEC12A | (7,71±0,04) x$10^5$ | (1,29±0,02) x$10^{-3}$ | 1,68 ± 0,0 |
| AB0192, окисленное | hCLEC12A | (7,75±0,07) x$10^5$ | (1,32±0,05) x$10^{-3}$ | 1,71 ± 0,1 |
| AB0192, контроль | hNKG2D | (2,08±0,05) x$10^5$ | (1,24±0,03) x$10^{-1}$ | 598 ± 9 |

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, окисленное | hNKG2D | (1,95±0,02) x$10^5$ | (1,19±0,03) x$10^{-1}$ | 612 ± 11 |
| AB0192, контроль | CD16aV | (1,15±0,07) x$10^5$ | (2,02±0,05) x $10^{-2}$ | 177 ± 7 |
| AB0192, окисленное | CD16aV | (1,19±0,04) x$10^5$ | (1,92±0,04) x $10^{-2}$ | 162 ± 3 |

Среднее значение для n=3 повторов

**Таблица 239. Активность AB0192 после воздействия стрессового условия, представляющего собой принудительное окисление, оцененная посредством анализа цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV**

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|
| AB0192, контроль | 1,9 | 18 |
| AB0192, окисленное | 2,6 | 18 |

**[01105]** Сайт-специфическое окисление метионина отслеживали после принудительного окисления посредством триптического пептидного картирования. Значительные уровни окисления были выявлены только по двум остаткам метионина в Fc, как ожидалось (таблица 240), как ожидалось для IgG1. Ретроспективные данные авторов настоящего изобретения показывают, что в трастузумабе модифицированы те же остатки на 61,6% и 39,1% при тех же условиях.

**Таблица 240. Сводные данные по окислению метионина в AB0192 после воздействия стрессового условия, представляющего собой окисление**

| | | | | Относительное содержание (%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| **SEQ ID NO** | **Последовательность** | **Цепь** | **Положение** | **Контроль** | **Окисленный** |
| 299 | LSCAASGFTFSSYS**M**NWVR | H | 34 | 0,5 | 0,8 |
| 300 | NSLYLQ**M**NSLR | H | 83 | 0,1 | 0,3 |
| 301 | DTL**M**ISR | H/S | 257/281 | 1,4 | 64,7 |
| 302 | WQQGNVFSCSV**M**HEALHNHYTQK | H/S | 433/457 | 1,2 | 35,9 |
| 303 | DIQ**M**TQSPSSVSASVGDR | L | 4 | 0,1 | 0,3 |
| 340 | LSCAASGFTFNAFG**M**HWVR | S | 34 | 0,8 | 0,9 |
| 341 | NTLYLQ**M**NSLR | S | 83 | 0,1 | 0,2 |

| | | | | Относительное содержание (%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| **SEQ ID NO** | **Последовательность** | **Цепь** | **Положение** | **Контроль** | **Окисленный** |
| 342 | DGYPTGGA**M**DYWGQGTSVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ**M**T QSPSSLSASVGDR[a] | S | 107/110/144 | 0,2 | 0,9 |

[a] % окисления указан как сумма окисления на M107, W110 и M144

**[01106]** В том же эксперименте также отслеживали окисление остатков триптофана в CDR AB0192. Ни в одном из остатков триптофана не выявили значительное увеличение окисления после воздействия стрессового условия (таблица 241).

**Таблица 241. Сводные данные по окислению триптофана в CDR AB0192 после воздействия стрессового условия, представляющего собой окисление**

| | | | | Относительное содержание (%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Последовательность** | **Цепь** | **CDR** | **Сдвиг масс (Да)[a]** | **Контроль** | **Окисленный** |
| GAPIGAAAG**W**FDP (SEQ ID NO: 97) | H | H3 | +16/+32/+4 | ND/0,2/0,2 | ND/0,1/0,0 |
| RASQGISS**W**LA (SEQ ID NO: 86) | L | L1 | +16/+32/+4 | 0,1/0,2/0,0 | 0,2/0,1/0,0 |

[a] однократное окисление (+16 Да), двойное окисление (+32 Да) и кинуренин (+4 Да); ND: не выявлено.

Стрессовое условие pH 5

**[01107]** Химическую стабильность AB0192 оценивали при низком уровне pH (20 мМ ацетата натрия, pH 5,0, 40°C, 2 недели). После 2 недель при pH 5 при определении посредством SEC снижения содержания мономера (фиг. 263 и таблица 242) не наблюдали. Различия в чистоте, выявленные посредством CE-SDS в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, составляли менее чем 1% (фиг. 264 и таблица 243). Не было значимых различий в аффинности в отношении CLEC12A, NKG2D или CD16aV количества наблюдаемых активных соединений (фиг. 265 и таблица 244). Небольшой кислотный сдвиг в общем профиле заряда был выявлен посредством cIEF (фиг. 266 и таблица 245), однако этот кислотный сдвиг не влиял на активность AB0192 (фиг. 267 и таблица 246).

**Таблица 242. Результаты SEC-анализа AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 14 дней)**

| Тестируемый образец | Конц. (мг/мл) | Мономер (%) | LMWS (%) | HMWS (%) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 1,2 | 99,3 | 0,7 | ND |
| AB0192, pH 5, 40°C, 2 недели | 1,2 | 99,4 | 0,6 | ND |

**Таблица 243. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 14 недели).**

| Тестируемый образец | Концентрация (мг/мл) | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE (%) |
|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 1,2 | 97,1 | 98,0 |
| AB0192, pH 5, 40°C, 2 недели | 1,2 | 96,3 | 97,8 |

**Таблица 244. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16a после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 14 дней), измеренные посредством SPR**

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | hCLEC12A | (7,71±0,04) x$10^5$ | (1,29±0,02) x$10^{-3}$ | 1,68 ± 0,0 |
| AB0192, pH 5, 40°C, 2 недели | hCLEC12A | (7,87±0,12) x$10^5$ | (1,30±0,03) x$10^{-3}$ | 1,65 ± 0,0 |
| AB0192, контроль | hNKG2D | (2,08±0,03) x$10^5$ | (1,22±0,01) x$10^{-1}$ | 588 ± 6 |
| AB0192, pH 5, 40°C, 2 недели | hNKG2D | (2,10±0,06) x$10^5$ | (1,20±0,01) x$10^{-1}$ | 574 ± 12 |
| AB0192, контроль | CD16aV | (1,17±0,02) x$10^5$ | (1,99±0,05) x$10^{-2}$ | 171 ± 2 |

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, pH 5, 40°C, 2 недели | CD16aV | (1,08±0,02) x$10^5$ | (2,08±0,04) x$10^{-2}$ | 192 ± 2 |

Среднее значение для 3 повторов

**Таблица 245. Профиль заряда AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 14 дней)**

| Тестируемый образец | % кислых фрагментов | % фрагментов главного продукта | % основных фрагментов |
|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 41,9 | 49,4 | 8,7 |
| AB0192, pH 5, 40°C, 2 недели | 49,8 | 41,4 | 8,8 |

**Таблица 246. Активность AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой низкий уровень pH (pH 5,0, 40°C, 14 дней), в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV**

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|
| AB0192, контроль | 1,9 | 18 |
| AB0192, pH 5, 40°C, 2 недели | 2,0 | 18 |

Стрессовое условие pH 8

**[01108]** Химическую стабильность AB0192 также оценивали посредством инкубации при повышенном pH (20 мМ Tris, pH 8,0, 40°C, 2 недели). После 2 недель при pH 8 при определении посредством SEC снижение содержания мономера составляло 1,6% (фиг. 268 и таблица 247). Незначительные различия в чистоте были выявлены посредством CE-SDS в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях (фиг. 269 и таблица 248). Не было значимых различий в аффинности в отношении CLEC12A, NKG2D или CD16aV или количестве наблюдаемых активных соединений (фиг. 270 и таблица 249). Был выявлен значительный кислотный сдвиг в общем профиле заряда, выявленный посредством cIEF (фиг. 271 и таблица 250), который можно отнести к дезамидированию по всей молекуле. Однако этот кислотный сдвиг не оказал существенного эффекта в отношении активности AB0192 (фиг. 272 и таблица 251).

**Таблица 247. Результаты SEC-анализа AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8,0, 40C, 14 дней)**

| Тестируемый образец | Конц. (мг/мл) | Мономер (%) | LMWS (%) | HMWS (%) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 1,1 | 99,3 | 0,7 | 0,0 |
| AB0192, pH 8, 40°C, 2 недели | 1,2 | 97,7 | 1,6 | 0,7 |

**Таблица 248. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8,0, 40°C, 14 недели).**

| Тестируемый образец | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE |
|---|---|---|
| AB0192, контроль | 97,4 | 98,3 |
| AB0192, pH 8, 40°C, 2 недели | 95,7 | 94,7 |

**Таблица 249. Кинетические параметры и аффинность связывания AB0089 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16a после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8,0, 40°C, 14 дней), измеренные посредством SPR**

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | hCLEC12A | (7,71±0,04) x$10^5$ | (1,29±0,02) x$10^{-3}$ | 1,68 ± 0,00 |
| AB0192, pH 8, 40°C, 2 недели | hCLEC12A | (7,68±0,17) x$10^5$ | (1,28±0,04) x$10^{-3}$ | 1,66 ± 0,10 |
| AB0192, контроль | hNKG2D | (2,08±0,03) x$10^5$ | (1,22±0,01) x$10^{-1}$ | 588 ± 6 |
| AB0192, pH 8, 40°C, 2 недели | hNKG2D | (1,56±0,09) x$10^5$ | (1,21±0,04) x$10^{-1}$ | 779 ± 45 |
| AB0192, контроль | CD16aV | (1,17±0,02) x$10^5$ | (1,99±0,05) x$10^{-2}$ | 171 ± 2 |
| AB0192, pH 8, 40°C, 2 недели | CD16aV | (1,10±0,04) x$10^5$ | (1,91±0,04) x$10^{-2}$ | 173 ± 2 |

Среднее значение для 3 повторов

**Таблица 250. Профиль заряда AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8,0, 40°C, 14 дней)**

| Тестируемый образец | % кислых фрагментов | % фрагментов главного продукта | % основных фрагментов |
|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 42,7 | 48,6 | 8,7 |
| AB0192, pH 8, 40°C, 2 недели | 60,3 | 30,5 | 9,1 |

**Таблица 251. Активность AB0192 после длительного воздействия стрессового условия, представляющего собой высокий уровень pH (pH 8,0, 40°C, 14 дней), оцениваемые посредством анализа цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV**

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|
| AB0192, контроль | 1,9 | 18 |
| AB0192, pH 8, 40°C, 2 недели | 3,0 | 18 |

Анализ посредством пептидного картирования материала, подвергнутого стрессовому условию, представляющему собой pH 5 и pH 8

**[01109]** Чтобы определить, являются ли выявленные посредством cIEF изменения, вызванные стрессовым условием pH, следствием модификации в определяющих комплементарность областях (CDR), те же образцы, подвергнутые стрессовому условию, представляющему собой pH 5 и pH 8, анализировали с помощью пептидного картирования посредством LC-MS/MS. На основании данных пептидной карты все CDR в AB0192 являются устойчивыми к модификации при воздействии стрессового условия, представляющего собой низкий и высокий уровни pH (таблица 252). Исходя из ручной проверки формы пика, признаков изомеризации аспарагиновой кислоты не выявили.

**Таблица 252. Посттрансляционные модификации в CDR AB0192 после воздействий стрессовых условий, представляющих собой низкий и высокий уровень pH**

| | | | | Относительное содержание (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | pH 5 | | pH 8 | |
| **Цепь** | **CDR** | **Последовательность (Chothia)** | **Потенциальная предрасположенность к неблагоприятной модификации** | **Контроль** | **Подвергнутое стрессовому условию** | **Контроль** | **Подвергнутое стрессовому условию** |
| S | H1 | GFTFNAF (SEQ ID NO:195) | Дезамидирование | NA | | | |
| S | H2 | SSGSTS (SEQ ID NO:196) | Отсутствует | NA | | | |
| S | H3 | DGYPTGGAMDY (SEQ ID NO:187) | Изомеризация | Не выявлено | | | |
| S | L1 | KASQDIYNYLS (SEQ ID NO:198) | Дезамидирование | NA | | | |
| S | L2 | RANILVS (SEQ ID NO:199) | Дезамидирование | Не выявлено | | | |
| S | L3 | LQFDAFPFT (SEQ ID NO:201) | Отсутствует | NA | | | |
| H | H1 | GFTFSSY (SEQ ID NO:297) | Отсутствует | NA | | | |
| H | H2 | SSSSSY (SEQ ID NO:298) | Отсутствует | NA | | | |
| H | H3 | GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:97) | Усечение | Не выявлено | | | |

| | | | | Относительное содержание (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | pH 5 | | pH 8 | |
| **Цепь** | **CDR** | **Последовательность (Chothia)** | **Потенциальная предрасположенность к неблагоприятной модификации** | **Контроль** | **Подвергнутое стрессовому условию** | **Контроль** | **Подвергнутое стрессовому условию** |
| L | L1 | RASQGISSWLA (SEQ ID NO:86) | Отсутствует | NA | | | |
| L | L2 | AASSLQS (SEQ ID NO:77) | Отсутствует | NA | | | |
| L | L3 | QQGVSFPRT (SEQ ID NO:87) | Отсутствует | NA | | | |

NA: не применимо

*Технологичность*

Стабильность при замораживании/оттаивании

**[01110]** Аликвоты AB0192 (20 мг/мл в CST, pH 7,0) замораживали и оттаивали 6 раз путем помещения флаконов в контейнер из пенополистирола (для замедления скорости замораживания) и помещения контейнера в условия -80°C. После замораживания контейнер помещали на лабораторный стол и аликвоты оставляли для оттаивания. После 6 циклов замораживания/оттаивания AB0192 не продемонстрировало снижения содержания мономера, определенного посредством SEC, и концентрация белка осталась прежней (фиг. 273 и таблица 253).

**Таблица 253. Результаты SEC-анализа AB0192 после воздействия замораживания/оттаивания**

| **Тестируемый образец** | **Конц. (мг/мл)** | **Мономер (%)** | **LMWS (%)** | **HMWS (%)** |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 21,2 | 98,9 | 1,1 | ND |
| AB0192, 6 З/О | 20,8 | 98,9 | 1,1 | ND |

ND: не выявлено

**[01111]** После 6 циклов замораживания/оттаивания не было выявлено снижения чистоты, определенной посредством CE-SDS либо в восстанавливающих, либо в невосстанавливающих условиях (фиг. 274 и таблица 254).

**Таблица 254. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0192 после воздействия стрессового условия, представляющего собой замораживание/оттаивание**

| Тестируемый образец | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE (%) |
|---|---|---|
| AB0192, контроль | 99,0 | 97,3 |
| AB0192, 6 З/О | 99,1 | 97,7 |

Перемешивание

**[01112]** Исследование с перемешиванием осуществляли в буфере CST, pH 7,0. AB0192 инкубировали в течение 24 ч. при постоянном вращении (60 об/мин) в стеклянной колбе с магнитной микромешалкой. Посредством SEC не было выявлено снижения содержания мономера по сравнению с контрольным образцом (фиг. 275 и таблица 255).

**Таблица 255. Результаты SEC-анализа AB0192 после воздействия стрессового условия, представляющего собой перемешивание**

| Тестируемый образец | Конц. (мг/мл) | Мономер (%) | LMWS (%) | HMWS (%) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 21,2 | 98,9 | 1,1 | ND |
| AB0192, перемешивание | 21,4 | 98,7 | 1,0 | 0,3 |

ND: не выявлено

**[01113]** После 24 часов перемешивания не было выявлено увеличения фрагментации посредством CE-SDS в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях (фиг. 276 и таблица 256).

**Таблица 256. Результаты анализа посредством NR и R CE-SDS антитела AB0192 после воздействия стрессового условия, представляющего собой перемешивание**

| Тестируемый образец | Чистота, определенная посредством NR CE (%) | Чистота, определенная посредством R CE (%) |
|---|---|---|
| AB0192, контроль | 99,0 | 97,3 |
| AB0192, перемешивание | 99,2 | 97,1 |

Выдерживание при низком уровне pH

**[01114]** Чтобы определить, можно ли в отношении AB0192 осуществлять обычно применяемый протокол выдерживания при низком уровне pH, применяемый для вирусной инактивации при изготовлении биологических препаратов, авторы настоящего изобретения провели исследование с выдерживанием при низком уровне pH. Инкубация при низком уровне pH потенциально может нарушить биофизическую стабильность и целостность молекулы и могла бы вызывать химическое разложение боковых цепей аминокислот, в частности изомеризацию аспарагиновой кислоты. Существует потенциальная предрасположенность к неблагоприятной модификации последовательности DS в CDRH3 цепи S. Поэтому авторы настоящего изобретения применяли широкий спектр анализов для оценки качества белка после выдерживания при низком уровне pH. Основную часть элюата с AB0192 из колонки с иммобилизованным белком A немедленно доводили до нейтрального pH, а образец меньшего размера доводили до pH 3,7 и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа для имитации типичной стадии вирусной инактивации. После периода выдерживания элюат из колонки с иммобилизованным белком A нейтрализовали посредством 1,0 M Tris, pH 8,3, с достижением нейтрального pH. Осуществляли аналитическую эксклюзионную хроматографию, чтобы определить, имелись ли какие-либо изменения в профиле или содержании агрегатов до и после воздействия низкого уровня pH (фиг. 277). Никаких изменений в профиле не наблюдалось после выдерживания при низком pH. Обе аликвоты дополнительно очищали посредством второй ионообменной хроматографии и подвергали анализам, составляющим панель для определения характеристик.

**[01115]** Химическую модификацию боковых цепей аминокислот обычно можно определять экспериментально в общем масштабе посредством cIEF. cIEF-профили контрольного антитела AB0192 и партии, выдерживаемой при низком уровне pH, визуально очень схожи, а результаты относительного количественного определения кислых фрагментов, фрагментов главного продукта и основных фрагментов находятся в пределах 2% друг от друга. Это указывает на то, что выдерживание при низком уровне pH не оказало поддающегося измерению эффекта в отношении профиля заряда AB0192 (фиг. 278 и таблица 257).

**Таблица 257. Профиль заряда AB0192 после выдерживания при низком уровне pH**

| Тестируемый образец | pI | % кислых фрагментов | % фрагментов главного продукта | % основных фрагментов |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | 8,9 | 41,4 | 49,8 | 8,8 |
| AB0192, выдерживание при низком уровне pH | 8,9 | 43,1 | 48,2 | 8,7 |

**[01116]** После стадии выдерживания при низком уровне pH значения аффинности связывания в отношении hCLEC12a, hNKG2D и CD16aV не изменялись (фиг. 279 и таблица 258). Это указывает на то, что AB0192 сохраняет аффинность связывания в отношении всех трех мишеней в условиях выдерживания при низком уровне pH, используемых в качестве стадии вирусной инактивации при изготовлении биологических препаратов.

**Таблица 258. Кинетические параметры и значения аффинности связывания AB0192 в отношении CLEC12A, NKG2D и CD16a после выдерживания при низком уровне pH, измеренные посредством SPR**

| Тестируемый образец | Мишень | $k_a$ ($M^{-1}c^{-1}$) | $k_d$ ($c^{-1}$) | $K_D$ (нМ) |
|---|---|---|---|---|
| AB0192, контроль | hCLEC12A | $6,85 \times 10^5$ | $1,25 \times 10^{-3}$ | 1,83 |
| AB0192, выдерживание при низком уровне pH | hCLEC12A | $(6,90 \pm 0,17) \times 10^5$ | $(1,15 \pm 0,01) \times 10^{-3}$ | 1,66 ± 0,05 |
| AB0192, контроль | hNKG2D | $(1,88 \pm 0,08) \times 10^5$ | $(1,46 \pm 0,060) \times 10^{-1}$ | 779 ± 10 |
| AB0192, выдерживание при низком уровне pH | hNKG2D | $(1,78 \pm 0,08) \times 10^5$ | $(1,42 \pm 0,03) \times 10^{-1}$ | 796 ± 47 |
| AB0192, контроль | CD16aV | $(1,12 \pm 0,08) \times 10^5$ | $(1,99 \pm 0,08) \times 10^{-2}$ | 178 ± 6 |
| AB0192, выдерживание при низком уровне pH | CD16aV | $(1,18 \pm 0,06) \times 10^5$ | $(2,12 \pm 0,09) \times 10^{-2}$ | 180 ± 15 |

**[01117]** Активность образца, выдерживаемого при низком уровне pH, дополнительно тестировали по отношению к раковым клеткам CLEC12A+ PL-21 в биологическом анализе цитотоксичности KHYG1-CD16aV. Активность AB0192 не изменялась после стадии выдерживания при низком уровне pH (фиг. 280 и таблица 259).

**Таблица 259. Активность AB0192 после выдерживания при низком уровне pH в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG1-CD16a**

| Тестируемый образец | EC50 (нМ) | Макс. уничтожение (%) |
|---|---|---|
| AB0192, контроль | 2,5 | 18 |
| AB0192, выдерживание при низком уровне pH | 2,0 | 18 |

**[01118]** В совокупности эти результаты демонстрируют, что молекулярный формат и структура AB0192 соответствуют концептуальным требованиям для нового мультиспецифического терапевтического воздействия, в котором для лечения AML задействуют одновременно CLEC12A, NKG2D и CD16a. AB0192 является высокоактивным и характеризуется благоприятным профилем реализуемости без каких-либо потенциальных участков неблагоприятных модификаций или значимых посттрансляционных модификаций, наблюдаемых при любых стрессовых условиях. AB0192 связывается с эпитопом, отличным от такового для TriNKET AB0237 и AB0089.

## ВКЛЮЧЕНИЕ ПО ССЫЛКЕ

**[01119]** Если не указано иное, то полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в данном документе, включено посредством ссылки для всех целей.

## ЭКВИВАЛЕНТЫ

**[01120]** Настоящая заявка может быть осуществлена в других конкретных формах, не отступая от ее сущности или существенных характеристик. Таким образом, приведенные выше варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие применение, описанное в данном документе. Таким образом, объем настоящей заявки указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, и при этом предполагается, что все изменения, которые соответствуют смыслу и диапазону эквивалентности формулы изобретения, рассматриваются как охваченные нею.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

| **SEQ ID NO** | **Последовательность** |
|---|---|
| 1 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWS FDPWGQGTLVTVSS |
| 2 | GSFSGYYWS |
| 3 | EIDHSGSTNYNPSLKS |
| 4 | ARARGPWSFDP |
| 5 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYPITFGGGTKVEIK |
| 6 | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGGGTKVEI K |
| 7 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYHSFYTFGGGTKVEIK |
| 8 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQSNSYYTFGGGTKVEIK |
| 9 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYPTFGGGTKVEIK |
| 10 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWG FDPWGQGTLVTVSS |
| 11 | ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIK |
| 12 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYGSFPITFGGGTKVEIK |
| 13 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEI K |
| 14 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSFPTFGGGTKVEIK |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 15 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDIYPTFGGGTKVEIK |
| 16 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDSYPTFGGGTKVEIK |
| 17 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYGSFPTFGGGTKVEIK |
| 18 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYQSFPTFGGGTKVEIK |
| 19 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSSFSTFGGGTKVEIK |
| 20 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYESYSTFGGGTKVEIK |
| 21 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDSFITFGGGTKVEIK |
| 22 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYQSYPTFGGGTKVEIK |
| 23 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYHSFPTFGGGTKVEIK |
| 24 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYELYSYTFGGGTKVEIK |
| 25 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDTFITFGGGTKVEIK |
| 26 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGI IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDSSIR HAYYYYGMDVWGQGTTVTVSS |
| 27 | GTFSSYAIS |
| 28 | SYAIS |
| 29 | GIIPIFGTANYAQKFQG |
| 30 | ARGDSSIRHAYYYYGMDV |
| 31 | GDSSIRHAYYYYGMDV |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 32 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPITFG GGTKVEIK |
| 33 | KSSQSVLYSSNNKNYLA |
| 34 | WASTRES |
| 35 | QQYYSTPIT |
| 36 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGSDRFHP YFDYWGQGTLVTVSS |
| 37 | GSISSSSYYWG |
| 38 | SSSYYWG |
| 39 | SIYYSGSTYYNPSLKS |
| 40 | ARGSDRFHPYFDY |
| 41 | GSDRFHPYFDY |
| 42 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFDTWPPTFGGGTKVEIK |
| 43 | RASQSVSRYLA |
| 44 | DASNRAT |
| 45 | QQFDTWPPT |
| 46 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCEQYDSYPTFGGGTKVEIK |
| 47 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGI IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGRKAS GSFYYYYGMDVWGQGTTVTVSS |
| 48 | ARRGRKASGSFYYYYGMDV |
| 49 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKP LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFG QGTKLEIK |
| 50 | ESSQSLLNSGNQKNYLT |
| 51 | QNDYSYPYT |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 52 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGAP NYGDTTHDYYYMDVWGKGTTVTVSS |
| 53 | YTFTSYYMH |
| 54 | SYYMH |
| 55 | IINPSGGSTSYAQKFQG |
| 56 | ARGAPNYGDTTHDYYYMDV |
| 57 | GAPNYGDTTHDYYYMDV |
| 58 | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDDWPFTFGGGTKVEI K |
| 59 | RASQSVSSNLA |
| 60 | GASTRAT |
| 61 | QQYDDWPFT |
| 62 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMG WINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDT GEYYDTDDHGMDVWGQGTTVTVSS |
| 63 | YTFTGYYMH |
| 64 | GYYMH |
| 65 | WINPNSGGTNYAQKFQG |
| 66 | ARDTGEYYDTDDHGMDV |
| 67 | DTGEYYDTDDHGMDV |
| 68 | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDDYWPPTFGGGTKVEI K |
| 69 | QQDDYWPPT |
| 70 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYY DSGAGDYWGQGTLVTVSS |
| 71 | FTFSSYAMS |
| 72 | AISGSGGSTYYADSVKG |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 73 | AKDGGYYDSGAGDY |
| 74 | DGGYYDSGAGDY |
| 75 | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSYPRTFGGGTKVEI K |
| 76 | RASQGIDSWLA |
| 77 | AASSLQS |
| 78 | QQGVSYPRT |
| 79 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMG AAAGWFDPWGQGTLVTVSS |
| 80 | FTFSSYSMN |
| 81 | SYSMN |
| 82 | SISSSSSYIYYADSVKG |
| 83 | ARGAPMGAAAGWFDP |
| 84 | GAPMGAAAGWFDP |
| 85 | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK |
| 86 | RASQGISSWLA |
| 87 | QQGVSFPRT |
| 88 | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGCGTKVEIK *GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSY SMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS |
| 89 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGA GFAYGMDYYYMDVWGKGTTVTVSS |
| 90 | AREGAGFAYGMDYYYMDV |
| 91 | EGAGFAYGMDYYYMDV |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 92 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSDNWPFTFGGGTKVEIK |
| 93 | RASQSVSSYLA |
| 94 | QQSDNWPFT |
| 95 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**I**GA AAGWFDPWGQGTLVTVSS |
| 96 | ARGAP**I**GAAAGWFDP |
| 97 | GAP**I**GAAAGWFDP |
| 98 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**Q**G AAAGWFDPWGQGTLVTVSS |
| 99 | ARGAP**Q**GAAAGWFDP |
| 100 | GAP**Q**GAAAGWFDP |
| 101 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**L**GA AAGWFDPWGQGTLVTVSS |
| 102 | ARGAP**L**GAAAGWFDP |
| 103 | GAP**L**GAAAGWFDP |
| 104 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**F**GA AAGWFDPWGQGTLVTVSS |
| 105 | ARGAP**F**GAAAGWFDP |
| 106 | GAP**F**GAAAGWFDP |
| 107 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**V**GA AAGWFDPWGQGTLVTVSS |
| 108 | ARGAP**V**GAAAGWFDP |
| 109 | GAP**V**GAAAGWFDP |

| **SEQ ID NO** | **Последовательность** |
|---|---|
| 110 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**X**GA AAGWFDPWGQGTLVTVSS, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F |
| 111 | ARGAP**X**GAAAGWFDP, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F |
| 112 | GAP**X**GAAAGWFDP, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F |
| 113 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFI RYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRG LGDGTYFDYWGQGTTVTVSS |
| 114 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDD LLPSGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGT KLTVL |
| 115 | SYAMS |
| 116 | QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISY SGSANYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIW GQGTMVTVSS |
| 117 | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEI K |
| 118 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 119 | $(GlyGlyGlyGlySer)_4$ ($(G_4S)_4$) |
| 120 | $(GS)_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 |
| 121 | $(GGS)_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 |
| 122 | $(GGGS)_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 123 | $(GGSG)_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 |
| 124 | $(GGSGG)_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 |
| 125 | $(GGGGS)_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 |
| 126 | GSGSGSGSGSGSGSGSGS |
| 127 | GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS |
| 128 | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS |
| 129 | GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG |
| 130 | GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG |
| 131 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS |
| 132 | GGGGSGGGGSGGGGS |
| 133 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 142 | QQSHSYPLT |
| 143 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSS |
| 144 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGQGTKLEIK |
| 145 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 146 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY GLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSV QANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |
| 147 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSS |
| 148 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNAFGMHWVRQAPGKGLEWVAFI SSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPT GGAMDYWGQGTSVTVSS |
| 149 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 150 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| | GLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV QANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |
| 151 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKX$_1$PKLLIYEAS NLHTGVPSRFSGSGSGTX$_2$FTLTISSLQPEDX$_3$ATYYCQQSHSYPLTFGX$_4$GTKL EIK, где X$_1$ представляет собой A или I, X$_2$ представляет собой D или R, X$_3$ представляет собой F или I, и X$_4$ представляет собой Q или G |
| 152 | KSSQSLLWNVNQNNYLV |
| 153 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTANDTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 154 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY GLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSV TANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |
| 155 | EVQLQESGAELVRSGASIKLSCAASAFNIKDYFIHWVRQRPDQGLEWIGWID PENDDTEYAPKFQDKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSADTAVYYCNALWSRG GYFDYWGQGTTLTVSS |
| 156 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 157 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY GLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSV QAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 158 | EVLLTQSPAIIAASPGEKVTITCSARSSVSYMSWYQQKPGSSPKIWIYGISKLA SGVPARFSGSGSGTYFSFTINNLEAEDVATYYCQQRSYYPFTFGSGTKLEIK |
| 159 | AFNIKDY |
| 160 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCARYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 161 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY GLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSV QANDTAVYYCARYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |
| 162 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKGLEWVAFI SSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPT GGAMDYWGQGTSVTVSS |
| 163 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGQGTKLEIK |
| 164 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 165 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY GLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSV QANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |
| 166 | WSGGS |
| 167 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGQGTKLEIK |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 168 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 169 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY GLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSV QANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |
| 170 | DPENDD |
| 171 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGQGTKLEIK |
| 172 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 173 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY GLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSV QANDTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |
| 174 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARYDYDDSLD YWGQGTLVTVSS |
| 175 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGQGTKLEIK |
| 176 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARYDYDDSLD YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV |

| **SEQ ID NO** | **Последовательность** |
|---|---|
| | TITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 177 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |
| 178 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |
| 179 | QHNHGSFLPYT |
| 180 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 181 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSS |
| 182 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISX$_1$DTSKNQFSLKLSSVX$_2$AX$_3$DTAVYYCAX$_4$YDYDDSLDYWGQGTLVTVSS; где X$_1$ представляет собой V или K, X$_2$ представляет собой T или Q, X$_3$ представляет собой A или N, и X$_4$ представляет собой R или K |
| 183 | LWSRGGYFDY |
| 184 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| | SVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSG SGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK |
| 185 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANI LVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNS FGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSS |
| 186 | SARSSVSYMS |
| 187 | DGYPTGGAMDY |
| 188 | GISKLAS |
| 189 | QQRSYYPFT |
| 190 | EVQLQESGPELEKPGASVRISCKASGYSFTAYNMNWVKQSNGKSLEWIGNID PSYGDATYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARDNYY GSGYFDYWGQGTTLTVSS |
| 191 | SVLMTQTPLSLPVSLGDRASISCRSSQGIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGG TKLEIK |
| 192 | GFTFNSF |
| 193 | EVQLQESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPEKGLEWVAFI SSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARDGYPT GGAMDYWGQGTSVTVSS |
| 194 | DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIYNYLSWFQLKPGKSPRPLIYRANI LVSGVPSKFSGSGSGQDYSLTINSLEYEDLGIYYCLQFDAFPFTFGSGTKLEIK |
| 195 | GFTFNAF |
| 196 | SSGSTS |
| 197 | GYSFTAY |
| 198 | KASQDIYNYLS |
| 199 | RANILVS |
| 200 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| | GLHWIRQPPGKCLEWIGVILSGGWTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSV QAADTAVYYCAKGDYGDALDYWGQGTLVTVSS |
| 201 | LQFDAFPFT |
| 202 | DPSYGD |
| 203 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANI LVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGSGTKLEIK |
| 204 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNAFGMHWVRQAPGKCLEWVAFI SSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPT GGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSG SGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK |
| 205 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANI LVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNA FGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSS |
| 206 | GFSLTSY |
| 207 | DNYYGSGYFDY |
| 208 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLEWVAFI SSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYPT GGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSG SGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK |
| 209 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANI LVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNS FGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSS |
| 210 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKGLEWVAFI SSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYPT GGAMDYWGQGTSVTVSS |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 211 | RSSQGIVHINGNTYLE |
| 212 | KVSNRFS |
| 213 | SGYPTGGAMDY |
| 214 | FQGSHVPWT |
| 215 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLEWVAFI SSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPT GGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIKMTQSPSSLSA SVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSG SGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK |
| 216 | DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANI LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNS FGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSS |
| 217 | EVQLQESGAELVRSGASVKLSCTVSGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWI DPENGDTENVPKFQGKATMTADTSSNTAYLQLRSLTSEDTAVYYCKSYYYD SSSRYVDVWGAGTTVTVSS |
| 218 | DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANI LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGSGTKLEIK |
| 219 | GIVMTQAPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTFLNWFLQRPGQSPKRLIS LVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKLSRVEPEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK |
| 220 | GFNIKDY |
| 221 | GFSLTSF |
| 222 | DPENGD |
| 223 | SYFAMDY |
| 224 | KSSQSLLDSDGKTFLN |
| 225 | LVSKLDS |
| 226 | GASIRES |
| 227 | WQGTHFPYT |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 228 | EVQLQESGAELMKPGASVKISCRTTGYTFSTYWIEWVKQRPGRGPEWIGELF PGNSDTTLNEKFTGKATFTADSSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSGYYGS SLDYWGQGTTLTVSS |
| 229 | GIVMTQSPASLSASVGETVTITCRAGENIHSYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAK TLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGTPRTFGGGTKLE IK |
| 230 | GYTFSTY |
| 231 | FPGNSD |
| 232 | SGYYGSSLDY |
| 233 | RAGENIHSYLA |
| 234 | NAKTLAE |
| 235 | QHHYGTPRT |
| 236 | WSGGN |
| 237 | GIVMTQSPSSLAVTAGEKVTMRCKSSQSLLWNVNQNNYLVWYQQKQGQPP KLLIYGASIRESWVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVHAEDLAVYYCQHNHGSFLP YTFGGGTKLEIK |
| 238 | EVQLQESGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSFGIHWVRQSPGKGLEWLGVIWS GGNTDSNAAFISRLSITKDISKSQVFFKMNSLQVTDTAIYYCARSYFAMDYW GQGTSVTVSS |
| 239 | GASIRQS |
| 240 | KSSQSLLWNVNQNNYLL |
| 241 | THFGMDY |
| 242 | QVQLRQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPGKGLEWLGVM WSGGSTDYNAAFMSRLSISKDNSKSQVFFTMNSLQADDTAIYYCARTHFGM DYWGQGTPVTVSS |
| 243 | GIVMTQSPSSLAVTAGEKVTMRCKSSQSLLWSVNQNNYLLWYQQKQGQPP KLLIYGASIRQSWVPDRFTGSGSGTDFTLSISNVHAEDLAVYYCQHNHGSFLP YTFGGGTKLEIK |
| 244 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTANDTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSS |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 245 | KSSQSLLWSVNQNNYLL |
| 246 | XGYPTGGAMDY, где X представляет собой D или S |
| 247 | EVQLQESGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSFGVHWVRQSPGKGLEWLGVIW SGGSTDSNAAFISRLTITKDNSKSQVFFKMNSLQATDTAIYYCARSYFAMDY WGQGTSVSVSS |
| 248 | DIVMTQSPSSLAVTAGEKVTMRCKSSQSLLWNVNQNNYLLWYQQKQGQPP KLLIYGASIRESWVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVHVEDLAVYYCQHNHGSFLP YTFGGGTKLEIK |
| 249 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNX$_1$FGMHWVRQAPGKGLEWVAF ISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARX$_2$GYP TGGAMDYWGQGTSVTVSS, где X$_1$ представляет собой S или A, и X$_2$ представляет собой D или S |
| 250 | DIX$_1$MTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANI LVSGVPSRFSGSGSGQDYTX$_2$TISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGSGTKLEIK , где X$_1$ представляет собой Q или K, и X$_2$ представляет собой F или L |
| 251 | GFTFNXF, где X представляет собой S или A |
| 252 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNAFGMHWVRQAPGKCLEWVAFI SSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPT GGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIKMTQSPSSLSA SVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSG SGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK |
| 253 | DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANI LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNA FGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSS |
| 254 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKCLEWVAFI SSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYPT GGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIKMTQSPSSLSA SVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSG SGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 255 | DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANI LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNS FGMHWVRQAPGKCLEWVAFISSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSS |
| 256 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQANDTAVYYCARYDYDDSL DYWGQGTLVTVSS |
| 257 | YYYDSSSRYVDV |
| 258 | MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLTLLCLLL LIGLGVLASMFHVTLKIEMKKMNKLQNISEELQRNISLQLMSNMNISNKIRNL STTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYFLSDDVQTWQESK MACAAQNASLLKINNKNALEFIKSQSRSYDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIIN SSAWVIRNAPDLNNMYCGYINRLYVQYYHCTYKKRMICEKMANPVQLGST YFREA |
| 259 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIKGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG |
| 260 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGA AAGWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT |

| **SEQ ID NO** | **Последовательность** |
|---|---|
| | ENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 261 | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC |
| 262 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY GLHWIRQPPGKCLEWIGVIWSGGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSV QAADTAVYYCAKYDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG |
| 263 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGI INPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGNYG DEFDYWGQGTLVTVSS |
| 264 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK |
| 265 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSSYNYMHWYQQKPGKPPKLLI KYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSWEIPLTFGQGT KVEIK |
| 266 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMHWVRQAPGQGLEWIGR INPYNGAAFYSQNFKDRVTLTVDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCAIERGAD LEGYAMDYWGQGTLVTVSS |
| 267 | ATGGACATGAGGGTACCAGCTCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTTTGGCT TCCTGGCGCTAGATGCCAATTGCAGCTGCAAGAATCCGGACCAGGGCTCG TAAAACCTTCTGAAACCCTCTCCCTCACTTGCACTGTGTCTGGATTCTCTC |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| | TCACGAACTACGGGTTGCATTGGATCCGACAGCCGCCTGGCAAGTGTCTT<br>GAGTGGATTGGCGTTATCTGGTCAGGAGGGAAGACGGATTATAATCCAA<br>GTCTGAAATCCAGAGTGACAATTTCTAAGGACACGTCCAAAAATCAGTTT<br>AGCCTCAAACTTTCCTCAGTTCAGGCTGCTGATACAGCGGTGTACTATTG<br>CGCAAAGTACGACTATGATGACAGTTTGGACTACTGGGGACAGGGTACA<br>CTGGTAACAGTGAGTTCTGGAGGCGGCGGTAGTGGAGGCGGGGGAAGTG<br>GTGGCGGAGGGAGTGGAGGAGGGGGCAGTGATATTCAAATGACGCAGAG<br>CCCCAGTTCCCTTTCAGCTAGCGTTGGCGACAGAGTAACGATAACGTGTC<br>ACGCTTCCCAGAACATTAATTTTTGGCTTAGCTGGTATCAACAGAAACCG<br>GGAAAAGCACCCAAGCTGCTTATCTATGAAGCGTCCAATCTCCACACGGG<br>TGTCCCATCAAGATTTTCTGGATCAGGCAGTGGCACACGATTCACACTGA<br>CCATTAGTTCCTTGCAGCCCGAGGATATCGCAACTTACTACTGTCAGCAA<br>AGTCACTCTTACCCGTTGACATTCGGATGTGGAACTAAACTGGAGATTAA<br>GGGATCCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGC<br>TCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTG<br>ATGATCAGCAGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCA<br>CGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTG<br>CACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACA<br>GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAA<br>GAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAA<br>AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTAGAGTGTATACC<br>TTGCCTCCATGCCGGGACGAGCTGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTG<br>CCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA<br>ATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGTGTCC<br>GACGGCAGCTTTACCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGAT<br>GGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC<br>AACCACTACACCCAGAAAAGCCTGAGCCTGTCTCCTGGCTAA |
| 268 | ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACAGGCGT<br>GCACTCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGGACTTGTGAAGCCTG<br>GCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGC<br>TACAGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGG<br>TGTCCAGCATCAGCAGCAGCTCCAGCTACATCTACTACGCCGACAGCGTG |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| | AAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACC<br>TGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCT<br>AGAGGCGCCCCTATTGGAGCCGCCGCTGGATGGTTCGATCCTTGGGGACA<br>GGGAACCCTGGTCACCGTTTCTTCTGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTT<br>CCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGAGCACAAGCGGAGGAACAGCTGCCCTG<br>GGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAA<br>CAGCGGAGCACTGACTAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAAA<br>GCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCTAGCAGCTCT<br>CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACAC<br>CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC<br>TGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTG<br>TTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGT<br>GACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA<br>ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAG<br>AGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACAGTG<br>CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA<br>ACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG<br>CCAGCCTCGCGAACCTCAAGTCTGTACACTGCCTCCTAGCCGGGATGAGC<br>TGACCGAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCC<br>TCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACT<br>ACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTAC<br>AGCTGGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCT<br>CCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC<br>CTGTCTCTGAGCCCAGGCTAA |
| 269 | ATGGACATGAGAGTTCCAGCTCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTTTGGCT<br>TCCTGGCGCTAGATGCGACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCTCCGTGT<br>CTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGG<br>CATCTCTTCTTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTA<br>AGCTGCTGATCTATGCCGCTAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCCTCTAGAT<br>TTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGC<br>AGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTATTGTCAGCAGGGCGTGTCCTTTCCA<br>CGGACCTTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACAGTGGCCG |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| | CTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGC ACAGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGAGAAGCCAA GGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAG AGCGTGACAGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCA CCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTG CGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACC GGGGCGAGTGTTGA |
| 270 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWV GGATDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDTL DYWGQGTLVTVSS |
| 271 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGSGTKLEIK |
| 272 | WVGGA |
| 273 | GDYGDTLDY |
| 274 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWV GGATDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDTL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 275 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY GLHWIRQPPGKCLEWIGVIWVGGATDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VQAADTAVYYCAKGDYGDTLDYWGQGTLVTVSS |
| 276 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWV GGATDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDTL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIKGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| | KGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG |
| 277 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVILS GGWTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDAL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIKGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG |
| 278 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNAFGMHWVRQAPGKCLEWVAFI SSGSTSIYYANTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPT GGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCKASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIYRANILVSGVPSRFSGSG SGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIKGSDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG |
| 279 | GDYGDALDY |
| 280 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVILS GGWTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDAL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 281 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| | VTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKIPKLLIYEASNLHTGVPSRFSGSGSGTRF TLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIKGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG |
| 282 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASNSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASS TKSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDDLPTFGGGTKVEIK |
| 283 | YDYDDALDY |
| 284 | YDYDDILDY |
| 285 | YDYDDLLDY |
| 286 | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGTLVTVSSGSDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG |
| 287 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVIWS GGKTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKYDYDDSL DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |

| **SEQ ID NO** | **Последовательность** |
|---|---|
| 288 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC |
| 289 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGGGTKLEIK |
| 290 | YDYDDVLDY |
| 291 | YDYDDTLDY |
| 292 | YDYDESLDY |
| 293 | DYDDSLDY |
| 294 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKGLEWIGVILS GGWTDYNPSLKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDAL DYWGQGTLVTVSS |
| 295 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTRFTLTISSLQPEDIATYYCQQSHSYPLTFGSGTKLEIK |
| 296 | LSGGW |
| 297 | GFTFSSY |
| 298 | SSSSSY |
| 299 | LSCAASGFTFSSYS**M**NWVR |
| 300 | NSLYLQ**M**NSLR |
| 301 | DTL**M**ISR |
| 302 | WQQGNVFSCSV**M**HEALHNHYTQK |
| 303 | DIQ**M**TQSPSSVSASVGDR |
| 304 | YDYDDSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ**M**TQSPSS LSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPK |
| 305 | XDYDDSLDY, где X = любая аминокислота |
| 306 | YXYDDSLDY, где X = любая аминокислота |
| 307 | YDXDDSLDY, где X = любая аминокислота |
| 308 | YDYXDSLDY, где X = любая аминокислота |
| 309 | YDYDXSLDY, где X = любая аминокислота |

| SEQ ID NO | Последовательность |
|---|---|
| 310 | YDYDDXLDY, где X = любая аминокислота |
| 311 | YDYDDSXDY, где X = любая аминокислота |
| 312 | YDYDDSLXY, где X = любая аминокислота |
| 313 | YDYDDSLDX, где X = любая аминокислота |
| 314 | XXYDDSLDY, где X = любая аминокислота |
| 315 | XDXDDSLDY, где X = любая аминокислота |
| 316 | XDYXDSLDY, где X = любая аминокислота |
| 317 | XDYDXSLDY, где X = любая аминокислота |
| 318 | XDYDDXLDY, где X = любая аминокислота |
| 319 | XDYDDSXDY, где X = любая аминокислота |
| 320 | XDYDDSLXY, где X = любая аминокислота |
| 321 | XDYDDSLDX, где X = любая аминокислота |
| 322 | **G**DY**G**DSLDY |
| 323 | XSGGK, где X = любая аминокислота |
| 324 | WXGGK, где X = любая аминокислота |
| 325 | WSXGK, где X = любая аминокислота |
| 326 | WSGXK, где X = любая аминокислота |
| 327 | WSGGX, где X = любая аминокислота |
| 328 | XXGGK, где X = любая аминокислота |
| 329 | XSXGK, где X = любая аминокислота |
| 330 | XSGXK, где X = любая аминокислота |
| 331 | XSGGX, где X = любая аминокислота |
| 332 | WXXGK, где X = любая аминокислота |
| 333 | WXGXK, где X = любая аминокислота |
| 334 | WXGGX, где X = любая аминокислота |
| 335 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGLHWIRQPPGKCLEWIGVIWV GGATDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVQAADTAVYYCAKGDYGDTL DYWGQGTLVTVSS |
| 336 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINFWLSWYQQKPGKAPKLLIYEASN LHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSYPLTFGCGTKLEIK |
| 337 | RASQGISSWA |

| **SEQ ID NO** | **Последовательность** |
|---|---|
| 338 | SSSSY |
| 339 | GAPMIGAAAGWFDP |
| 340 | LSCAASGFTFNAFG**M**HWVR |
| 341 | NTLYLQMNSLR |
| 342 | DGYPTGGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDR |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16;

где второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, 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 под SEQ ID NO: 137, 272 и 273 соответственно; и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно;

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно;

(iii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 251, 196 и 246 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно;

(iv) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 221, 166 и 223 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 240, 226 и 179 соответственно;

(v) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 206, 166 и 241 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 245, 239 и 179 соответственно;

(vi) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 221, 236 и 223 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 152, 226 и 179 соответственно;

(vii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 159, 170 и 183 соответственно; и VL, содержащий

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 186, 188 и 189 соответственно;

(viii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 197, 202 и 207 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 211, 212 и 214 соответственно;

(ix) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 220, 222 и 257 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 224, 225 и 227 соответственно; или

(x) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 230, 231 и 232 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 233, 234 и 235 соответственно.

2. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, содержит

(i) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 272 и 273 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно; или

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 137, 138 и 139 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 140, 141 и 142 соответственно.

3. Белок по п. 1 или п. 2, где

(i) VH содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:335, и VL содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:336;

(ii) VH содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:270, и VL содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:271; или

(iii) VH содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:178, и VL содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:289.

4. Белок по любому из пп. 1-3, где

(i) VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:335, и VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:336;

(ii) VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:270, и VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:271; или

(iii) VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:178, и VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:289.

5. Белок по п. 1 или п. 2, где VH и VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 143 и 144; 147 и 144; 244 и 144; 178 и 144; 256 и 144; 143 и 163; 143 и 167; 143 и 171 или 174 и 175 соответственно.

6. Белок по любому из пп. 1-5, где второй антигенсвязывающий участок представлен в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), и при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 274, 145, 146, 149, 150, 153, 154, 156, 157, 160, 161, 164, 165, 168, 169, 172, 173, 176, 177, 180, и 181.

7. Белок по п. 6, где scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:274 или SEQ ID NO:180.

8. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 251, 196 и 246 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно.

9. Белок по п. 1, где второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, содержит

(i) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 195, 196, 187 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199, 201 соответственно;

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 187 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно; или

(iii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 192, 196 и 213 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 198, 199 и 201 соответственно.

10. Белок по любому из п. 1 и пп. 8-9, где VH содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:148, и VL содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:203.

11. Белок по любому из п. 1 и пп. 8-10, где VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:148, и VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:203.

12. Белок по п. 11, где VH и VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 162 и 203; 210 и 203; 162 и 218; 148 и 218 или 210 и 218 соответственно.

13. Белок по любому из пп. 8-12, где второй антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, и при этом scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 184, 185, 204, 205, 208, 209, 215, 216, 252, 253, 254 и 255.

14. Белок по п. 13, где scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:204.

15. Белок по любому из предыдущих пунктов, где второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A независимым от гликозилирования образом.

16. Белок, содержащий

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16;

где второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A независимым от гликозилирования образом.

17. Белок по любому из пп. 1-16, где второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A человека с константой диссоциации ($K_D$), равной 20 нМ или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

18. Белок по любому из пп. 1-7 и пп. 16-17, где второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A человека с $K_D$, равной 1 нМ или меньше, как измерено посредством SPR.

19. Белок по любому из пп. 1-7 и пп. 15-18, где второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A человека, содержащий замену K244Q.

20. Белок по любому из пп. 1-19, где белок содержит Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16.

21. Белок по любому из пп. 1-20, где первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой Fab-фрагмент, и второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, представляет собой scFv.

22. Белок по любому из пп. 1-5, 8-12 и пп. 15-20, где первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, и второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, представляет собой Fab-фрагмент.

23. Белок по любому из пп. 1-20, дополнительно содержащий дополнительный антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A.

24. Белок по п. 23, где первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, а каждый из второго и дополнительного антигенсвязывающих участков, которые связывают CLEC12A, представляет собой Fab-фрагмент.

25. Белок по п. 23, где первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой scFv, а каждый из второго и дополнительного антигенсвязывающих участков, которые связывают CLEC12A, представляет собой scFv.

26. Белок по любому из пп. 23-25, где аминокислотные последовательности второго и дополнительного антигенсвязывающих участков являются идентичными.

27. Белок, содержащий

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточные для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16;

где первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, представляет собой Fab-фрагмент, и второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A, представляет собой scFv.

28. Белок по любому из пп. 22, 24-26, где scFv, который связывает NKG2D, связан с константным доменом антитела или его частью, достаточными для связывания CD16, посредством шарнирного участка, содержащего Ala-Ser или Gly-Ser.

29. Белок по любому из п. 21 и пп. 25-28, где каждый scFv, который связывает CLEC12A, связан с константным доменом антитела или его частью, достаточными для связывания CD16, посредством шарнирного участка, содержащего Ala-Ser или Gly-Ser.

30. Белок по п. 28 или п. 29, где шарнирный участок дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly.

31. Белок по любому из пп. 22, 24-26, 28 и п. 30, где в scFv, который связывает NKG2D, вариабельный домен тяжелой цепи scFv образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи scFv.

32. Белок по любому из пп. 21, 25-27 и пп. 30-31, где в каждом scFv, который связывает CLEC12A, вариабельный домен тяжелой цепи scFv образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи scFv.

33. Белок по п. 31 или п. 32, где дисульфидный мостик образован между C44 вариабельного домена тяжелой цепи и C100 вариабельного домена легкой цепи, пронумерованными по системе нумерации согласно Kabat.

34. Белок по любому из пп. 22, 24-26, 28, 30-31 и п. 33, где в scFv, который связывает NKG2D, вариабельный домен тяжелой цепи связан с вариабельным доменом легкой цепи посредством гибкого линкера.

35. Белок по любому из пп. 21, 25-27, 29-30 и пп. 32-34, где в каждом scFv, который связывает CLEC12A, вариабельный домен тяжелой цепи связан с вариабельным доменом легкой цепи посредством гибкого линкера.

36. Белок по п. 34 или п. 35, где гибкий линкер содержит $(G_4S)_4$.

37. Белок по любому из пп. 22, 24-26, 28, 30-31, 33-34 и п. 36, где в scFv, который связывает NKG2D, вариабельный домен тяжелой цепи расположен на C-конце вариабельного домена легкой цепи.

38. Белок по любому из пп. 21, 25-27, 29-30, 32-33 и пп. 35-37, где в каждом scFv, который связывает CLEC12A, вариабельный домен тяжелой цепи расположен на C-конце вариабельного домена легкой цепи.

39. Белок по любому из пп. 22, 24-26, 28, 30-31, 33-34 и п. 36, где в scFv, который связывает NKG2D, вариабельный домен тяжелой цепи расположен на N-конце вариабельного домена легкой цепи.

40. Белок по любому из пп. 21, 25-27, 29-30, 32-33, 35-36 и п. 39, где в каждом scFv, который связывает CLEC12A, вариабельный домен тяжелой цепи расположен на N-конце вариабельного домена легкой цепи.

41. Белок по любому из пп. 21, 27, 29-30, 32-33, 35-36, 38 и п. 40, где Fab-фрагмент, который связывает NKG2D, не расположен между антигенсвязывающим участком и Fc или его частью.

42. Белок по любому из пп. 22, 24, 26, 28, 30-31, 33-34, 36-37 и п. 39, где Fab-фрагмент, который связывает CLEC12A, не расположен между антигенсвязывающим участком и Fc или его частью.

43. Белок по любому из пп. 1-42, где первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 81, 82 и 112 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

44. Белок по любому из пп. 1-42, где первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D, содержит

(i) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 81, 82 и 97 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно; или

(ii) VH, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 81, 82 и 84 соответственно; и VL, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 77 и 87 соответственно.

45. Белок по п. 43 или п. 44, где VH первого антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:95, и VL первого антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:85.

46. Белок по любому из пп. 43-45, где VH первого антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:95, и VL первого антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:85.

47. Белок по любому из пп. 1-46, где Fc-домен антитела представляет собой Fc-домен человеческого антитела изотипа IgG1.

48. Белок по п. 47, где Fc-домен антитела или его часть содержат аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:118.

49. Белок по п. 47 или п. 48, где по меньшей мере одна полипептидная цепь Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с SEQ ID NO:118 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 EU.

50. Белок по любому из пп. 47-49, где по меньшей мере одна полипептидная цепь Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с SEQ ID NO:118, 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 EU.

51. Белок по любому из пп. 47-50, где одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с SEQ ID NO:118 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 по сравнению с SEQ ID NO:118 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 EU.

52. Белок по п. 51, где одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены K360E и K409W по сравнению с SEQ ID NO:118; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены Q347R, D399V и F405T по сравнению с SEQ ID NO:118, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

53. Белок по п. 51 или п. 52, где одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену Y349C по сравнению с SEQ ID NO:118; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену S354C по сравнению с SEQ ID NO:118, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

54. Белок, содержащий

(a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:259 или SEQ ID NO:276;

(b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:260; и

(c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:261.

55. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп. 1-54 и фармацевтически приемлемый носитель.

56. Фармацевтический состав, содержащий белок по любому из пп. 1-54 и буфер с pH 7,0 или выше.

57. Фармацевтический состав по п. 56, где pH состава составляет от 7,0 до 8,0.

58. Фармацевтический состав по п. 56 или п. 57, где буфер содержит цитрат.

59. Фармацевтический состав по п. 58, где концентрация цитрата составляет 10-20 мМ.

60. Фармацевтический состав по любому из пп. 56-59, где буфер дополнительно содержит фосфат.

61. Фармацевтический состав по любому из пп. 56-59, дополнительно содержащий сахар или сахарный спирт.

62. Фармацевтический состав по п. 61, где сахар или сахарный спирт представлены дисахаридом.

63. Фармацевтический состав по п. 62, где дисахарид представляет собой сахарозу.

64. Фармацевтический состав по любому из пп. 61-63, где концентрация сахара или сахарного спирта в фармацевтическом составе составляет 200-300 мМ.

65. Фармацевтический состав по п. 64, где концентрация сахара или сахарного спирта в фармацевтическом составе составляет приблизительно 250 мМ.

66. Фармацевтический состав по любому из пп. 56-65, дополнительно содержащий неионогенное поверхностно-активное вещество.

67. Фармацевтический состав по п. 66, где неионогенное поверхностно-активное вещество предусматривает полисорбат.

68. Фармацевтический состав по п. 67, где полисорбат представляет собой полисорбат 80.

69. Фармацевтический состав по п. 68, где концентрация полисорбата 80 в фармацевтическом составе составляет от 0,005% до 0,05%.

70. Фармацевтический состав по п. 69, где концентрация полисорбата 80 в фармацевтическом составе составляет приблизительно 0,01%.

71. Фармацевтический состав по любому из пп. 56-70, где концентрация NaCl, если таковой присутствует, в фармацевтическом составе составляет приблизительно 1 мМ или ниже.

72. Фармацевтический состав по любому из пп. 56-71, где концентрация белка составляет 10-200 мг/мл.

73. Фармацевтический состав по п. 72, где концентрация белка составляет приблизительно 20 мг/мл.

74. Фармацевтический состав по любому из пп. 56-59 и пп. 61-73, содержащий приблизительно 20 мМ цитрата, приблизительно 250 мМ сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80 при pH 7,0.

75. Фармацевтический состав по любому из пп. 56-60 и пп. 72-73, содержащий белок в концентрации приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 20 мМ фосфата калия, приблизительно 10 мМ цитрата натрия и приблизительно 125 мМ хлорида натрия при pH 7,8.

76. Клетка, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих белок по любому из пп. 1-54.

77. Способ усиления гибели опухолевых клеток, при этом способ включает подвергание опухолевой клетки и естественной киллерной клетки воздействию эффективного количества белка по любому из пп. 1-54, фармацевтической композиции по п. 55 или фармацевтического состава по любому из пп. 56-75.

78. Способ лечения рака, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества белка по любому из пп. 1-54, фармацевтической композиции по п. 55 или фармацевтического состава по любому из пп. 56-75.

79. Способ по п. 78, где рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование.

80. Способ по п. 79, где гематологическое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластического синдрома (MDS), острого лимфобластного лейкоза (ALL), миелопролиферативных новообразований (MPN), лимфомы, видов неходжкинской лимфомы и классической лимфомы Ходжкина.

81. Способ по п. 80, где AML выбран из недифференцированного острого миелобластного лейкоза, острого миелобластного лейкоза с минимальным созреванием, острого миелобластного лейкоза с созреванием, острого промиелоцитарного лейкоза (APL), острого миеломоноцитарного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза с эозинофилией, острого моноцитарного лейкоза, острого эритроидного лейкоза, острого мегакариобластного лейкоза (AMKL), острого базофильного лейкоза, острого панмиелоза с фиброзом и новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (BPDCN).

82. Способ по п. 80 или п. 81, где AML характеризуется экспрессией CLL-1 на лейкозных стволовых клетках (LSC) AML.

83. Способ по п. 82, где LSC дополнительно экспрессируют мембранный маркер, выбранный из CD34, CD38, CD123, TIM3, CD25, CD32 и CD96.

84. Способ по любому из пп. 80-83, где AML представлен минимальной остаточной болезнью (MRD).

85. Способ по п. 84, где MRD характеризуется наличием или отсутствием мутации, выбранной из мутации *FLT3-ITD* (внутренних тандемных дупликаций (ITD) в гене (Fms-подобной тирозинкиназы 3)), *NPM1* (нуклеофосмина 1), *DNMT3A* (гена ДНК-метилтрансферазы *DNMT3A)* и *IDH* (изоцитратдегидрогеназы 1 и 2 (IDH1 и IDH2)).

86. Способ по п. 80, где MDS выбран из MDS с мультилинейной дисплазией (MDS-MLD), MDS с однолинейной дисплазией (MDS-SLD), MDS с кольцевыми сидеробластами (MDS-RS), MDS с избытком бластов (MDS-EB), MDS с изолированной del(5q) и неклассифицированного MDS (MDS-U).

87. Способ по п. 80, где MDS представляет собой первичный MDS или вторичный MDS.

88. Способ по п. 80, где ALL выбран из B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ALL) и T-клеточного острого лимфобластного лейкоза (T-ALL).

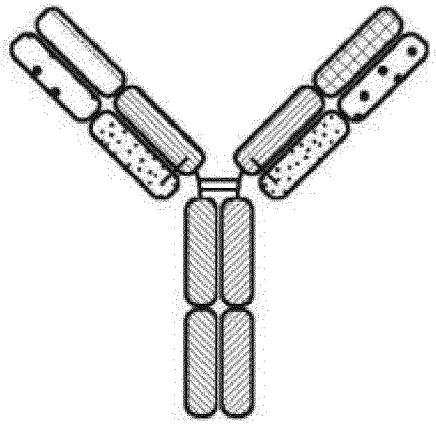
89. Способ по п. 80, где MPN выбрано из истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии (ET) и миелофиброза.

90. Способ по п. 80, где неходжкинская лимфома выбрана из B-клеточной лимфомы и T-клеточной лимфомы.

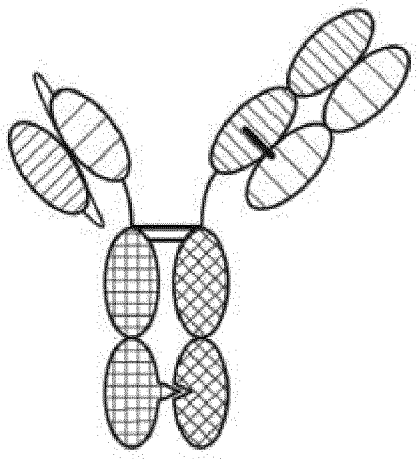
91. Способ по п. 80, где лимфома выбрана из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), лимфобластной лимфомы (LPL), диффузной B-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Беркитта (BL), первичной медиастинальной B-крупноклеточной лимфомы (PMBL), фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, волосатоклеточного лейкоза, плазмоклеточной миеломы (PCM) или множественной миеломы (MM), новообразований из зрелых T-/NK-клеток и гистиоцитарных новообразований.

92. Способ по любому из пп. 78-91, где рак характеризуется экспрессией CLEC12A.

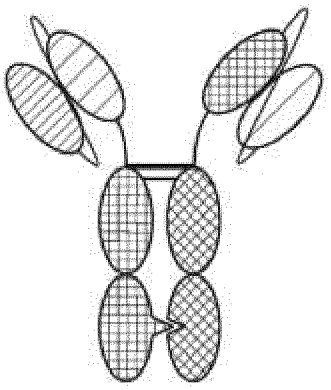
ФИГ. 1



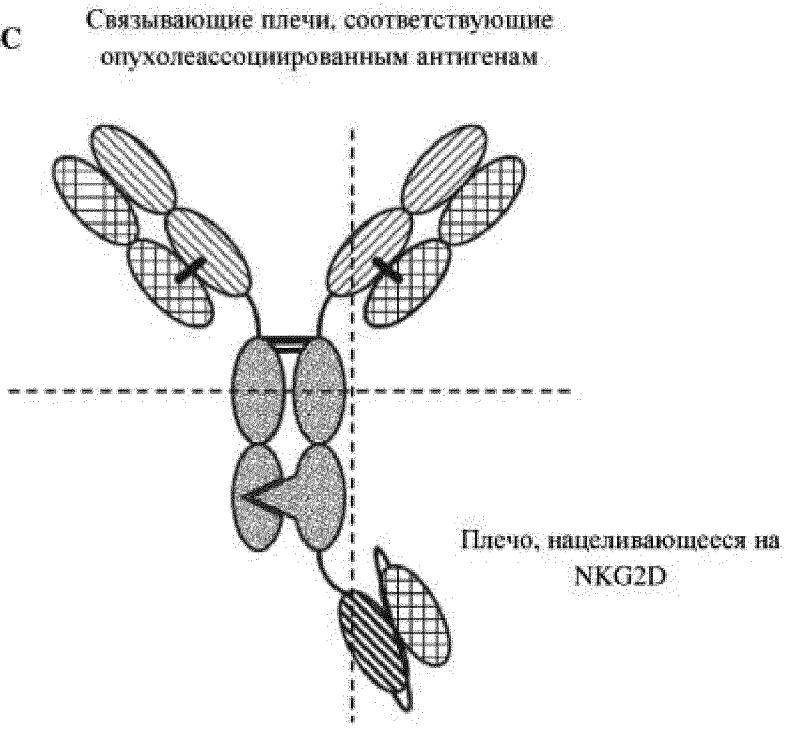
ФИГ. 2A



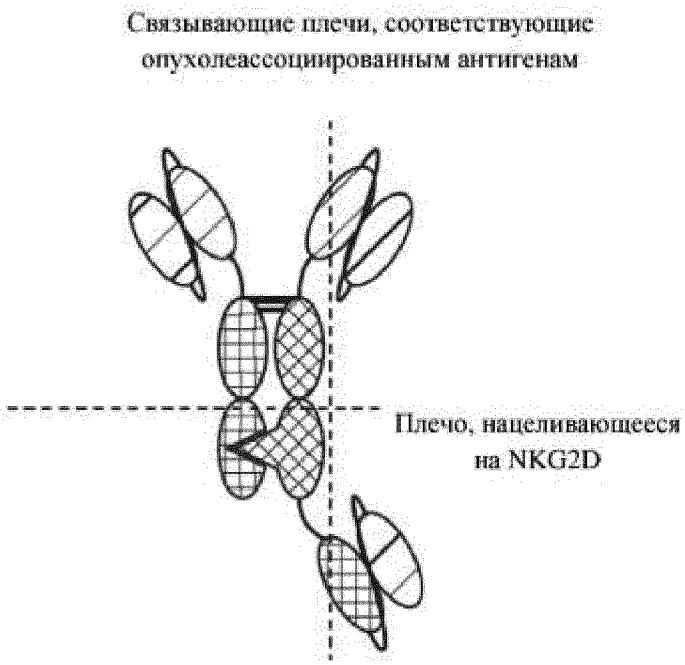
ФИГ. 2B



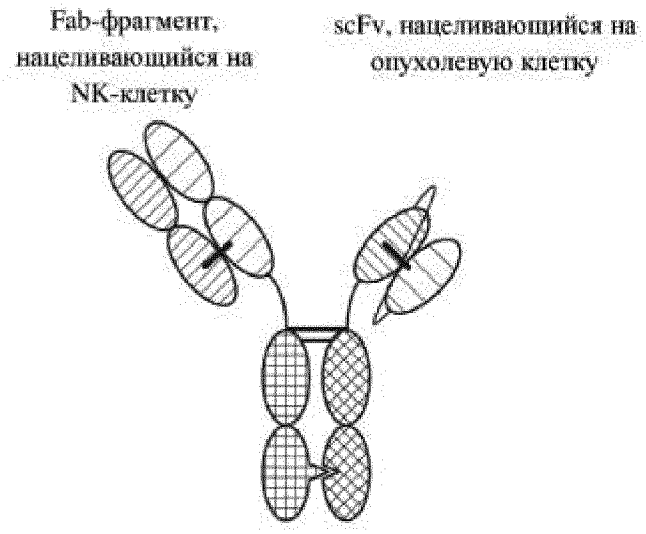
ФИГ. 2C


Связывающие плечи, соответствующие опухолеассоциированным антигенам
Плечо, нацеливающееся на NKG2D

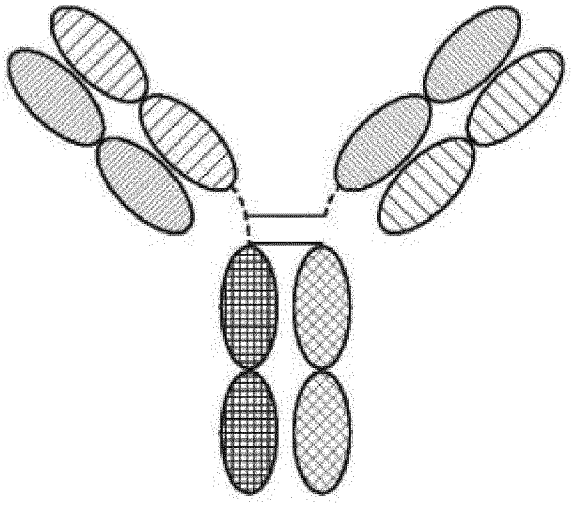
ФИГ. 2D


Связывающие плечи, соответствующие опухолеассоциированным антигенам
Плечо, нацеливающееся на NKG2D

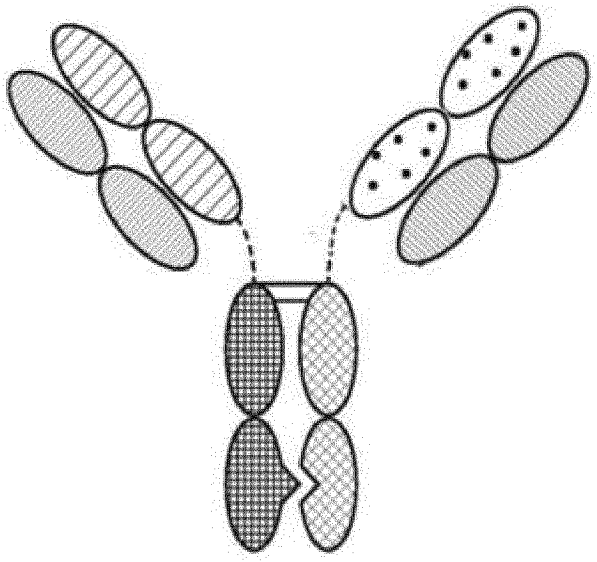
ФИГ. 2E


Fab-фрагмент, нацеливающийся на NK-клетку
scFv, нацеливающийся на опухолевую клетку

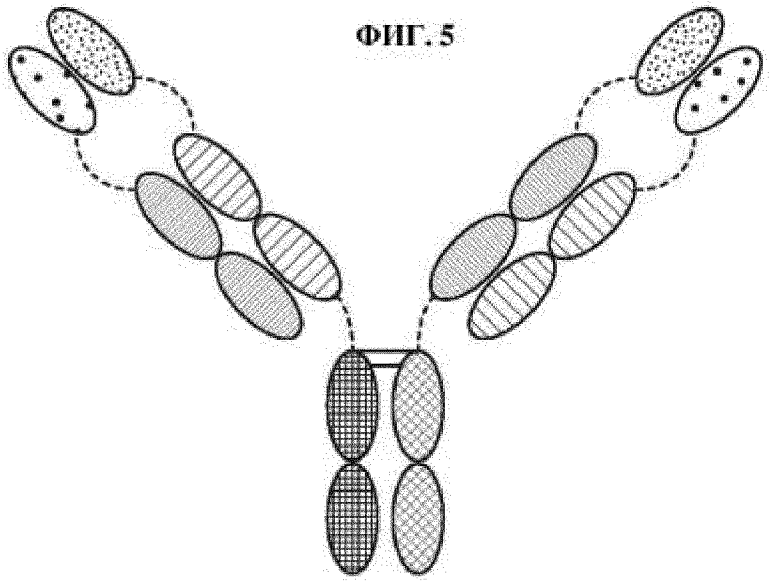
ФИГ. 3



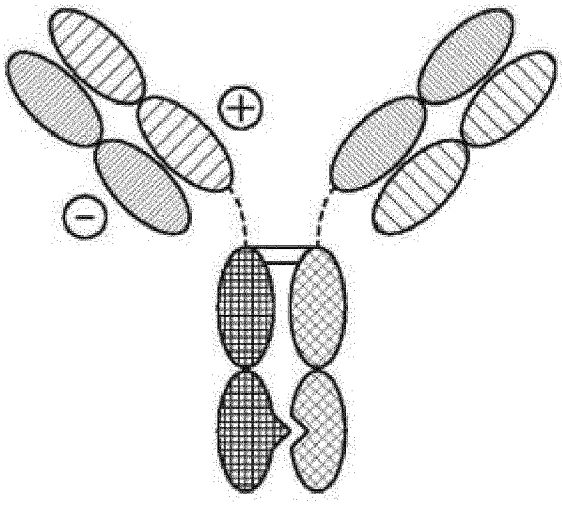
ФИГ. 4



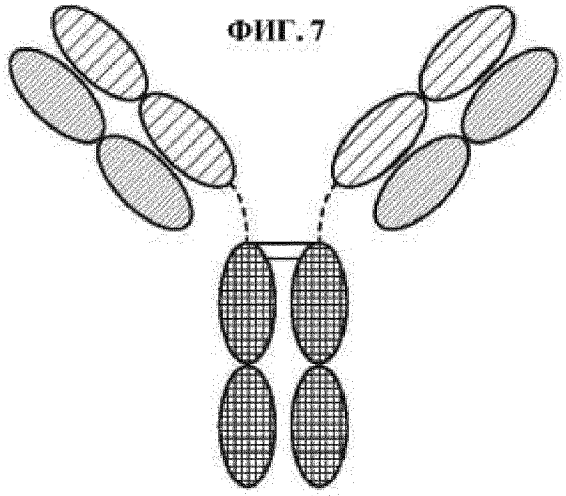
ФИГ. 5



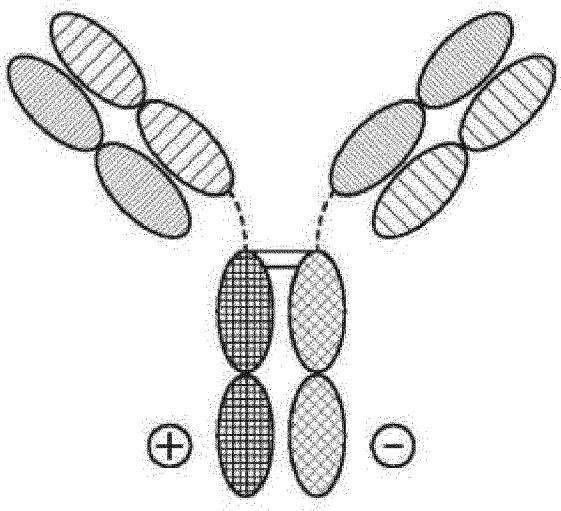
ФИГ. 6



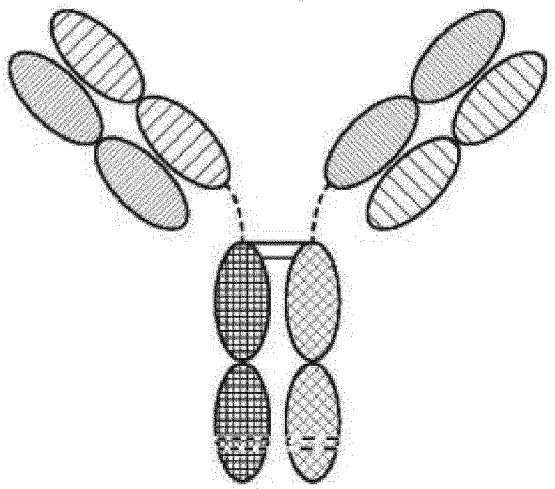
ФИГ. 7



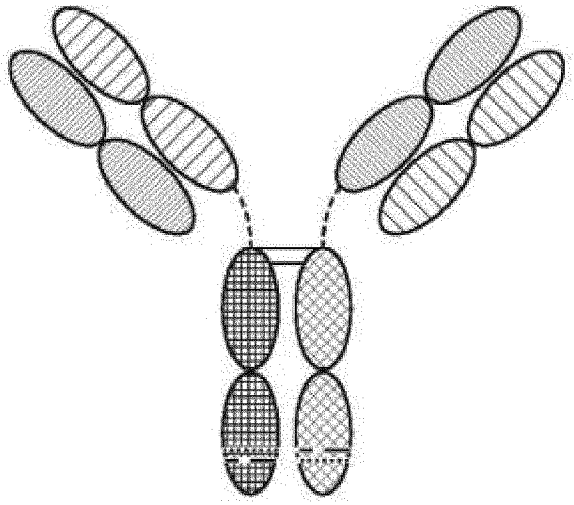
ФИГ. 8



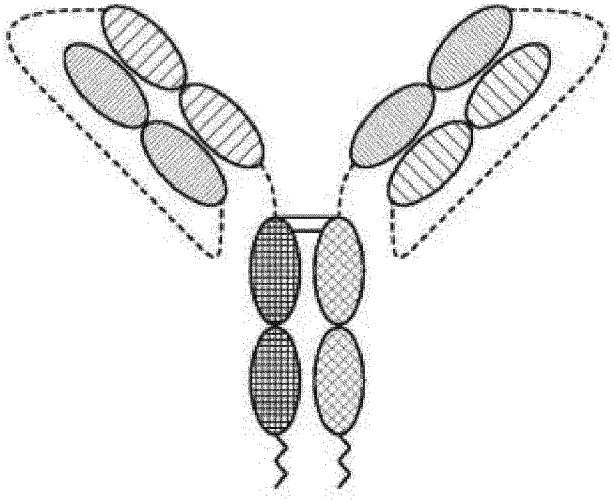
ФИГ. 9



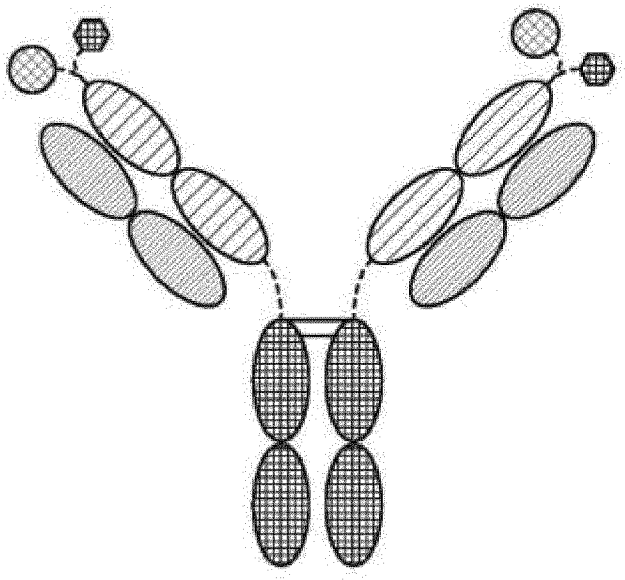
ФИГ. 10



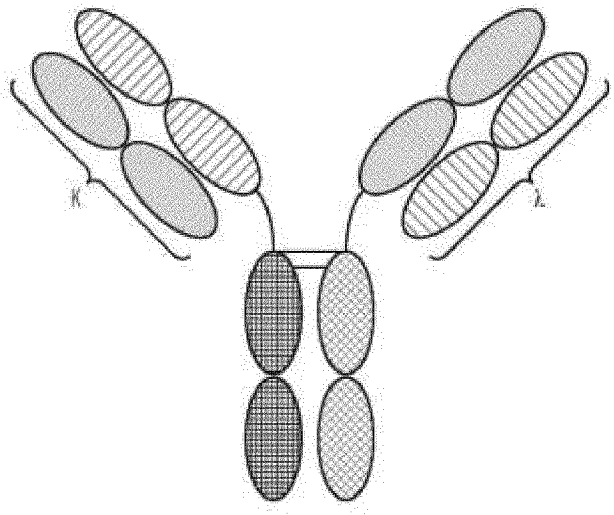
ФИГ. 11



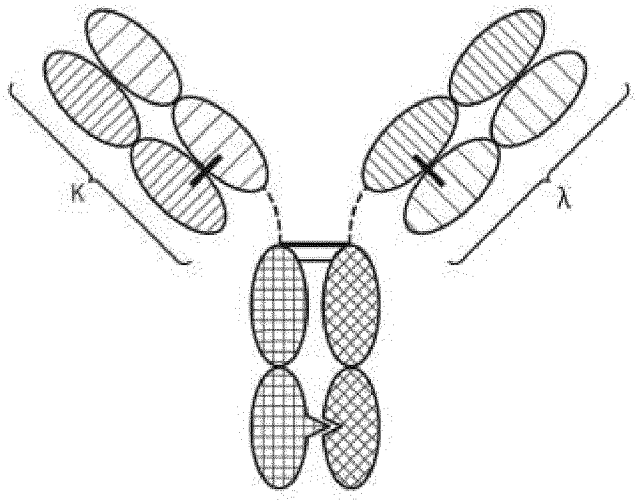
ФИГ. 12



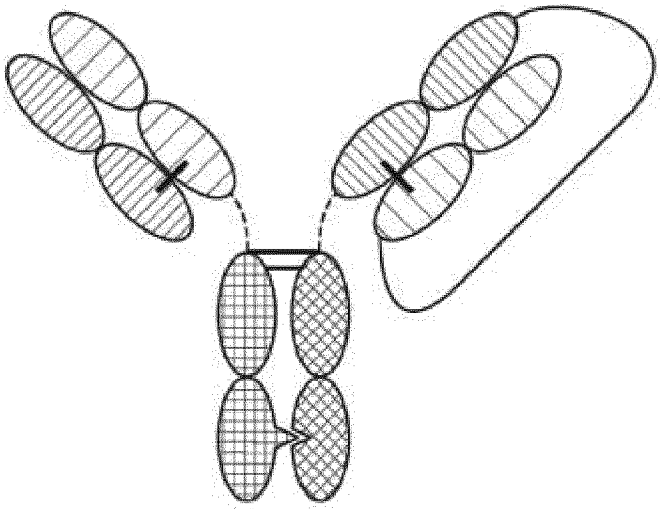
ФИГ. 13A



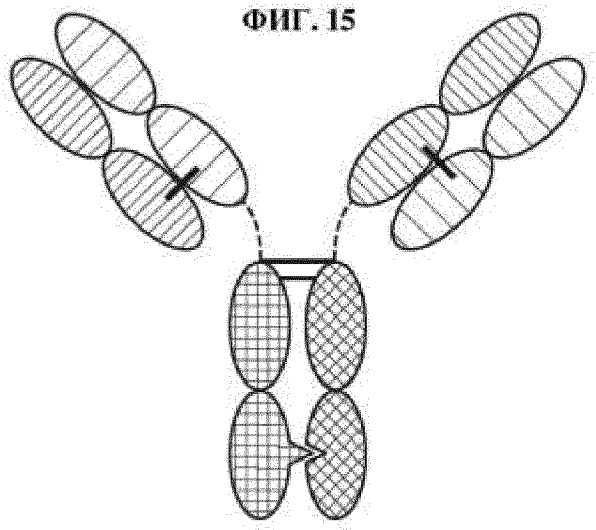

ФИГ. 13B



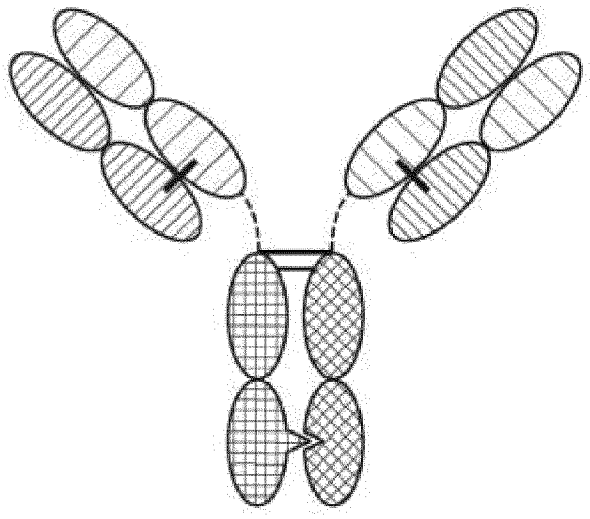
ФИГ. 14



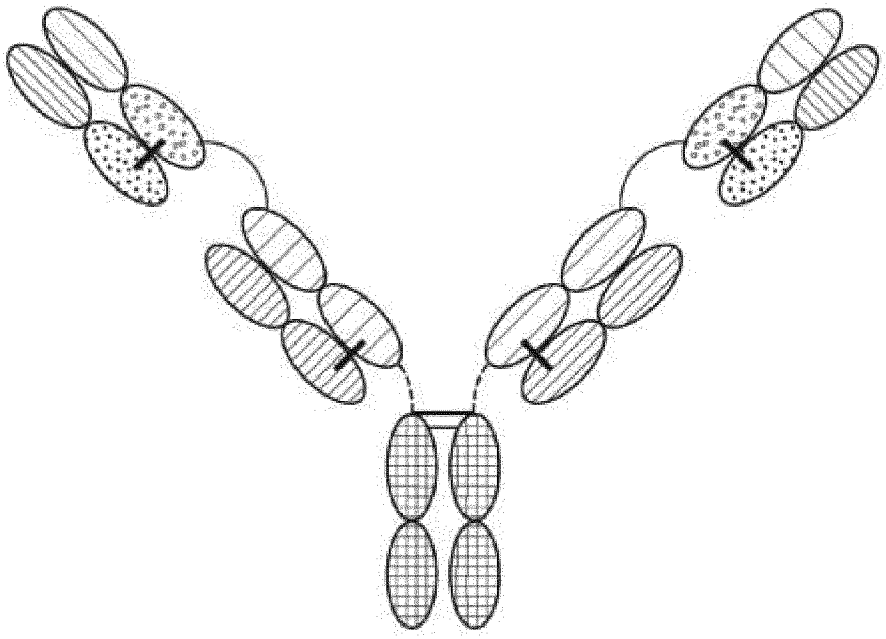
ФИГ. 15

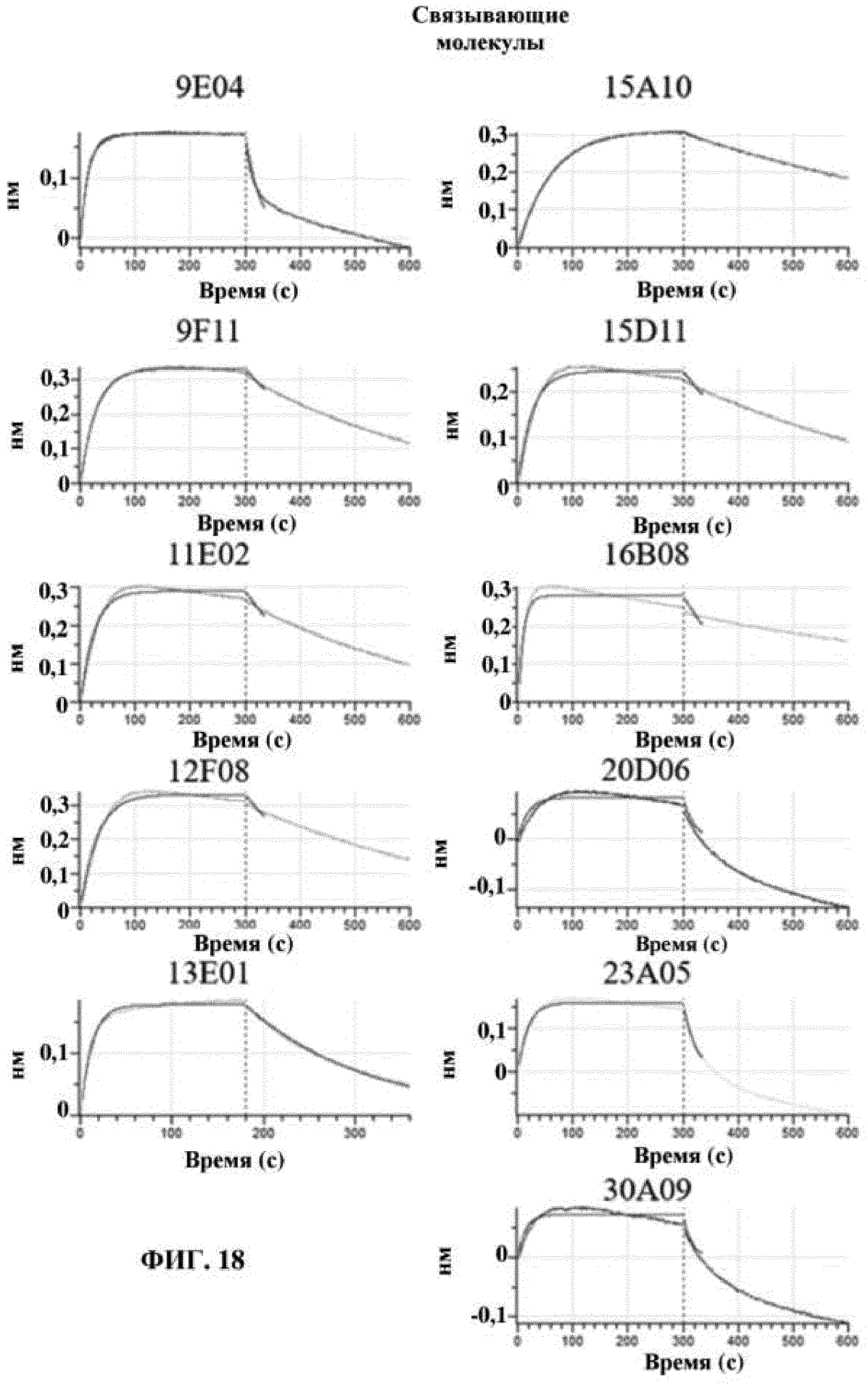


ФИГ. 16

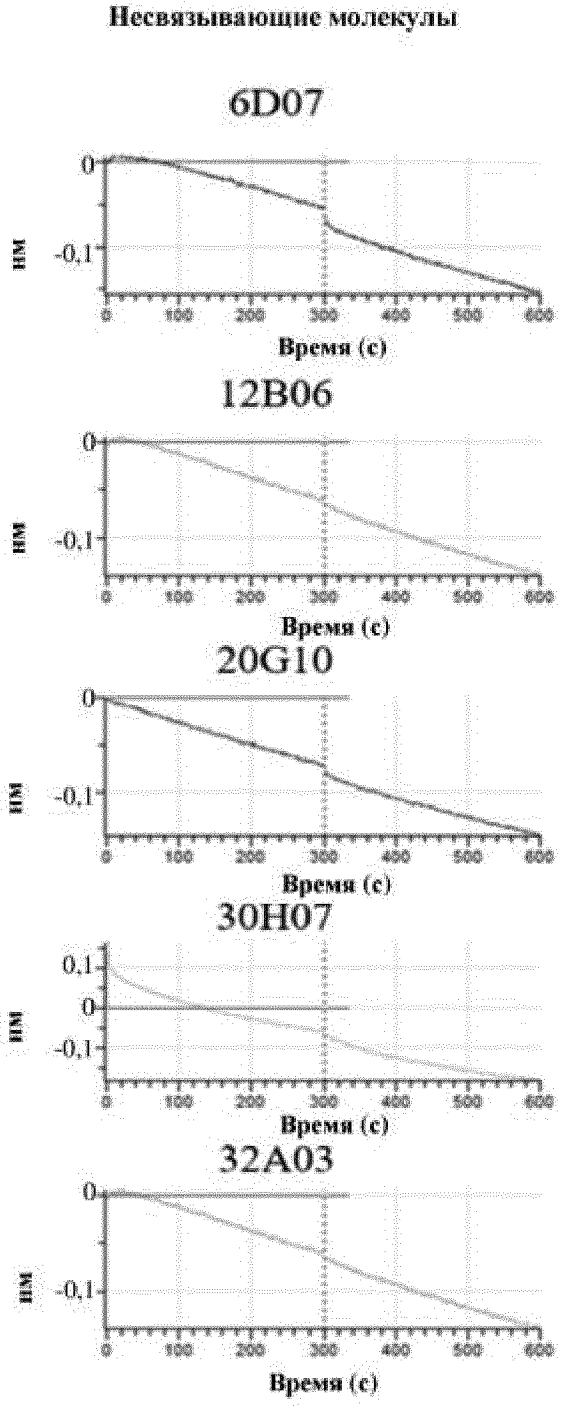


ФИГ. 17

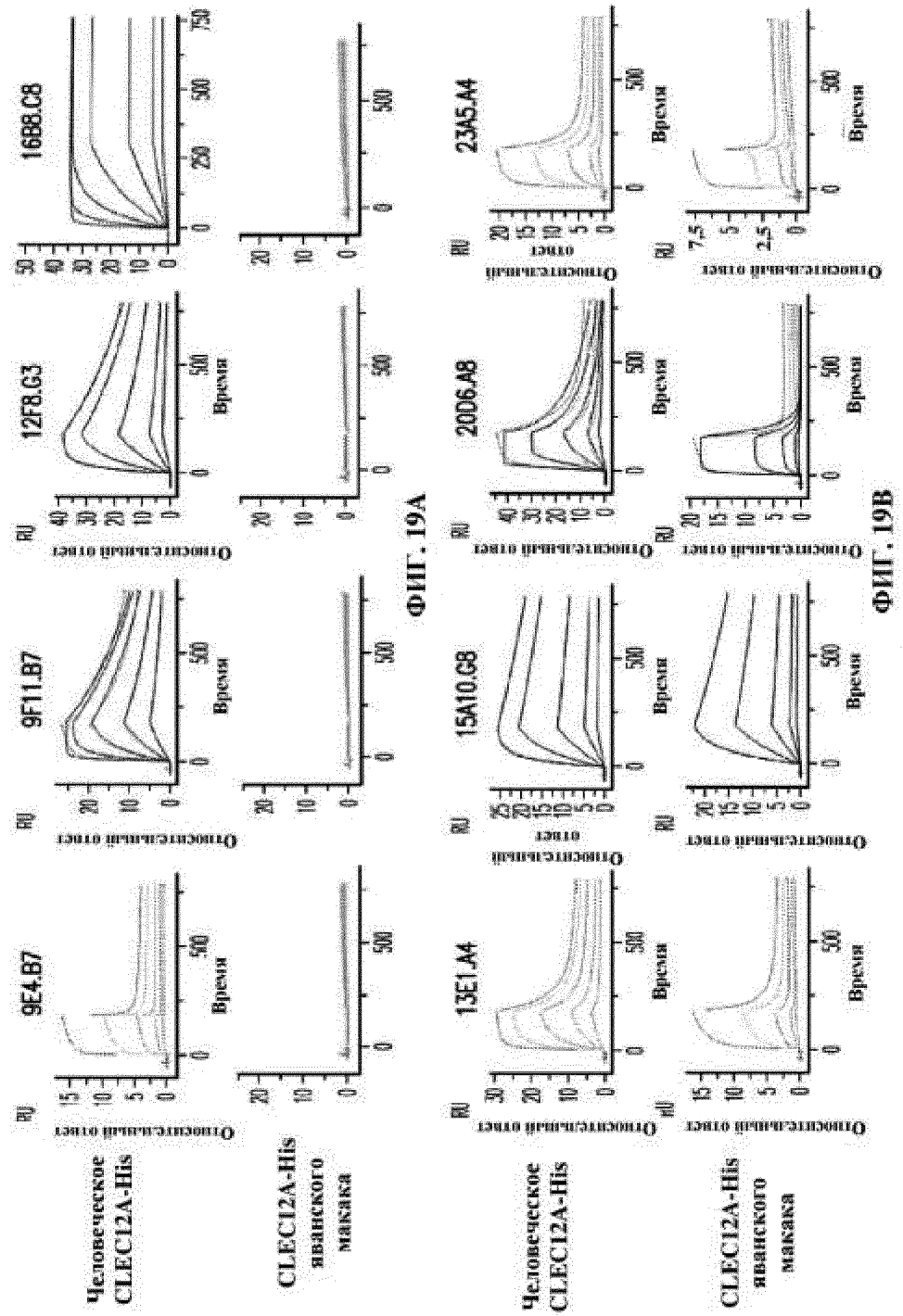



Связывающие молекулы
9E04
15A10
9F11
15D11
11E02
16B08
12F08
20D06
13E01
23A05
30A09
нм
Время (с)

ФИГ. 18



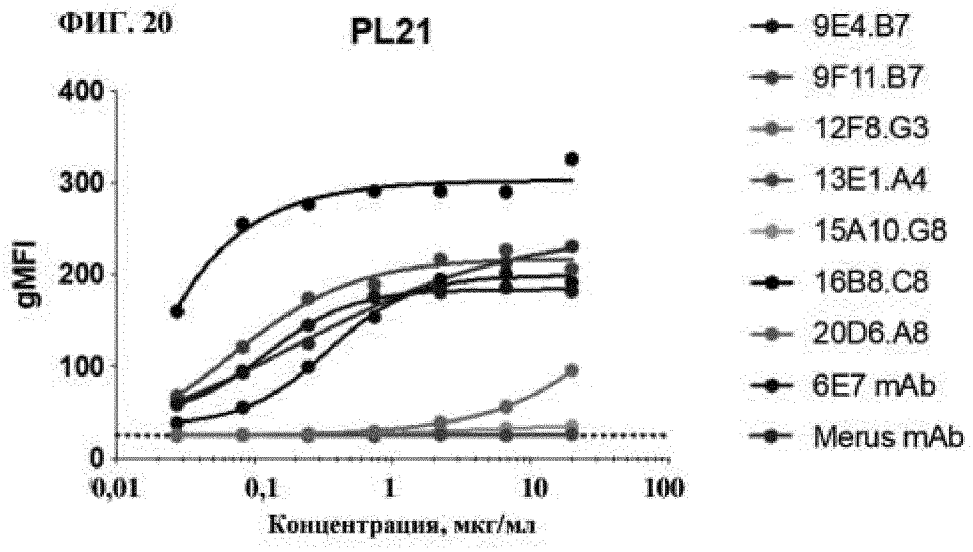

**ФИГ. 18 продолжение**

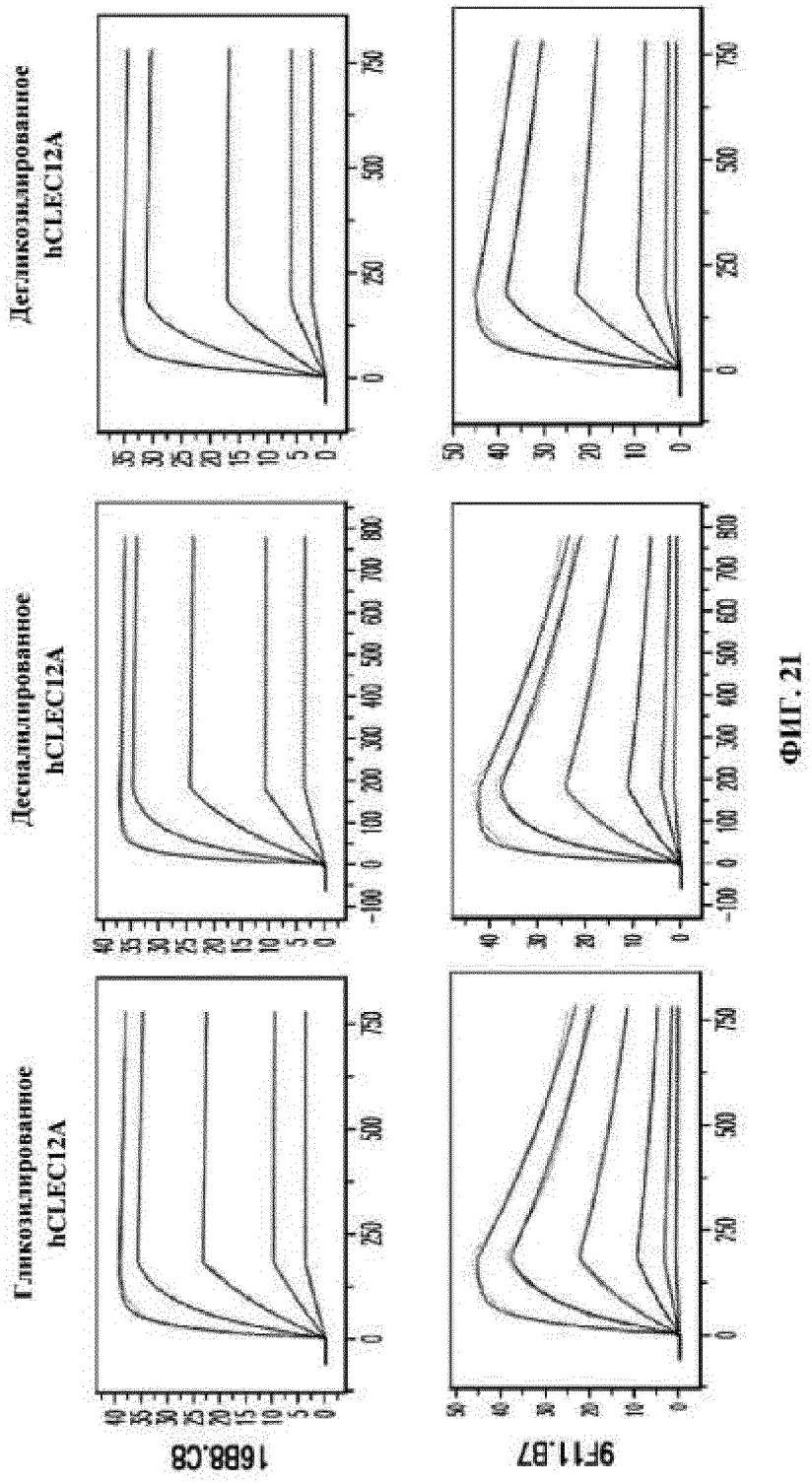



ФИГ. 19A

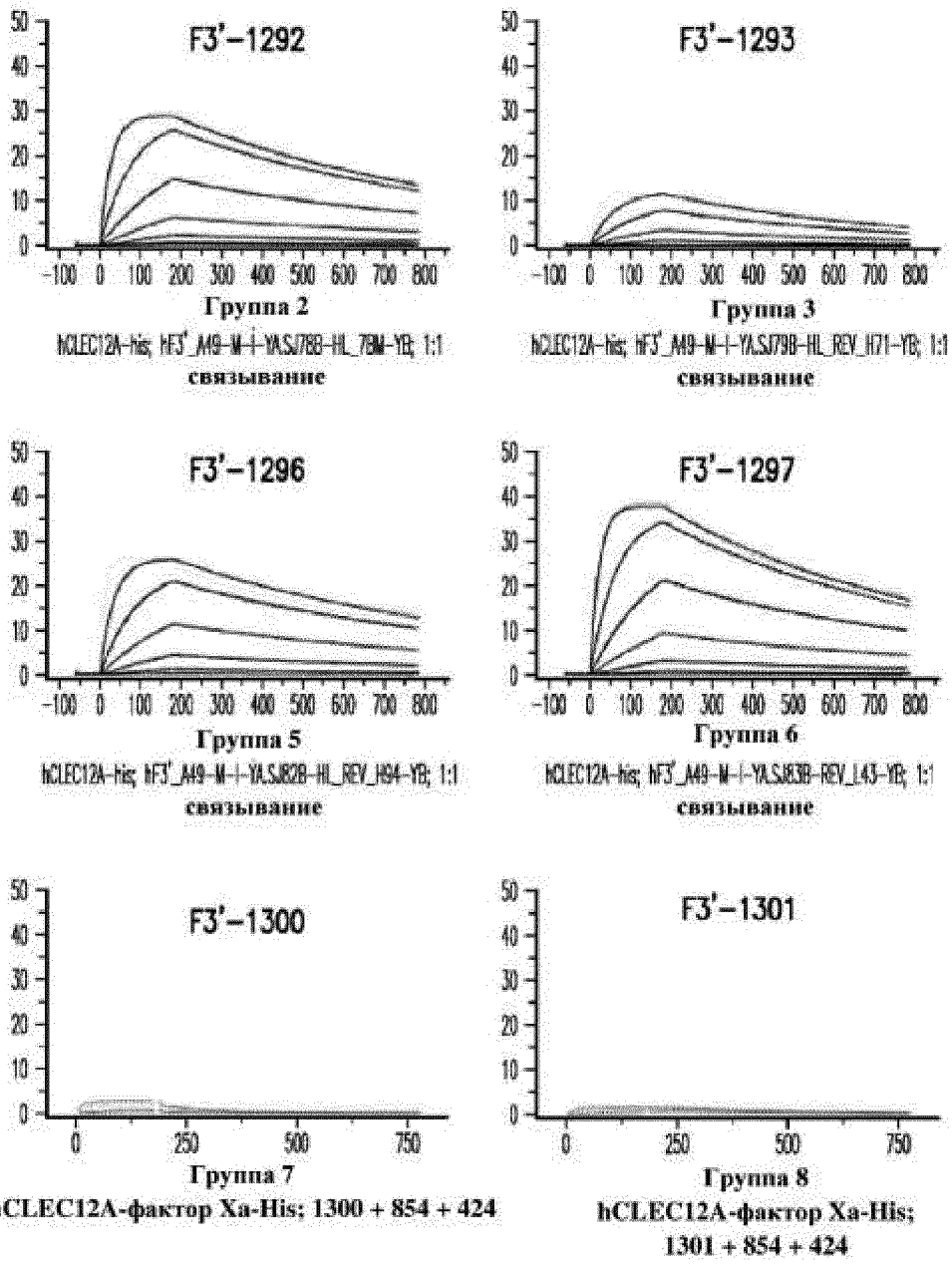
ФИГ. 19B

ФИГ. 20


PL21
gMFI
400
300
200
100
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, мкг/мл
9E4.B7
9F11.B7
12F8.G3
13E1.A4
15A10.G8
16B8.C8
20D6.A8
6E7 mAb
Merus mAb


Дегликозилированное hCLEC12A
Десиалилированное hCLEC12A
Гликозилированное hCLEC12A
16B8.C8
9F11.B7

ФИГ. 21




Группа 2
hCLEC12A-his; hF3'_A49-M-I-YA.SJ78B-HL_78M-YB; 1:1
связывание

Группа 3
hCLEC12A-his; hF3'_A49-M-I-YA.SJ79B-HL_REV_H71-YB; 1:1
связывание

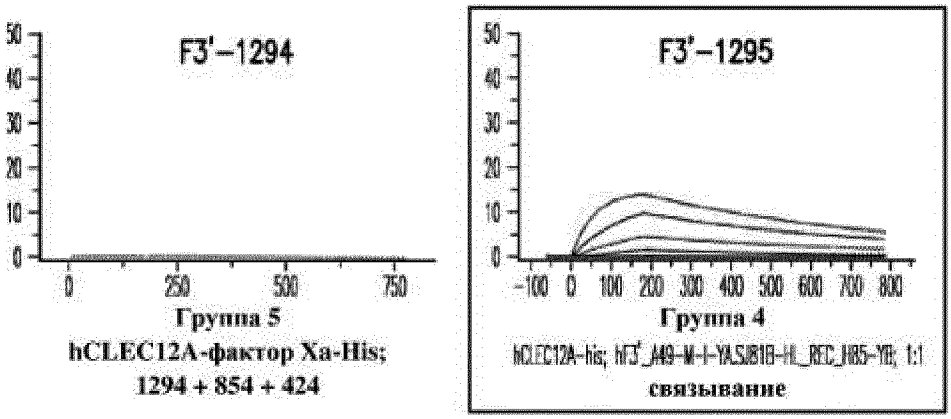
Группа 5
hCLEC12A-his; hF3'_A49-M-I-YA.SJ82B-HL_REV_H94-YB; 1:1
связывание

Группа 6
hCLEC12A-his; hF3'_A49-M-I-YA.SJ83B-REV_L43-YB; 1:1
связывание

Группа 7
hCLEC12A-фактор Xa-His; 1300 + 854 + 424

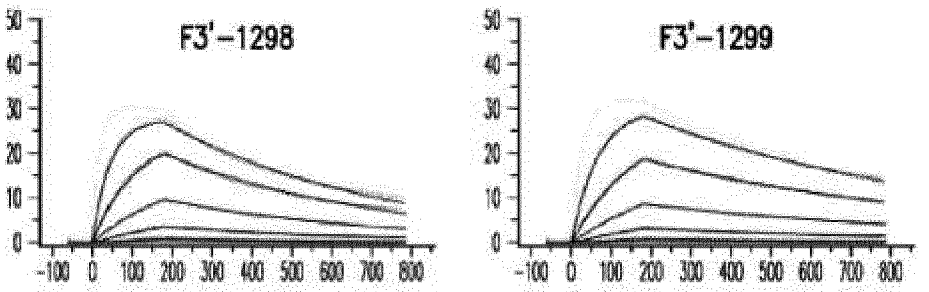
Группа 8
hCLEC12A-фактор Xa-His;
1301 + 854 + 424

ФИГ. 22



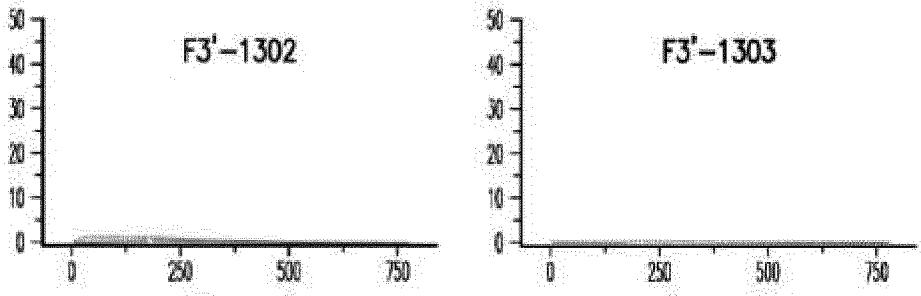

Группа 5
hCLEC12A-фактор Xa-His;
1294 + 854 + 424

Группа 4
hCLEC12A-his; hF3'_M49-M-I-YA.SJB1B-HL_REV_H85-YB; 1:1
связывание




Группа 7
hCLEC12A-his; hF3'_M49-M-I-YA.SJB49-HL_REV_L70-YB; 1:1
связывание

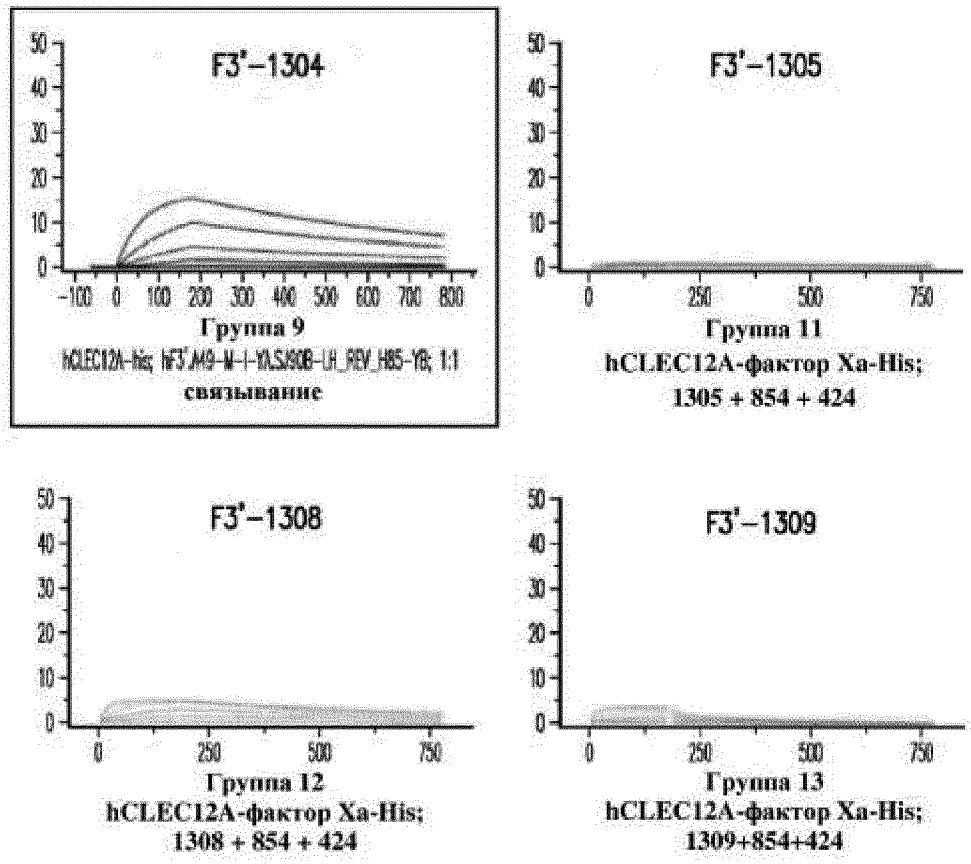
Группа 8
hCLEC12A-his; hF3'_M49-M-I-YA.SJB5B-HL_REV_H83-YB; 1:1
связывание




Группа 9
hCLEC12A-фактор Xa-His;
1302 + 854 + 424

Группа 10
hCLEC12A-фактор Xa-His;
1303 + 854 + 424

ФИГ. 22 продолжение



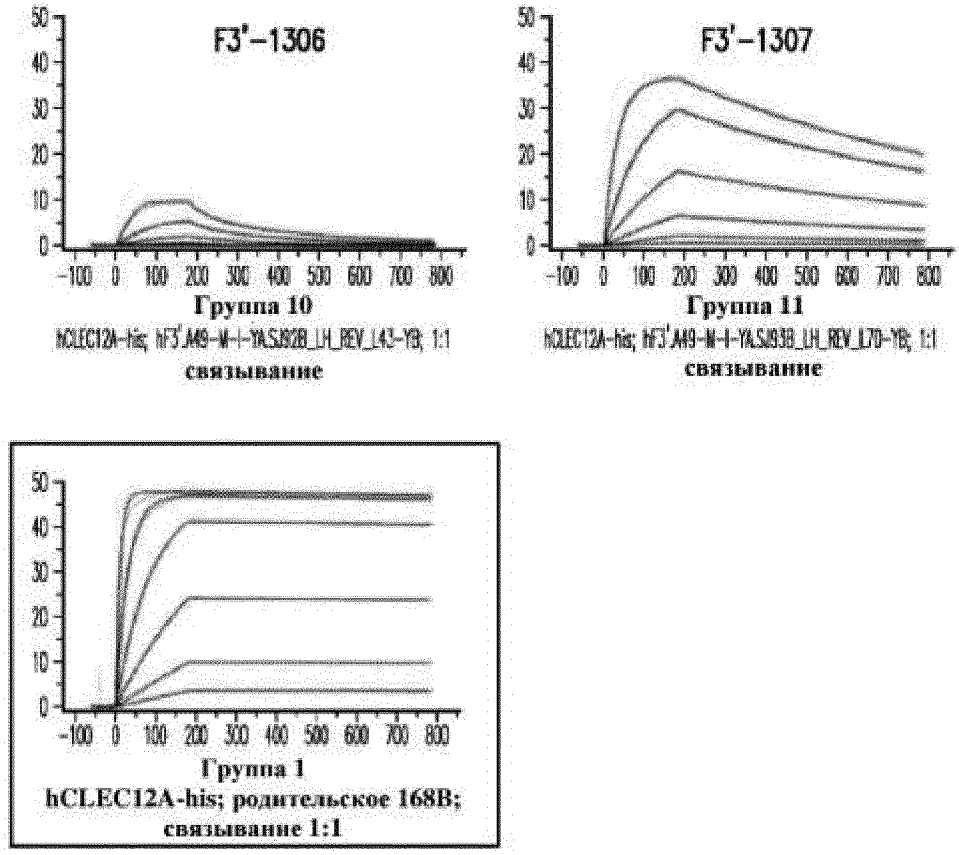

Группа 9
hCLEC12A-his; hF3'.M9-M-I-YA.S.860B-LH_REV_H65-YB; 1:1
связывание

Группа 11
hCLEC12A-фактор Xa-His;
1305 + 854 + 424

Группа 12
hCLEC12A-фактор Xa-His;
1308 + 854 + 424

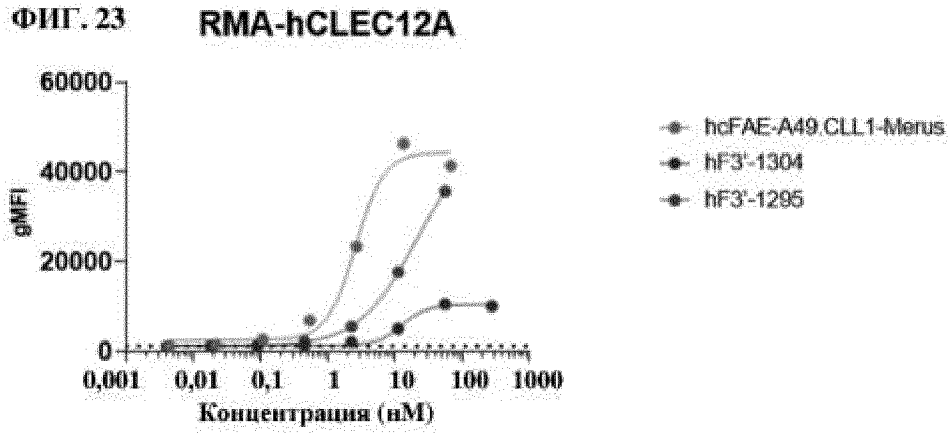
Группа 13
hCLEC12A-фактор Xa-His;
1309+854+424

ФИГ. 22 продолжение

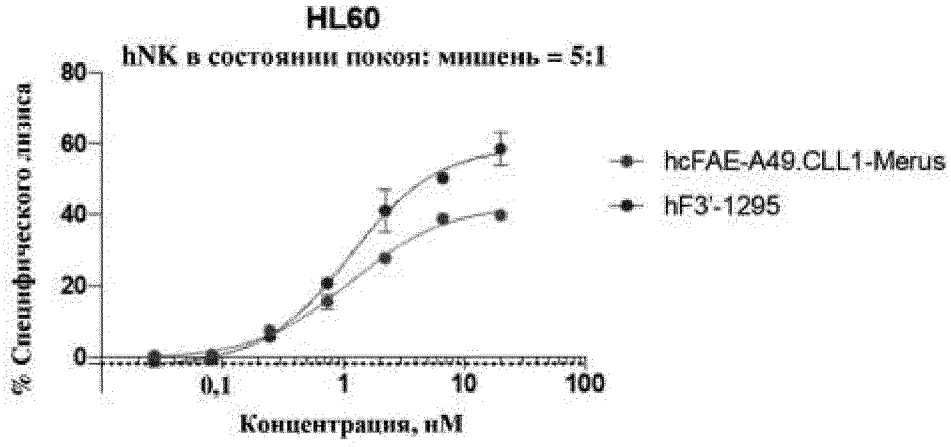


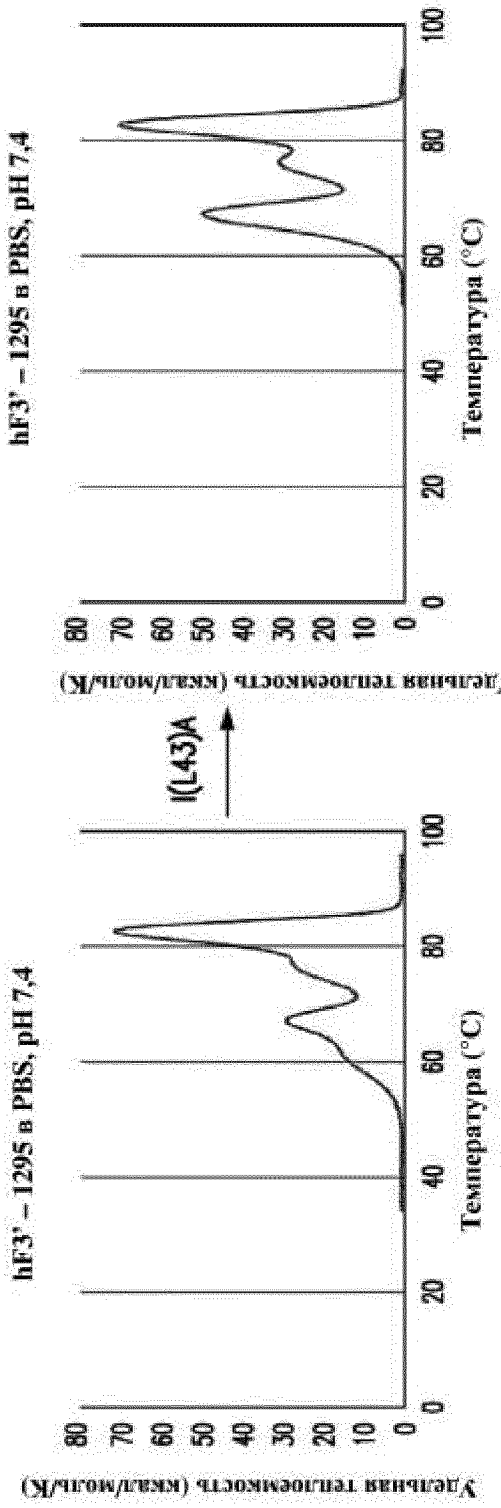

**ФИГ. 22 продолжение**

ФИГ. 23

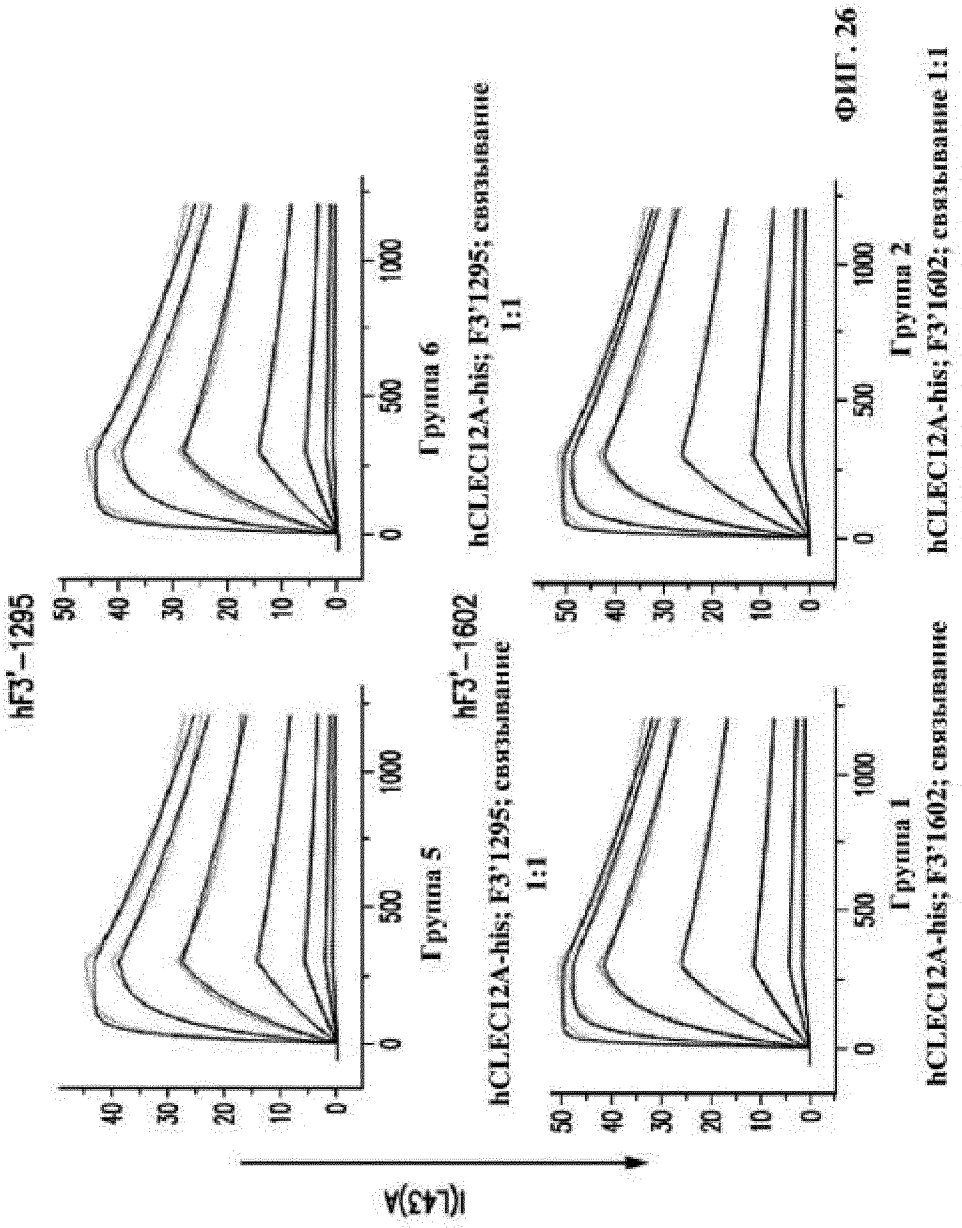

RMA-hCLEC12A
60000
40000
20000
0
gMFI
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Концентрация (нМ)
hcFAE-A49.CLL1-Merus
hF3'-1304
hF3'-1295

ФИГ. 24

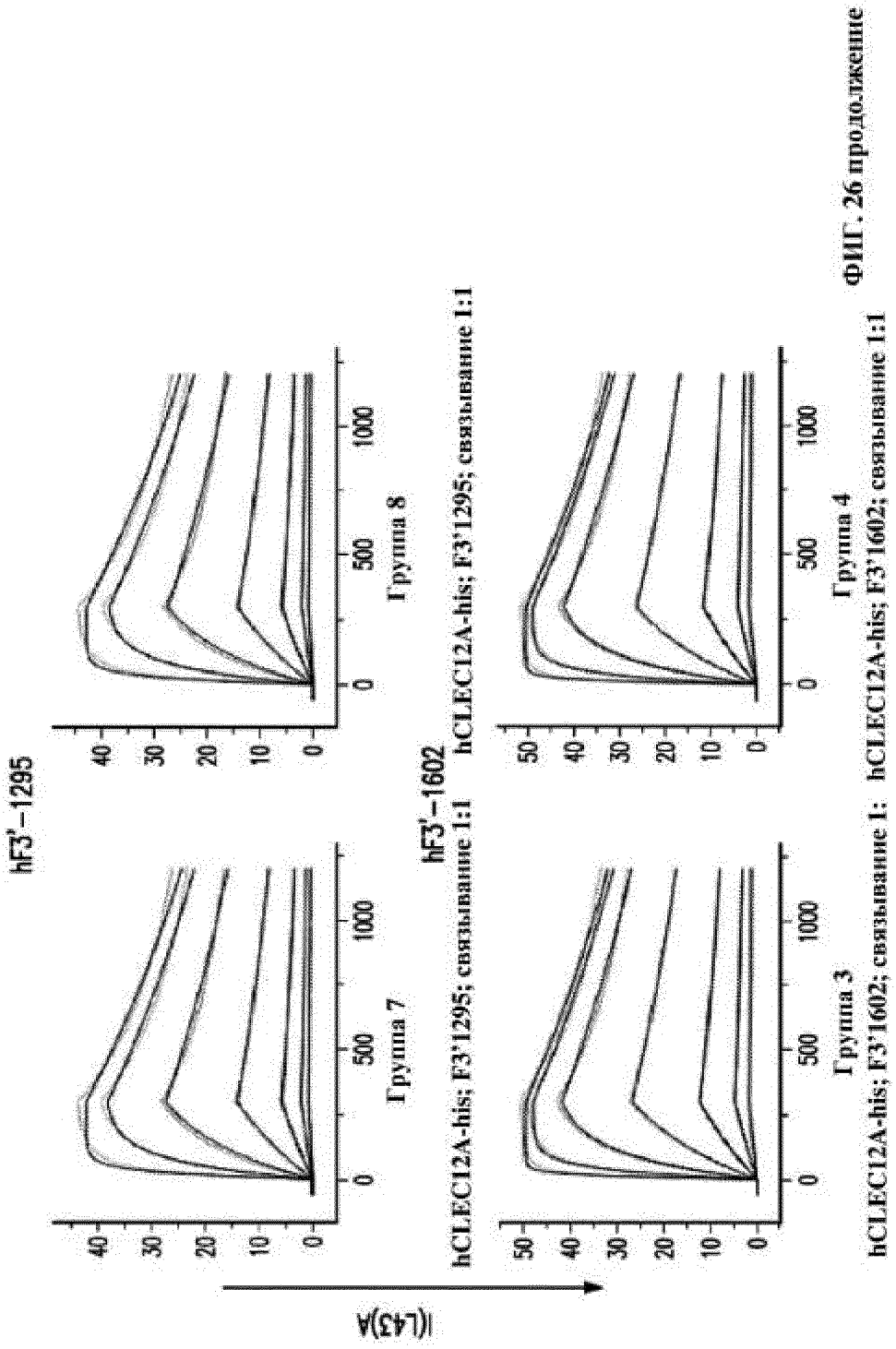

HL60
hNK в состоянии покоя: мишень = 5:1
% Специфического лизиса
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
hcFAE-A49.CLL1-Merus
hF3'-1295


hF3' – 1295 в PBS, pH 7,4
Удельная теплоемкость (ккал/моль/К)
Температура (°C)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
20
40
60
80
100
I(L43)A
hF3' – 1295 в PBS, pH 7,4
Удельная теплоемкость (ккал/моль/К)
Температура (°C)

ФИГ. 25

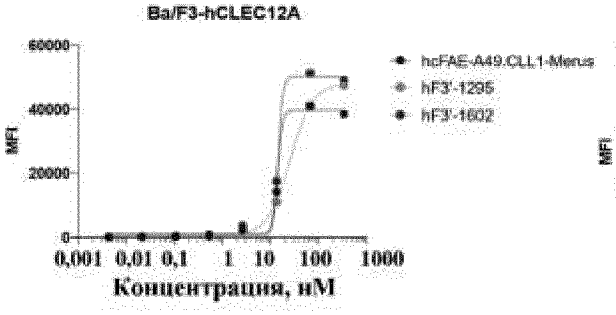

hF3'–1295
hF3'–1602
Группа 5
Группа 6
Группа 1
Группа 2
hCLEC12A-his; F3'1295; связывание 1:1
hCLEC12A-his; F3'1602; связывание 1:1
I(L43)A
0
10
20
30
40
50
500
1000

ФИГ. 26

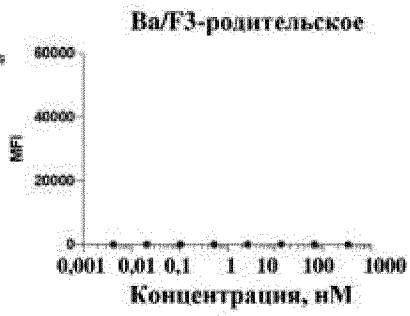



ФИГ. 26 продолжение

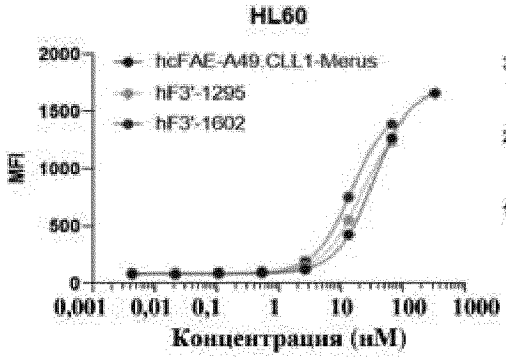
ФИГ. 27A



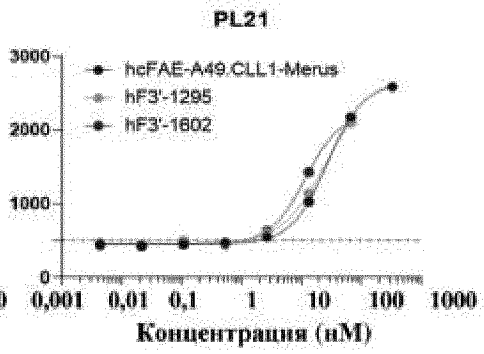

ФИГ. 27B



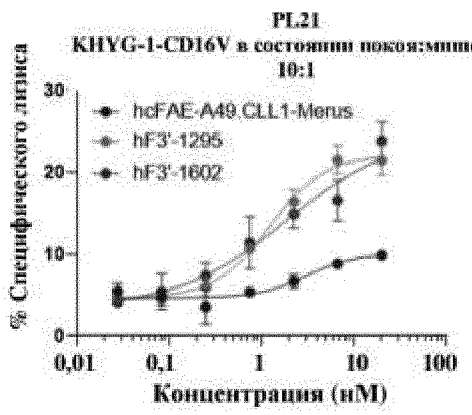

ФИГ. 27C



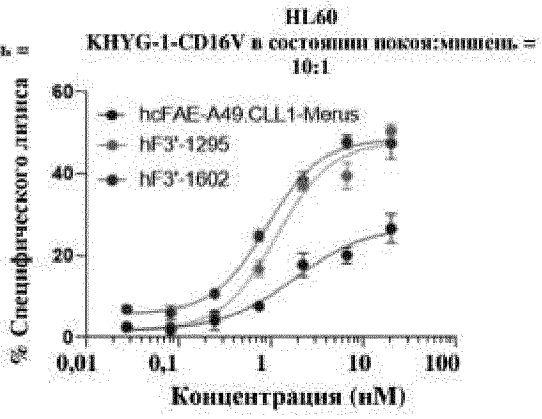

ФИГ. 27D

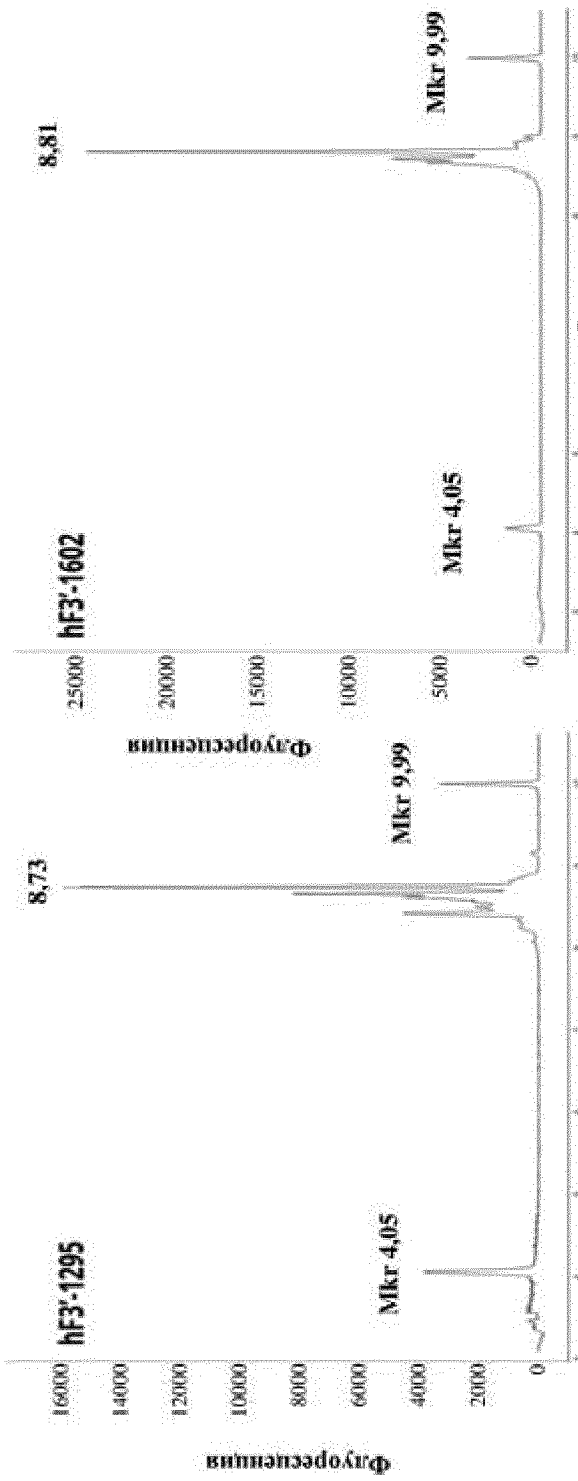


ФИГ. 28A



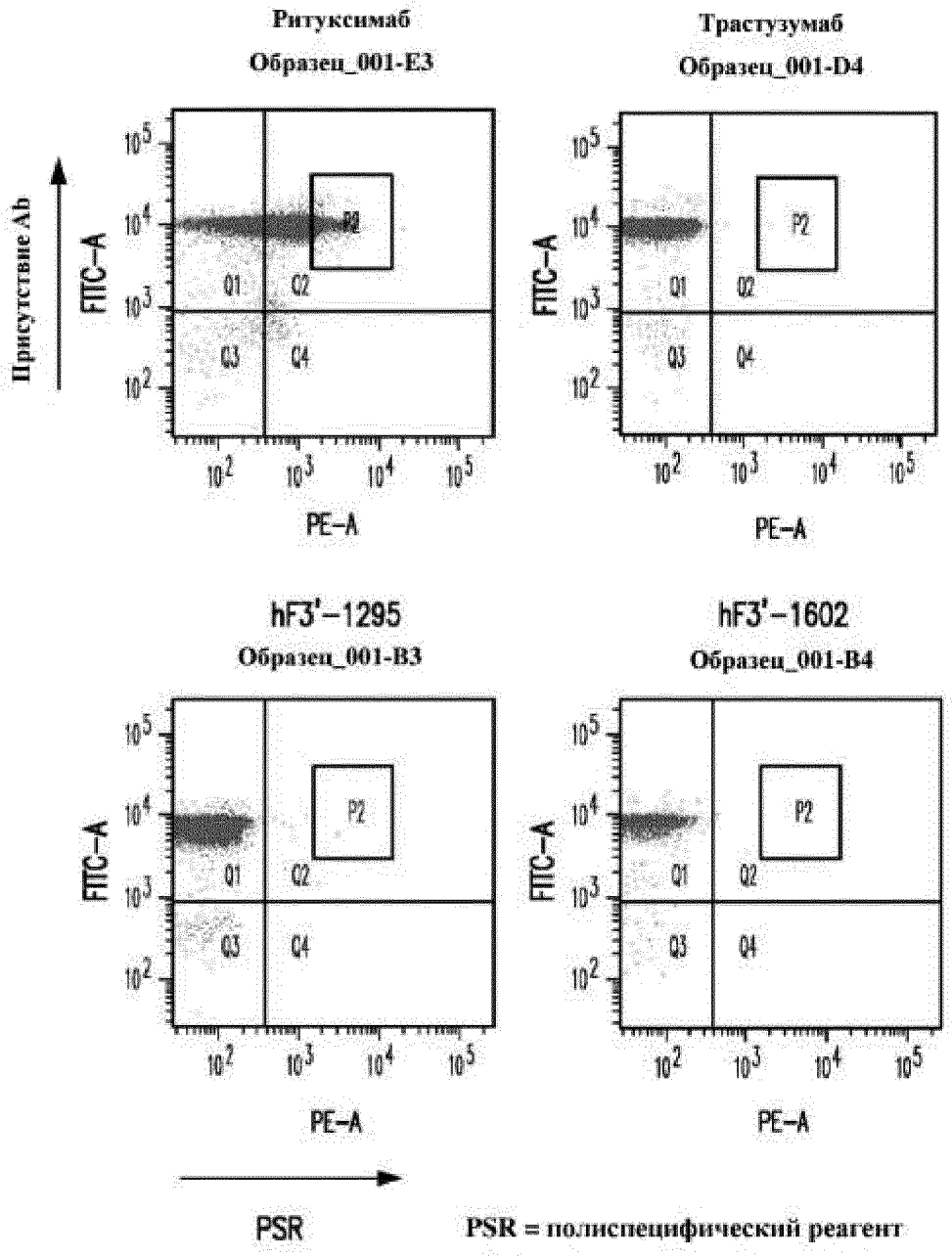

ФИГ. 28B






ФИГ. 29A

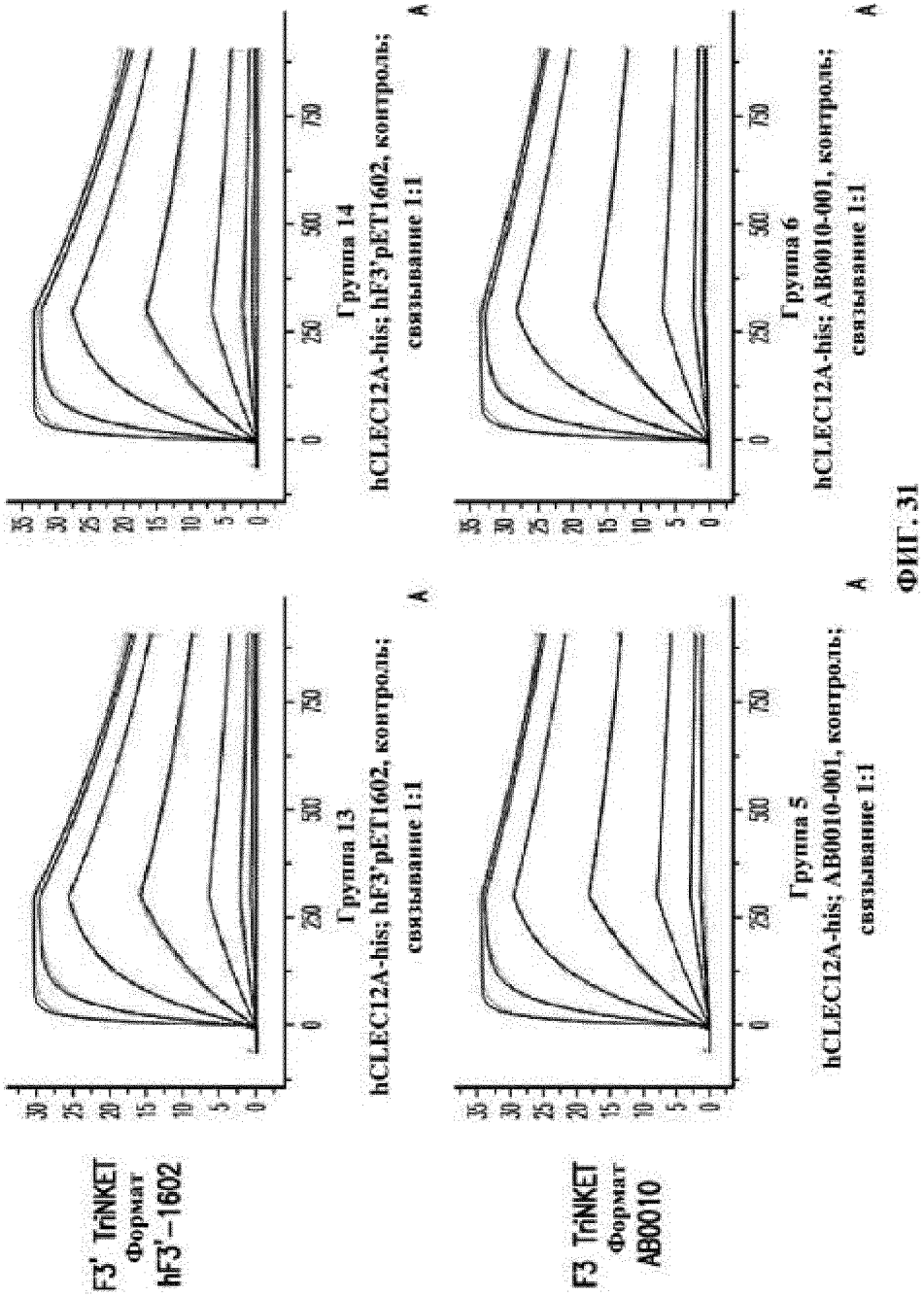
ФИГ. 29B




PSR = полиспецифический реагент

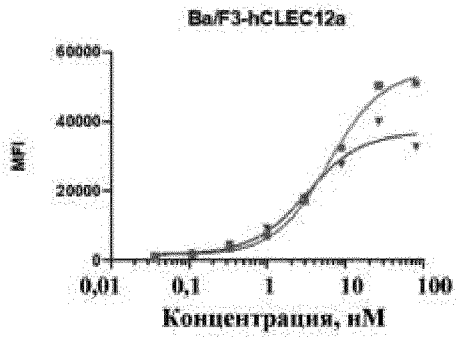
SA-PE = стрептавидин-фикоэритрин

ФИГ. 30

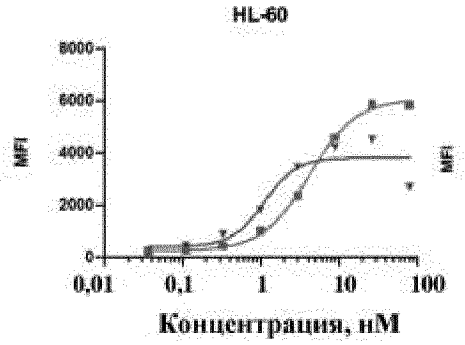

F3' TriNKET
Формат
hF3'–1602
F3 TriNKET
Формат
AB0010
Группа 13
hCLEC12A-his; hF3'pET1602, контроль;
связывание 1:1
Группа 14
hCLEC12A-his; hF3'pET1602, контроль;
связывание 1:1
Группа 5
hCLEC12A-his; AB0010-001, контроль;
связывание 1:1
Группа 6
hCLEC12A-his; AB0010-001, контроль;
связывание 1:1
A
0
250
500
750
5
10
15
20
25
30
35

ФИГ. 31

ФИГ. 32A



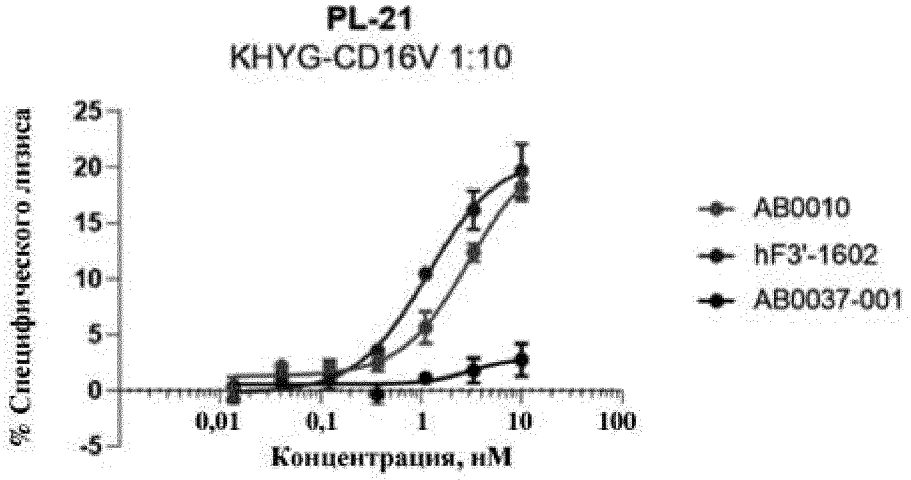

ФИГ. 32B



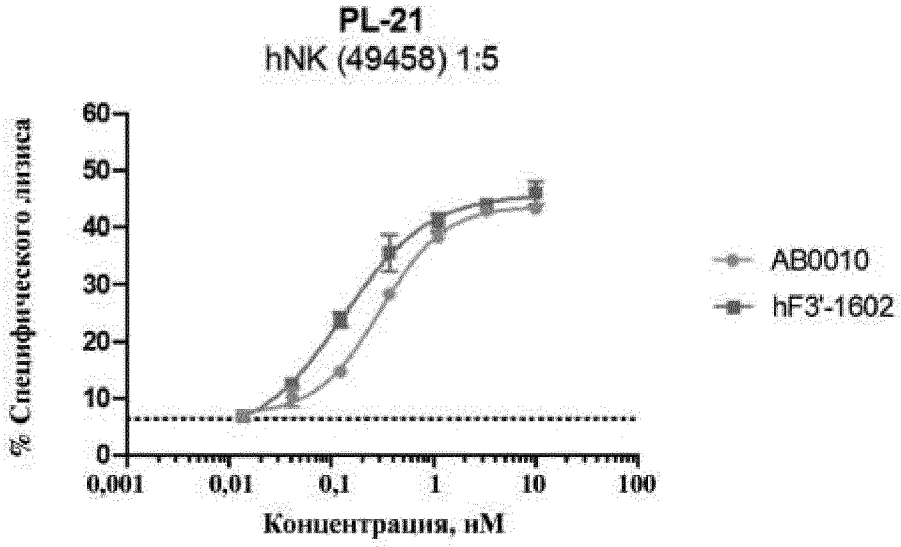

ФИГ. 32C



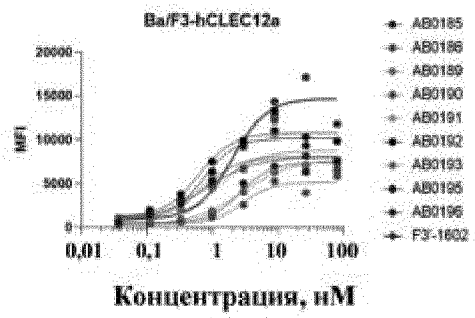
ФИГ. 33A



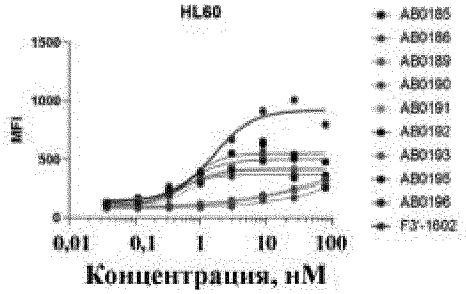

ФИГ. 33B



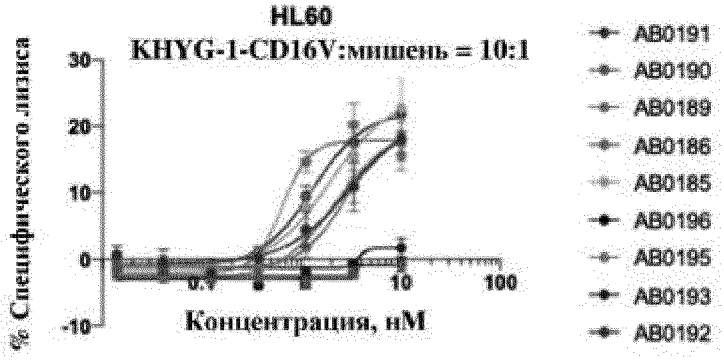
ФИГ. 34А



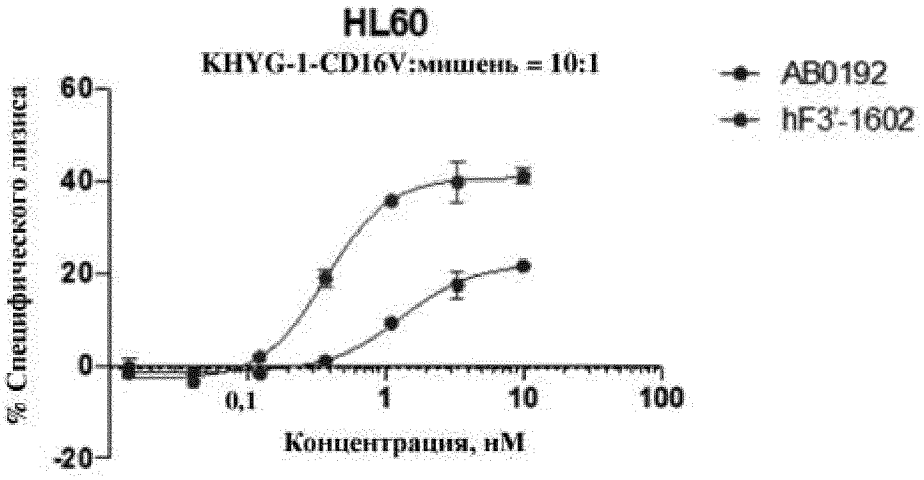

ФИГ. 34В



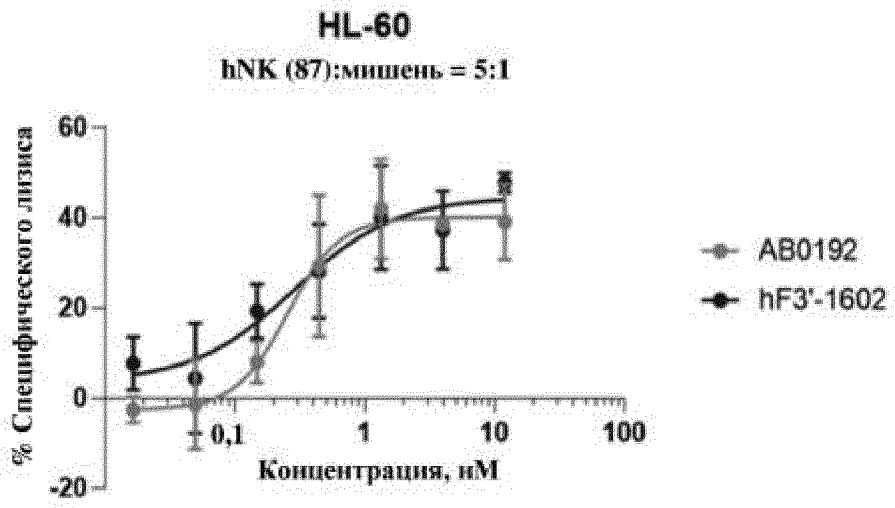

ФИГ. 35



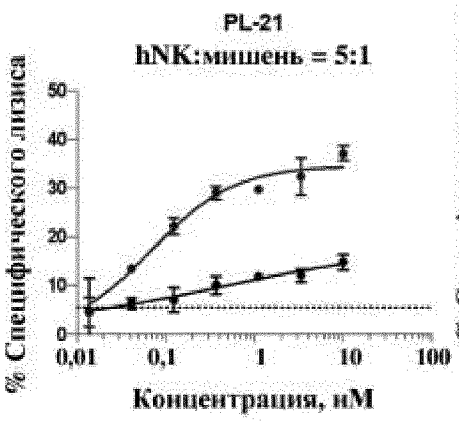
ФИГ. 36A



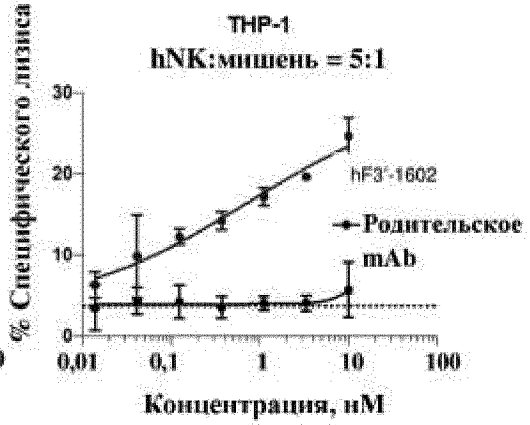

ФИГ. 36B



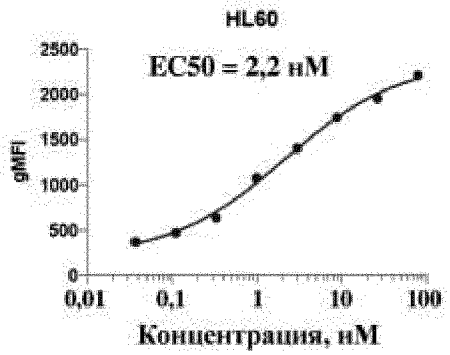
ФИГ. 37A



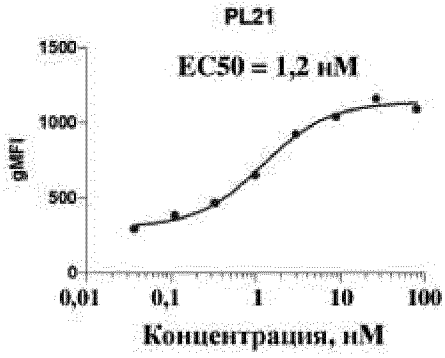

ФИГ. 37B



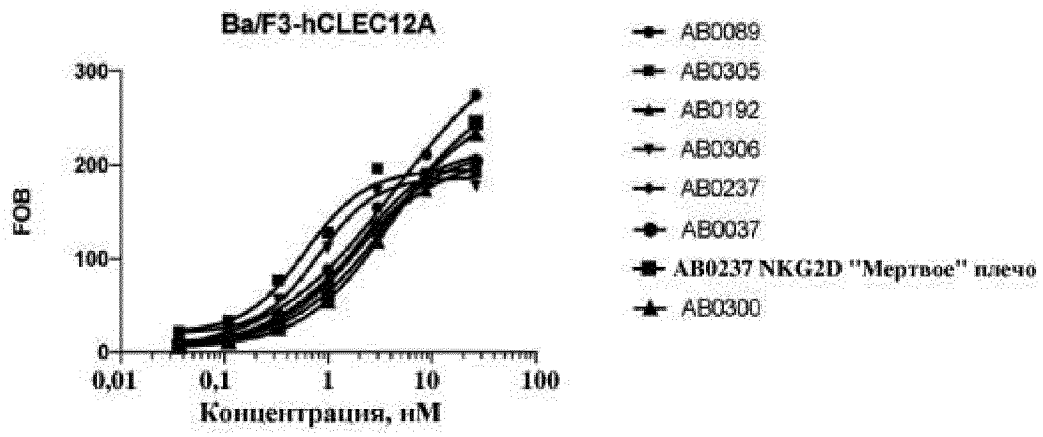

ФИГ. 38A



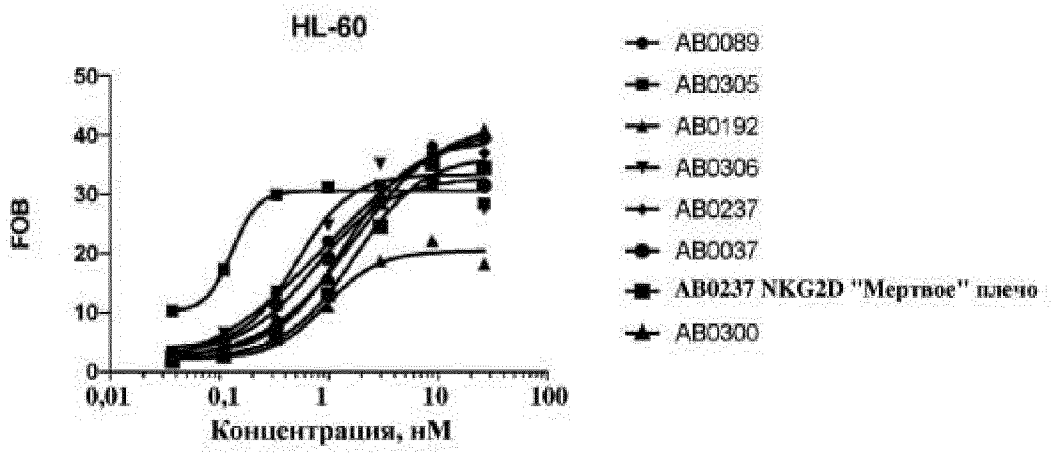

ФИГ. 38B



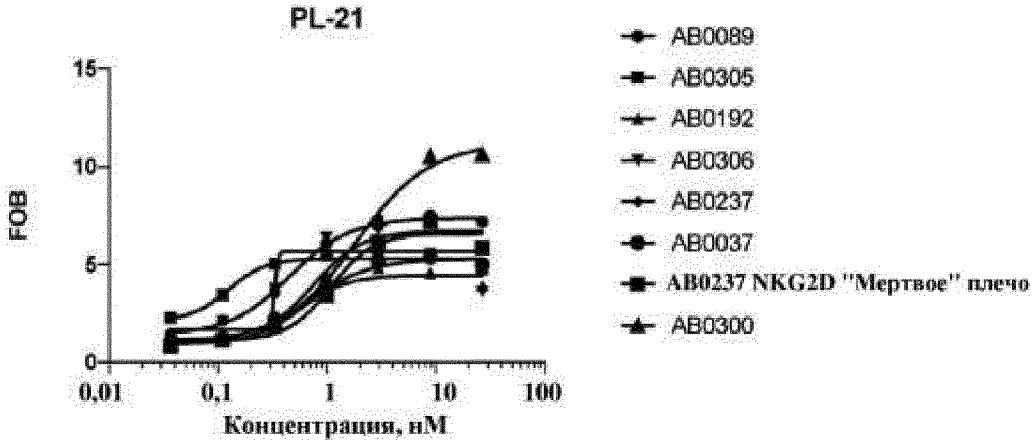
ФИГ. 39A



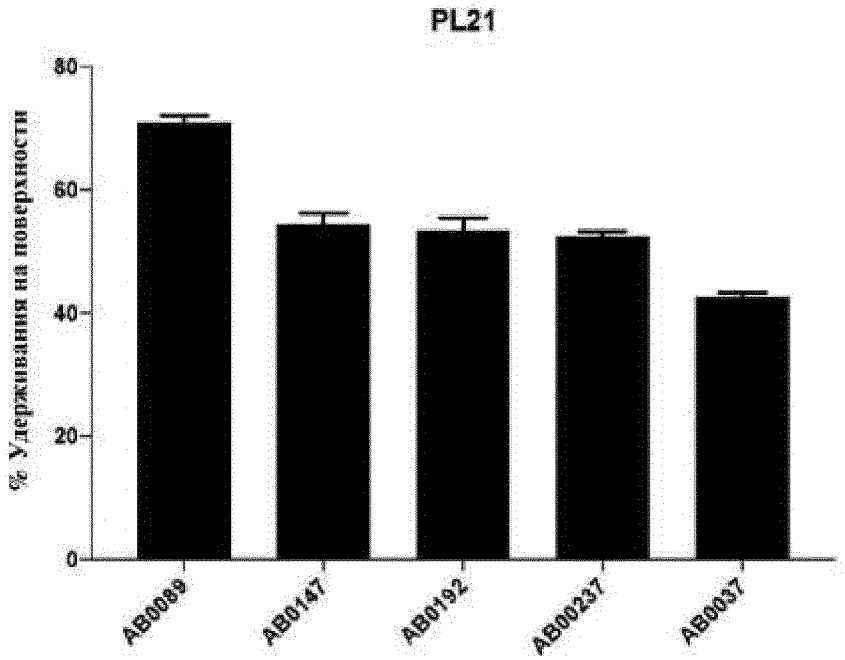

ФИГ. 39B



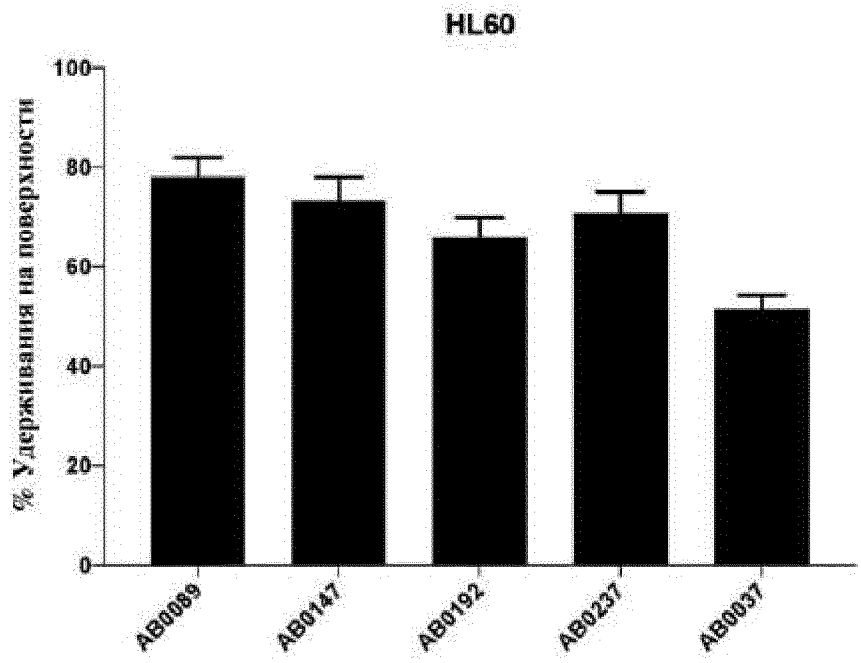
ФИГ. 39C


PL-21
FOB
15
10
5
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0089
AB0305
AB0192
AB0306
AB0237
AB0037
AB0237 NKG2D "Мертвое" плечо
AB0300

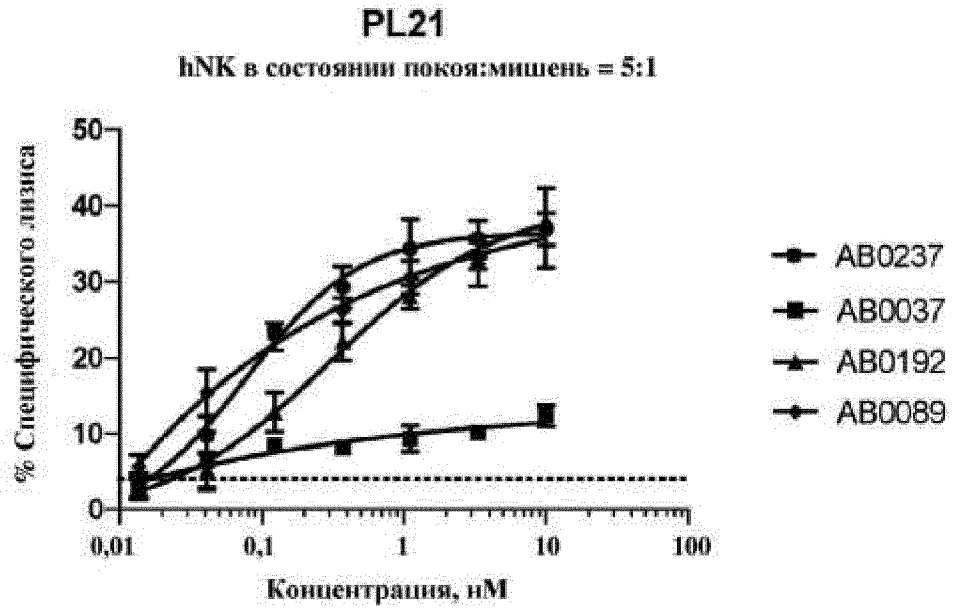
ФИГ. 40A



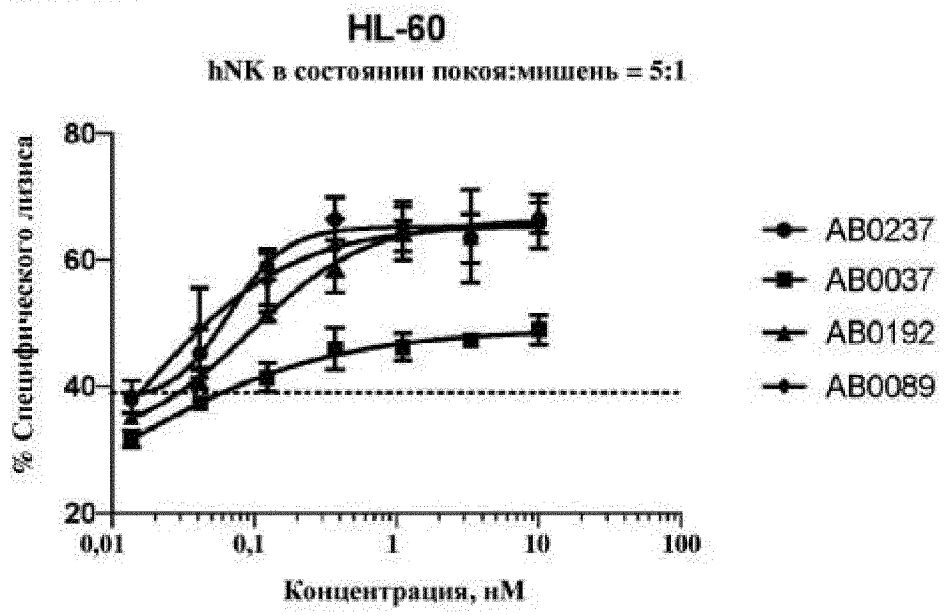

ФИГ. 40B



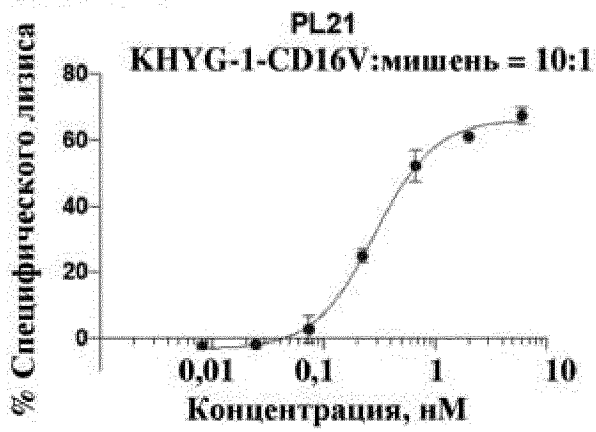
ФИГ. 41A



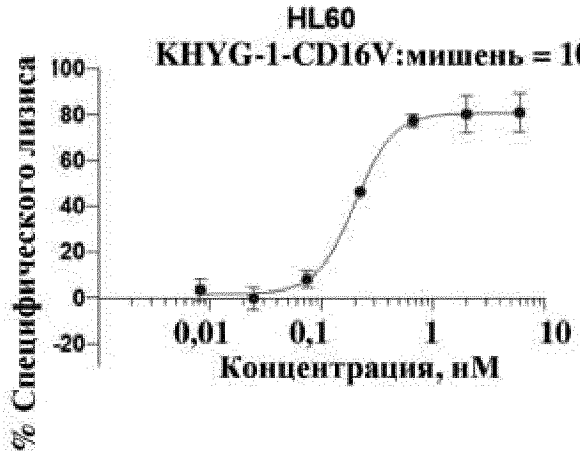

ФИГ. 41B



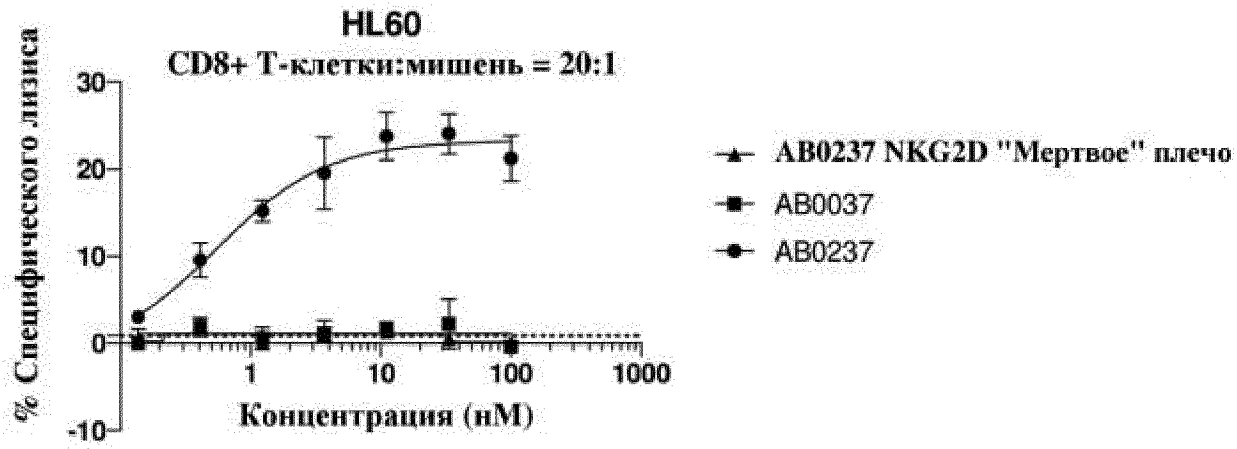
ФИГ. 42A



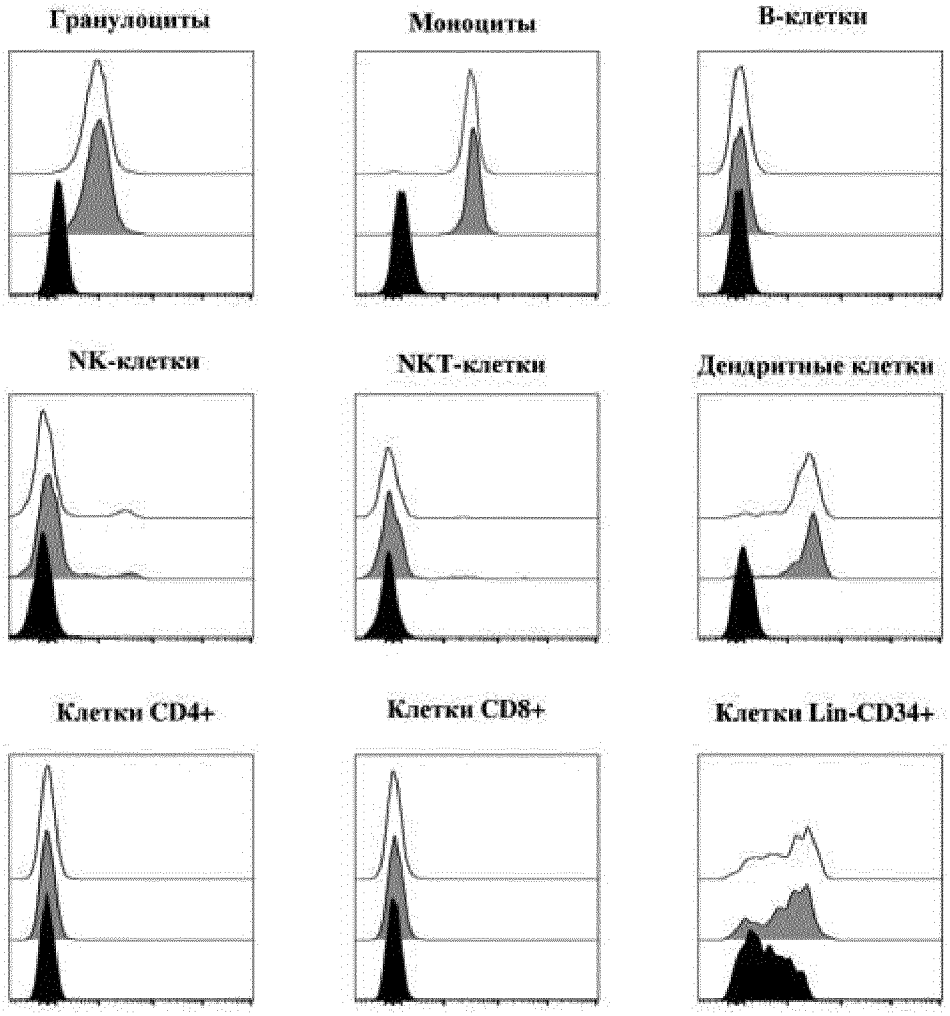

ФИГ. 42B

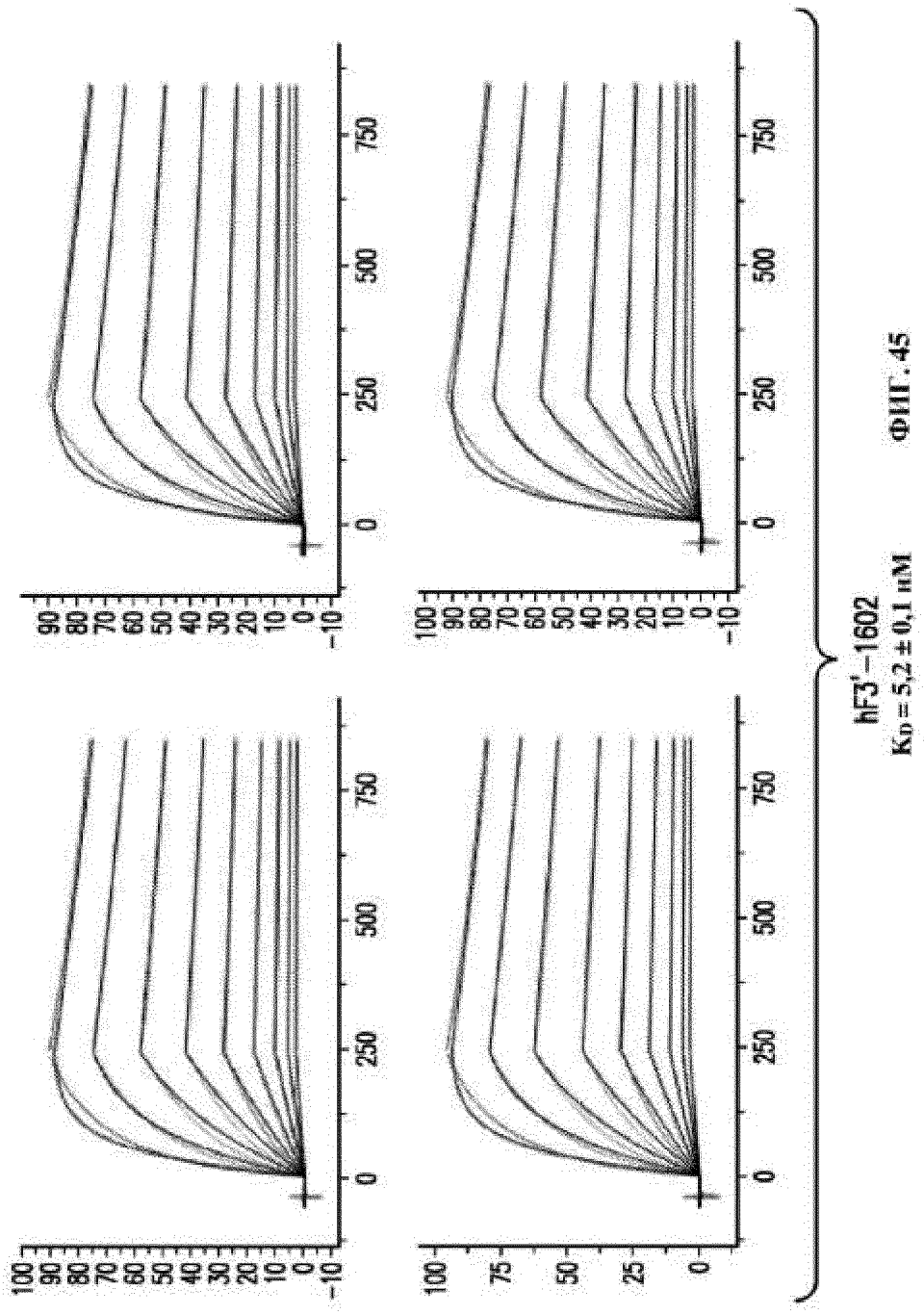



ФИГ. 43

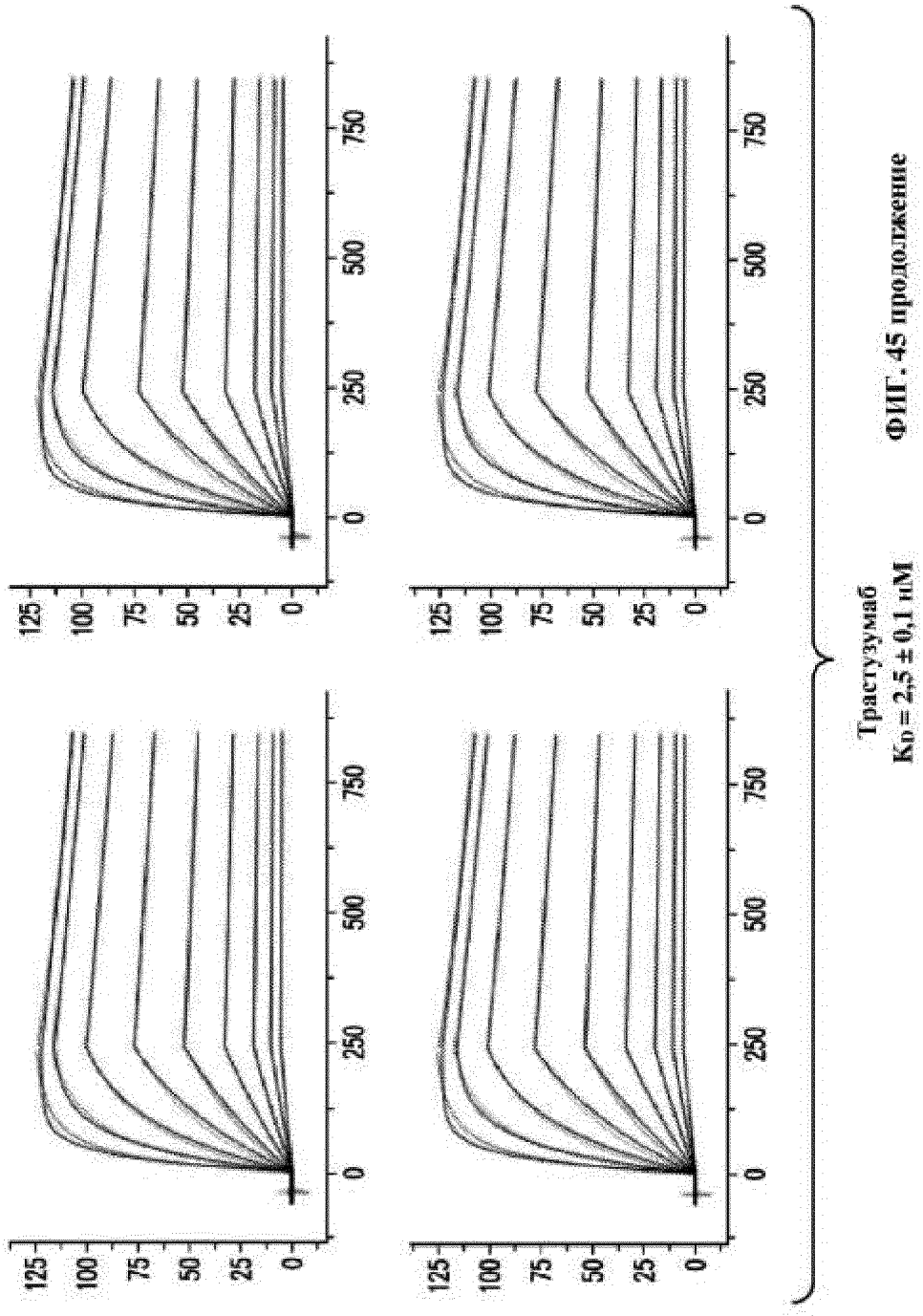


ФИГ. 44

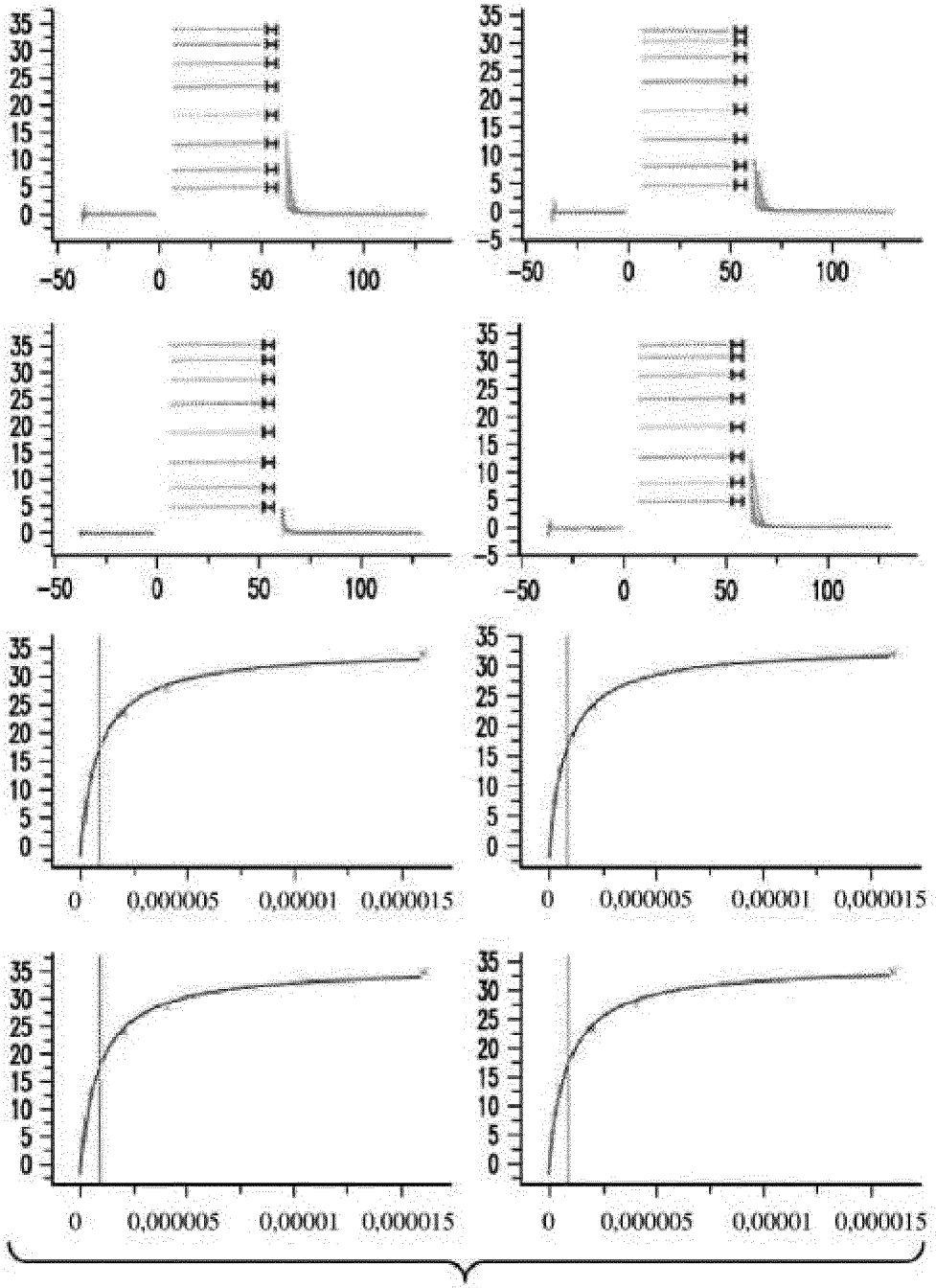

Гранулоциты
Моноциты
В-клетки
NK-клетки
NKT-клетки
Дендритные клетки
Клетки CD4+
Клетки CD8+
Клетки Lin-CD34+




ФИГ. 45

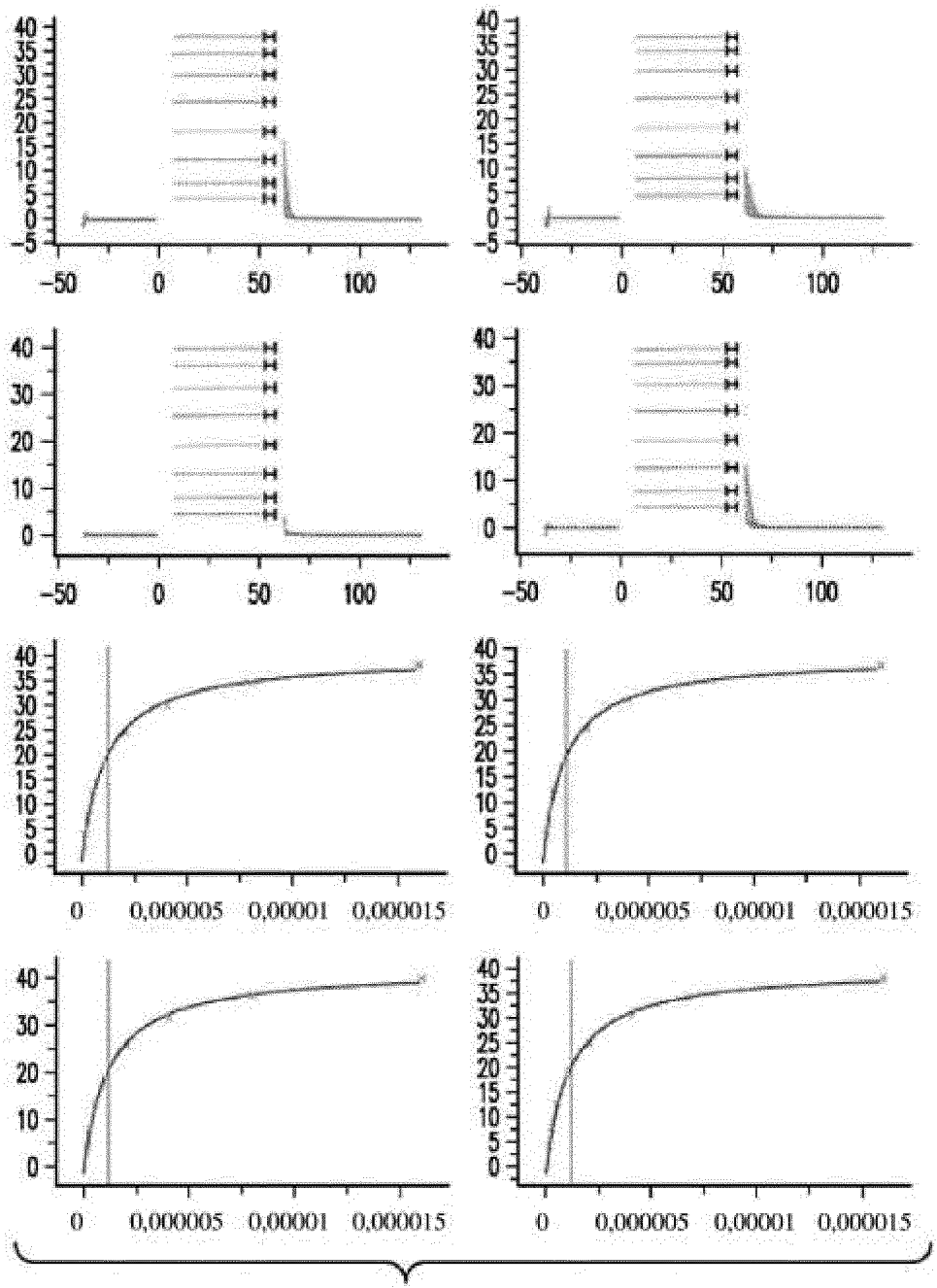



ФИГ. 45 продолжение



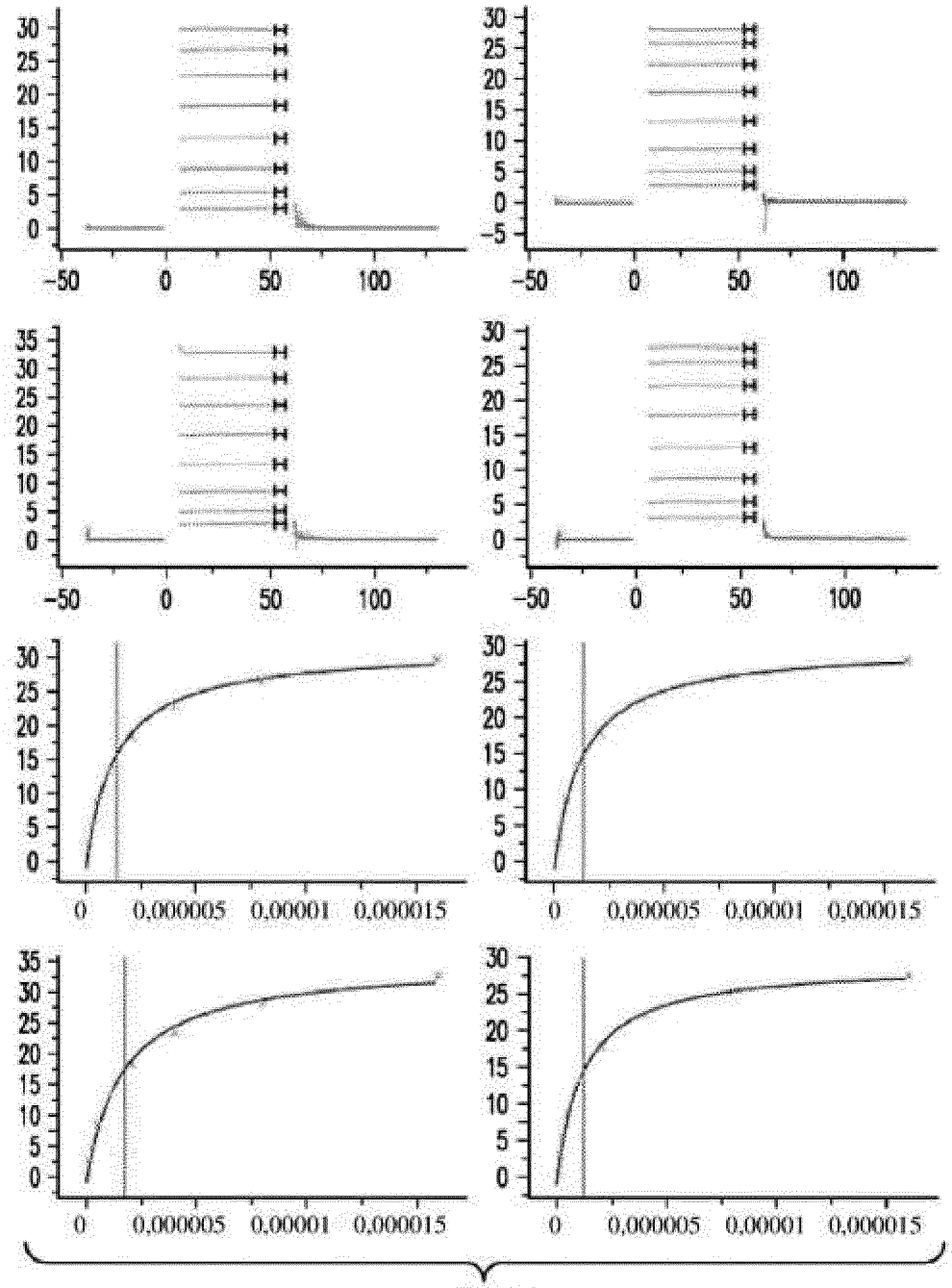

hF3'−1602
$K_D$ = 864,0 ± 39,0 нМ
(0,9 ± 0,0 мкМ)

ФИГ. 46

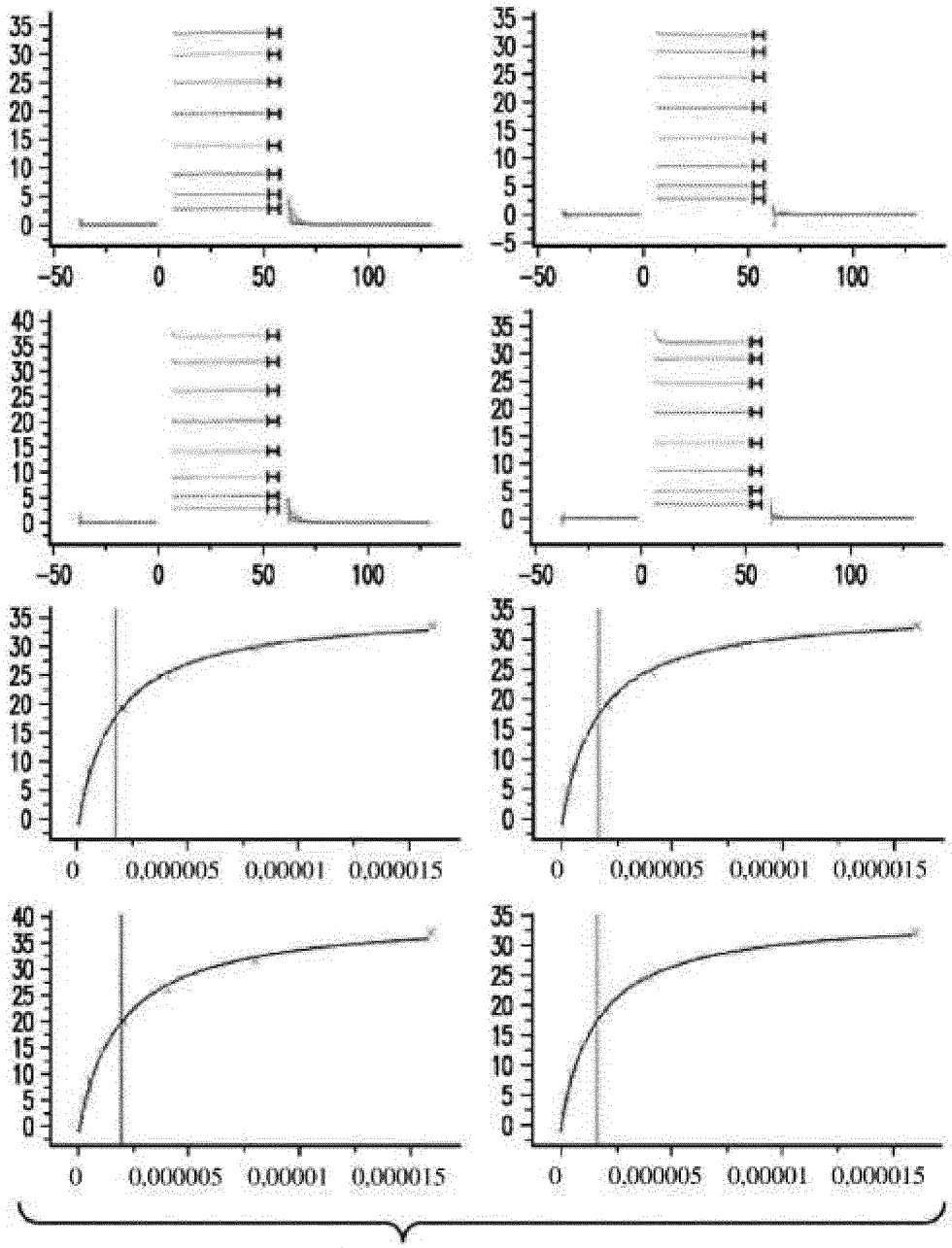



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 1140,0 ± 60,0 нМ**
**(1,1 ± 0,1 мкМ)**

**ФИГ. 46 продолжение**

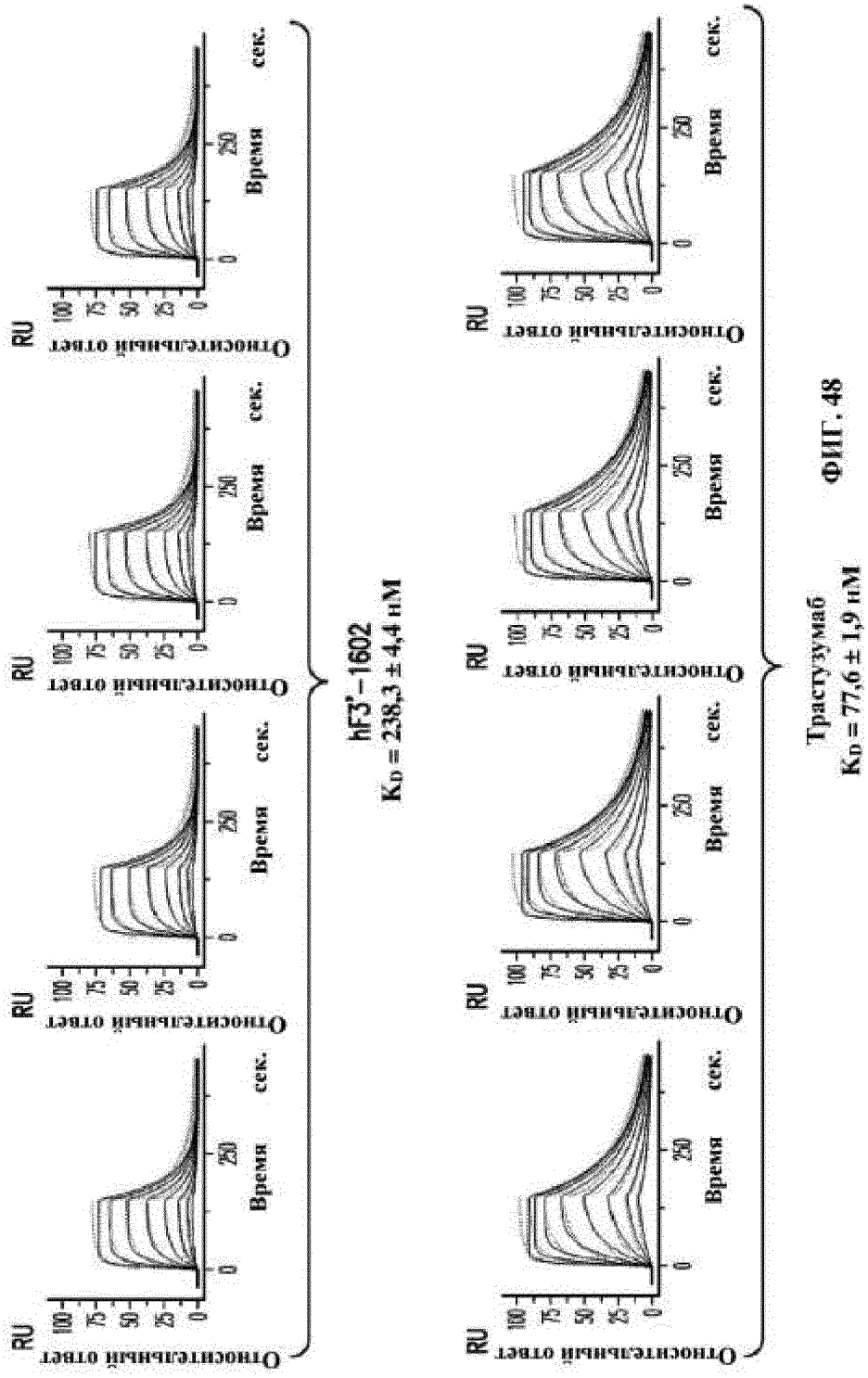



ФИГ. 47

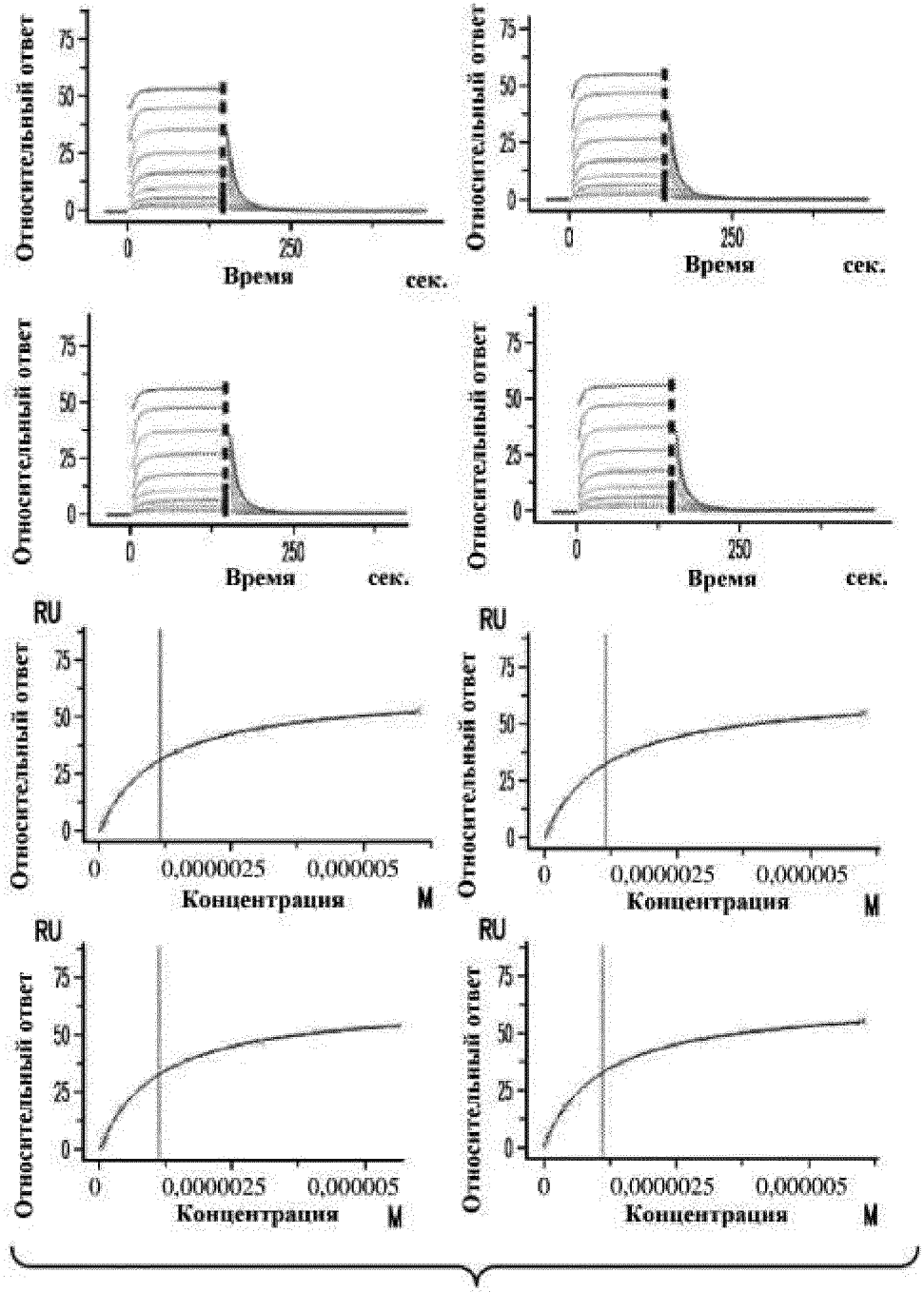



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 1690,0 ± 170,0 нМ**
**(1,7 ± 0,2 мкМ)**

**ФИГ. 47 продолжение**

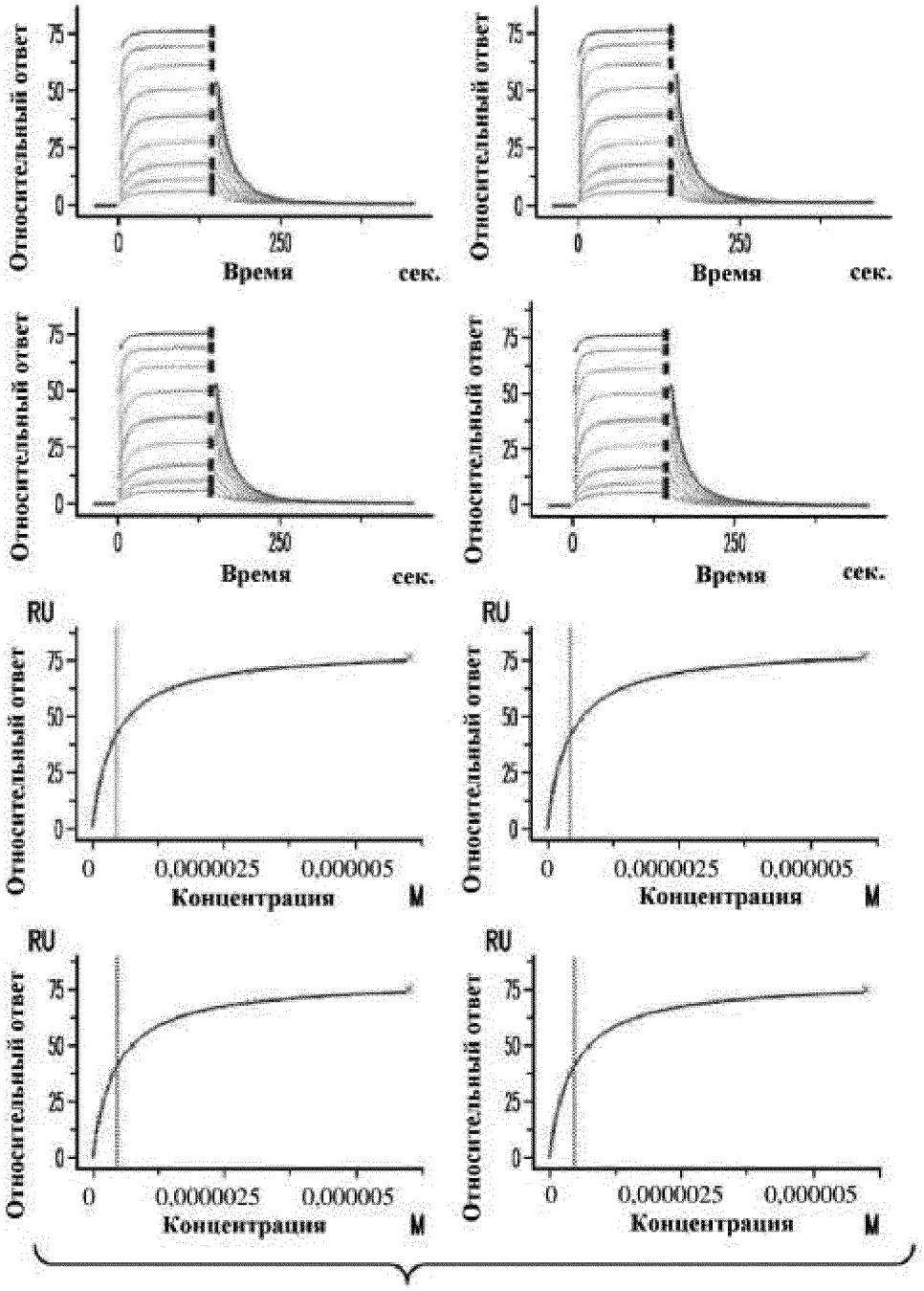

RU
Относительный ответ
100
75
50
25
0
0
250
Время сек.
hF3'-1602
KD = 238,3 ± 4,4 нМ
Трастузумаб
KD = 77,6 ± 1,9 нМ

ФИГ. 48



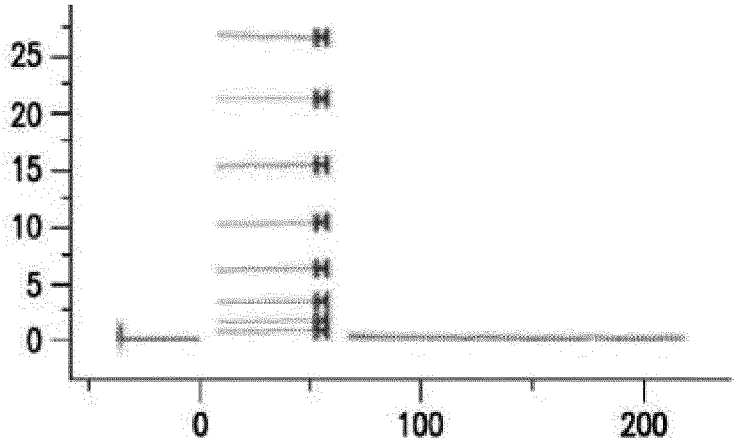

hF3'–1602
$K_D$ = 1107,5 ± 20,6 нМ

ФИГ. 49



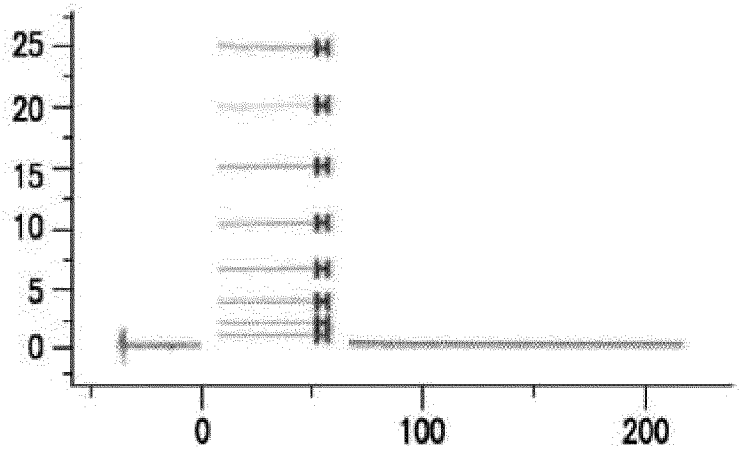

Трастузумаб
$K_D$ = 439,8 ± 8,3 нМ

ФИГ. 49 продолжение




**hF3'-1602**

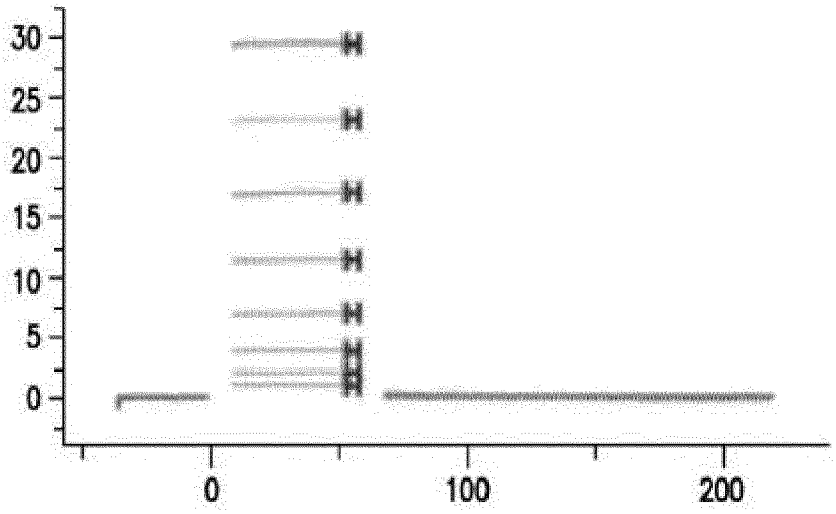
**$K_D$ = 6560,0 ± 560,0 нМ**
**(6,6 ± 0,6 мкМ)**




**hF3'-1602**

**$K_D$ = 6560,0 ± 560,0 нМ**
**(6,6 ± 0,6 мкМ)**

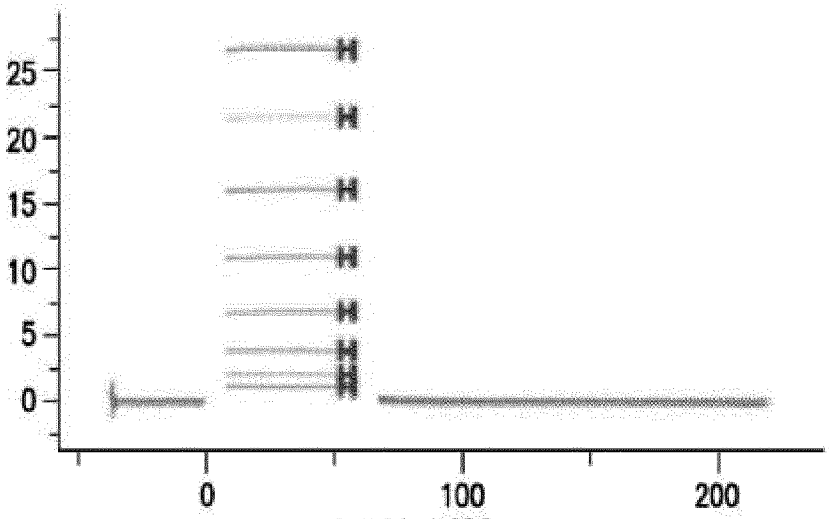
**ФИГ. 50**




**hF3'-1602**

**$K_D$ = 6560,0 ± 560,0 нМ**

**(6,6 ± 0,6 мкМ)**

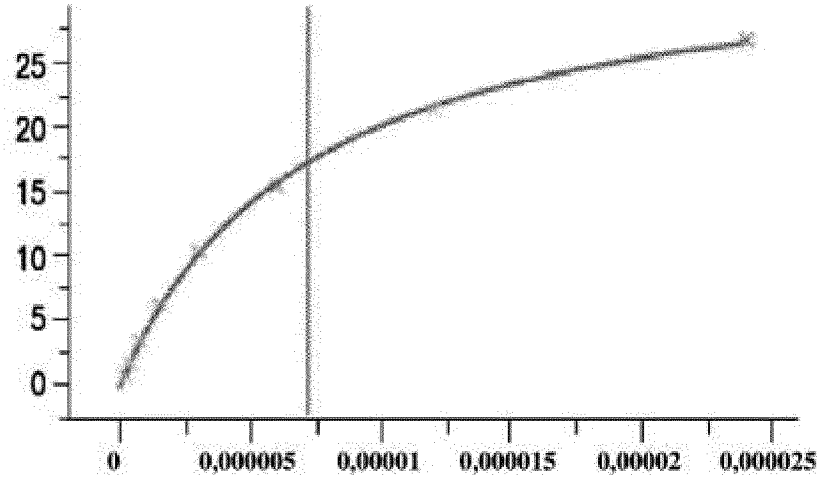



**hF3'-1602**

**$K_D$ = 6560,0 ± 560,0 нМ**

**(6,6 ± 0,6 мкМ)**

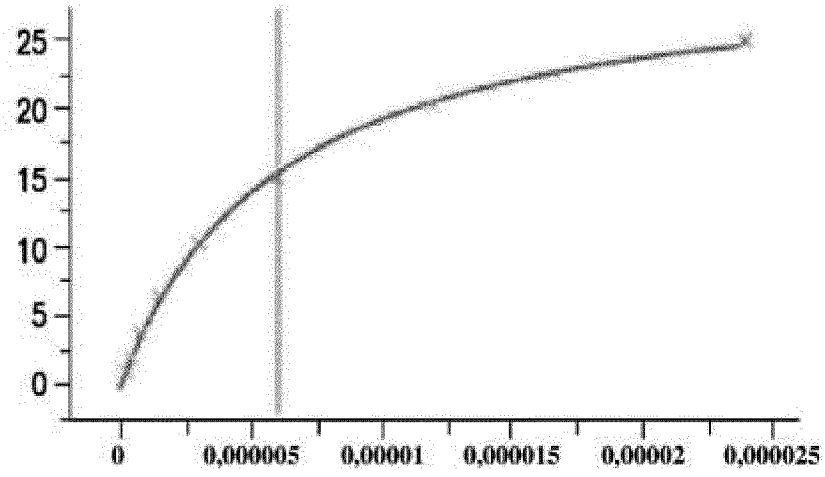
**ФИГ. 50 продолжение**




**hF3'-1602**

**$K_D$ = 6560,0 ± 560,0 нМ**

**(6,6 ± 0,6 мкМ)**

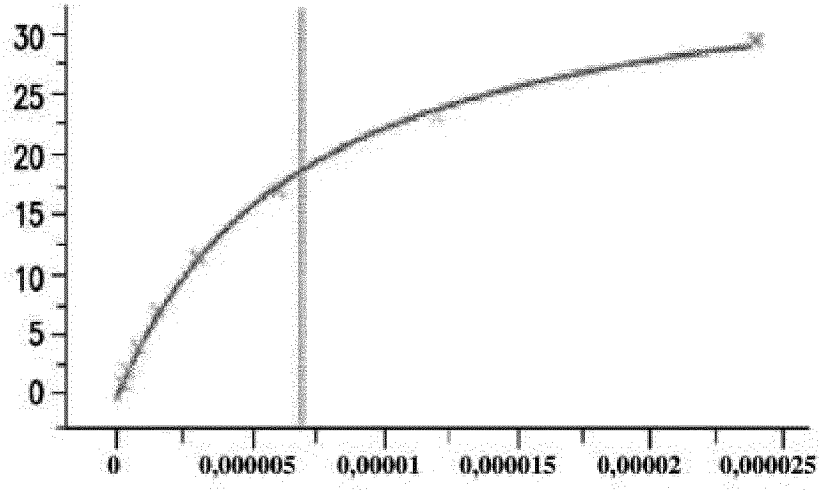



**hF3'-1602**

**$K_D$ = 6560,0 ± 560,0 нМ**

**(6,6 ± 0,6 мкМ)**

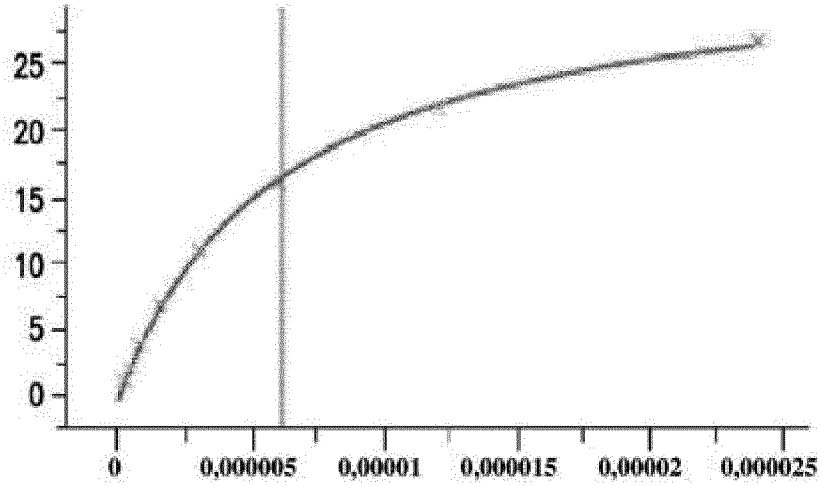
**ФИГ. 50 продолжение**




**hF3'-1602**

**$K_D$ = 6560,0 ± 560,0 нМ**

**(6,6 ± 0,6 мкМ)**

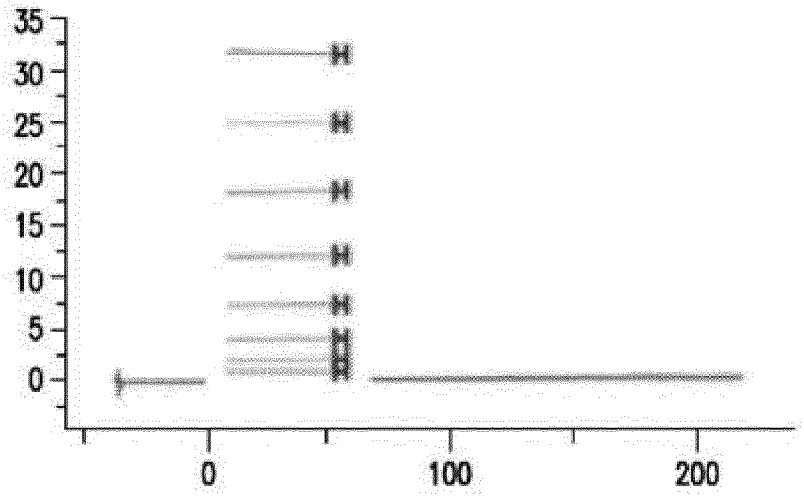



**hF3'-1602**

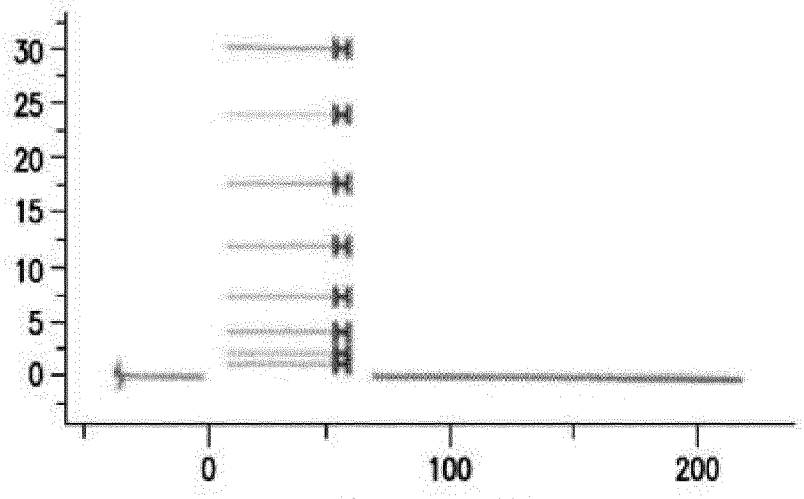
**$K_D$ = 6560,0 ± 560,0 нМ**

**(6,6 ± 0,6 мкМ)**

**ФИГ. 50 продолжение**

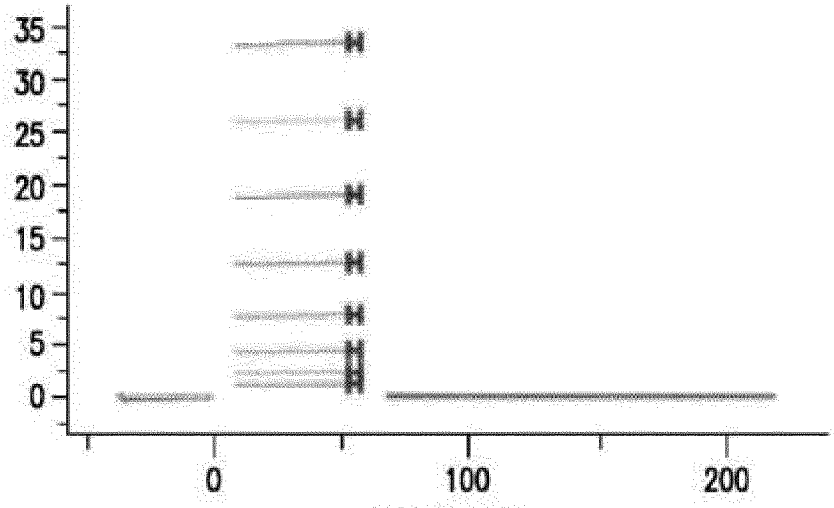



Трастузумаб
$K_D$ = 6880,0 ± 270,0 нМ
(6,9 ± 0,3 мкМ)

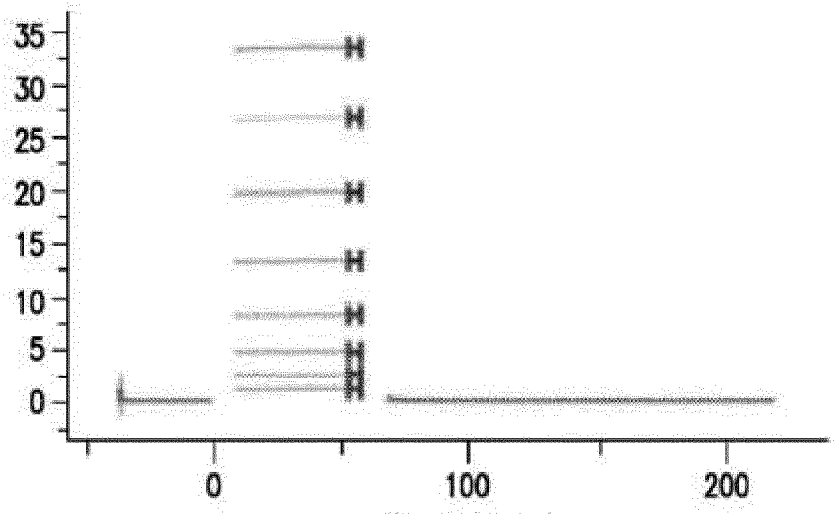



Трастузумаб
$K_D$ = 6880,0 ± 270,0 нМ
(6,9 ± 0,3 мкМ)

ФИГ. 50 продолжение

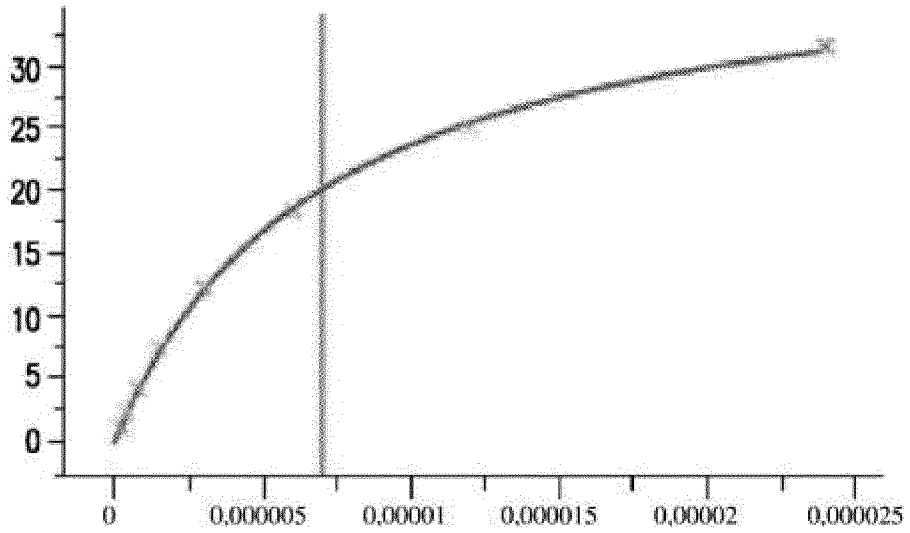



Трастузумаб
$K_D$ = 6880,0 ± 270,0 нМ
(6,9 ± 0,3 мкМ)

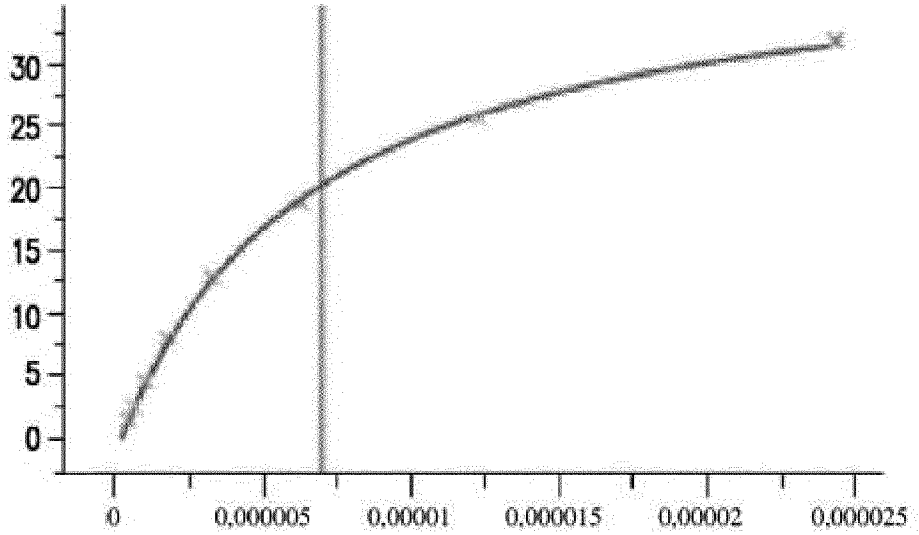



Трастузумаб
$K_D$ = 6880,0 ± 270,0 нМ
(6,9 ± 0,3 мкМ)

ФИГ. 50 продолжение

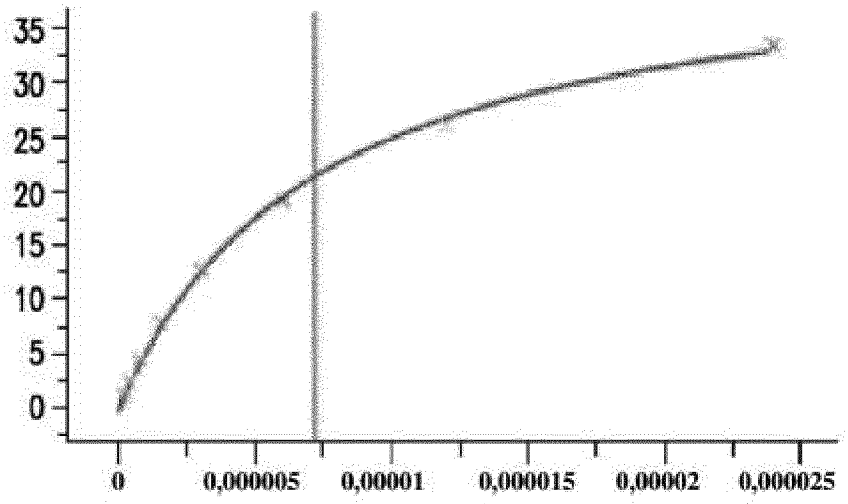



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 6880,0 ± 270,0 нМ**
**(6,9 ± 0,3 мкМ)**

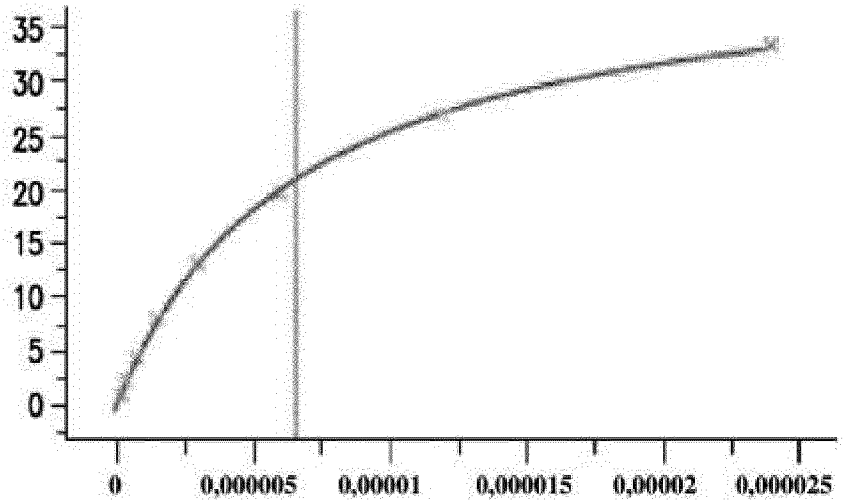



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 6880,0 ± 270,0 нМ**
**(6,9 ± 0,3 мкМ)**

**ФИГ. 50 продолжение**

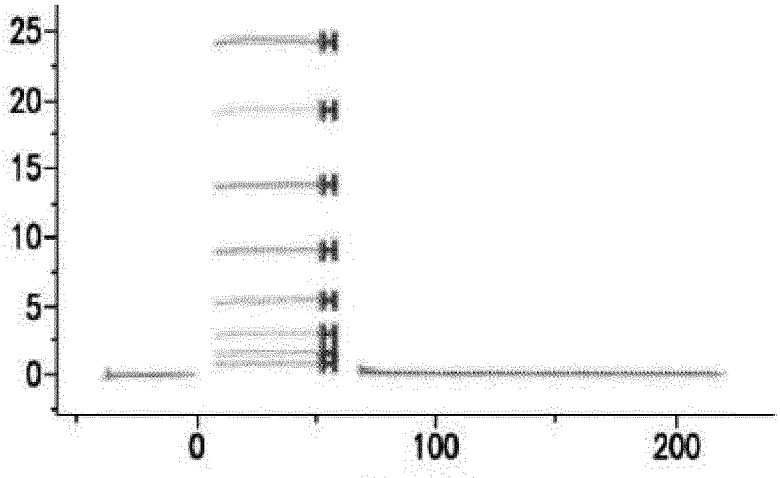



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 6880,0 ± 270,0 нМ**
**(6,9 ± 0,3 мкМ)**

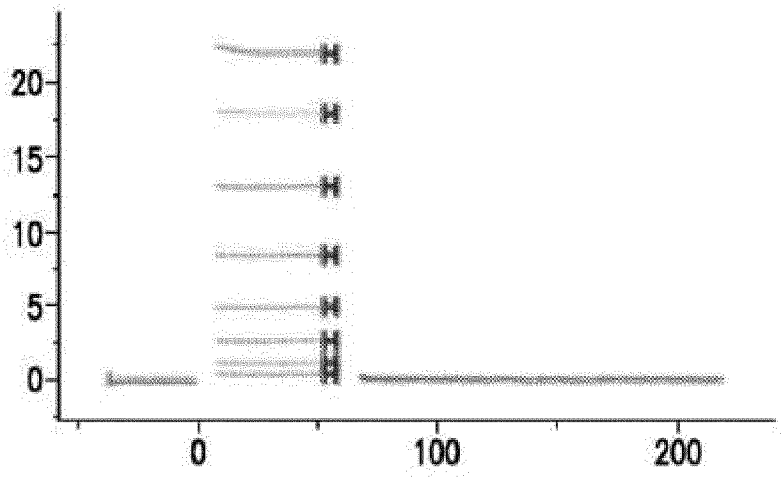



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 6880,0 ± 270,0 нМ**
**(6,9 ± 0,3 мкМ)**

**ФИГ. 50 продолжение**

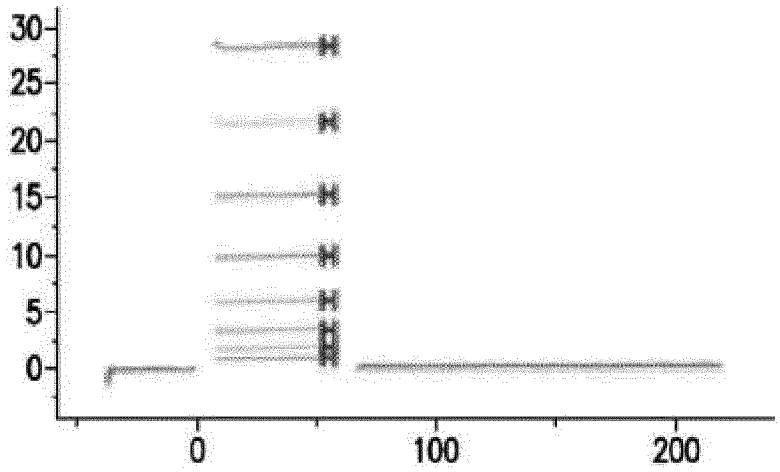



hF3'-1602
$K_D$ = 7460,0 ± 840,0 нМ
(7,5 ± 0,8 мкМ)



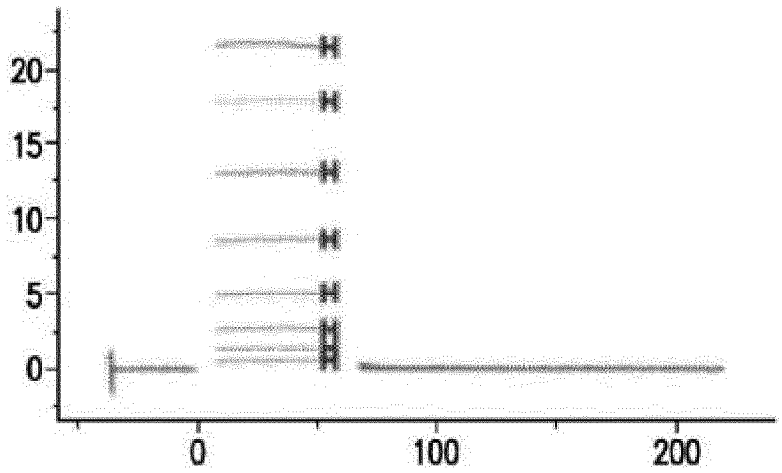

hF3'-1602
$K_D$ = 7460,0 ± 840,0 нМ
(7,5 ± 0,8 мкМ)

ФИГ. 51




hF3'-1602

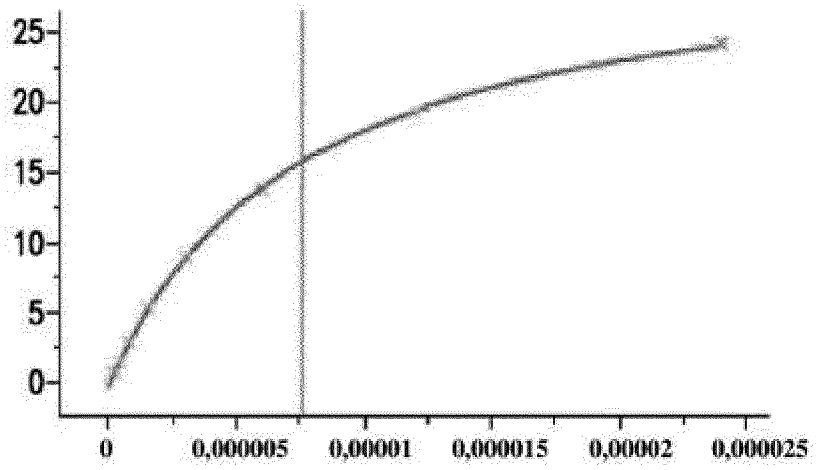
$K_D$ = 7460,0 ± 840,0 нМ
(7,5 ± 0,8 мкМ)




hF3'-1602

$K_D$ = 7460,0 ± 840,0 нМ
(7,5 ± 0,8 мкМ)

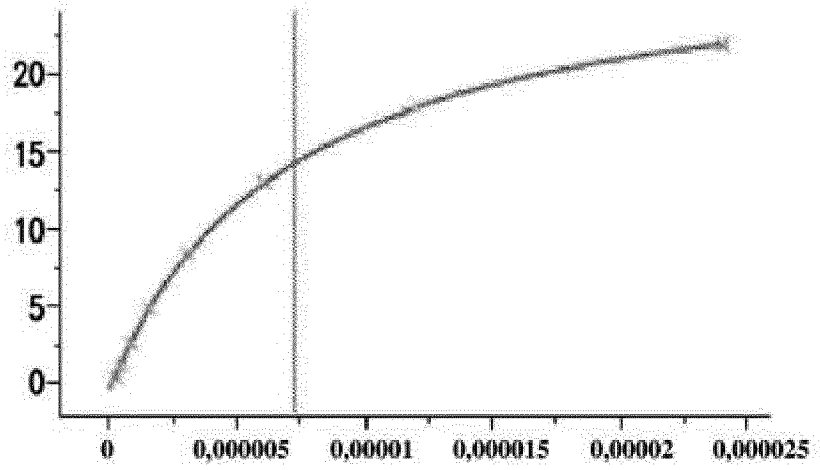
ФИГ. 51 продолжение




**hF3'-1602**

**$K_D$ = 7460,0 ± 840,0 нМ**

**(7,5 ± 0,8 мкМ)**

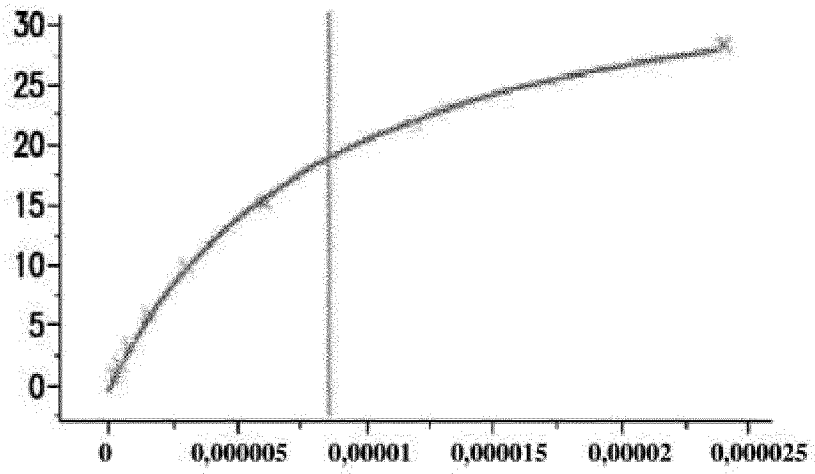



**hF3'-1602**

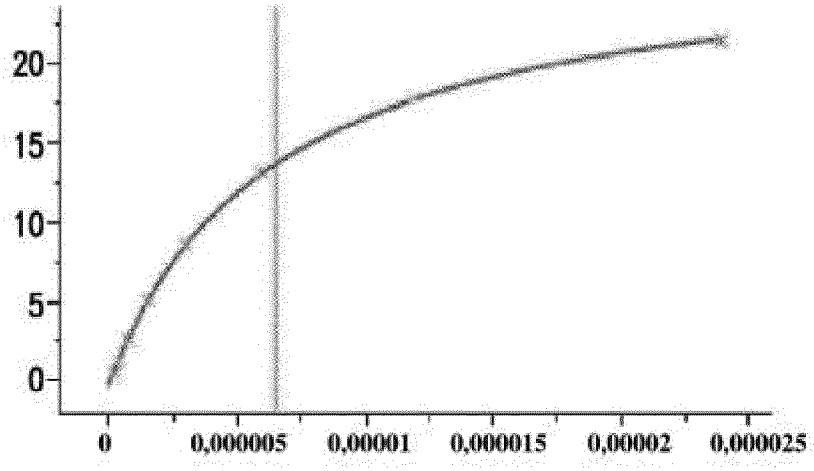
**$K_D$ = 7460,0 ± 840,0 нМ**

**(7,5 ± 0,8 мкМ)**

**ФИГ. 51 продолжение**

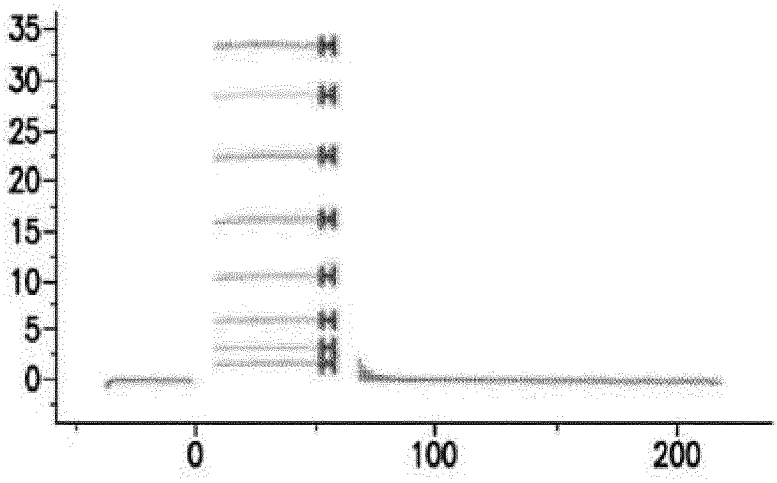



hF3'-1602
$K_D$ = 7460,0 ± 840,0 нМ
(7,5 ± 0,8 мкМ)

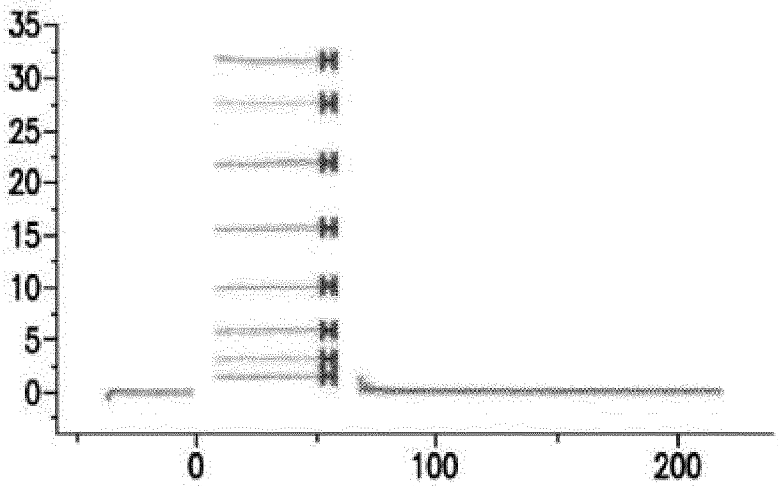



hF3'-1602
$K_D$ = 7460,0 ± 840,0 нМ
(7,5 ± 0,8 мкМ)

**ФИГ. 51 продолжение**

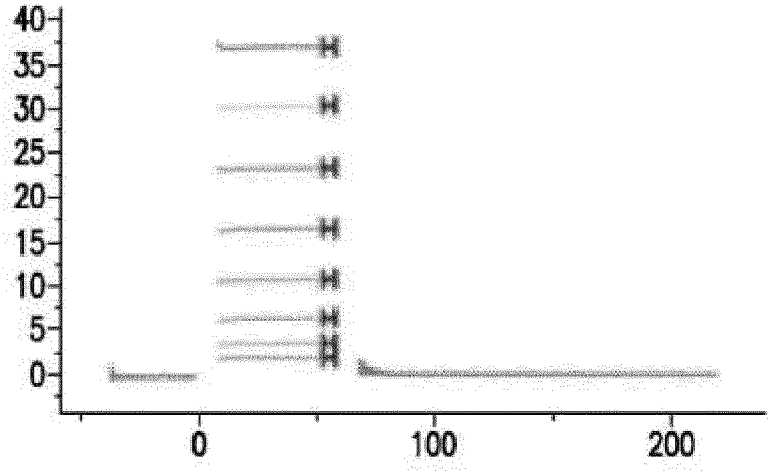



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 4200,0 ± 430,0 нМ**
**(4,2 ± 0,4 мкМ)**

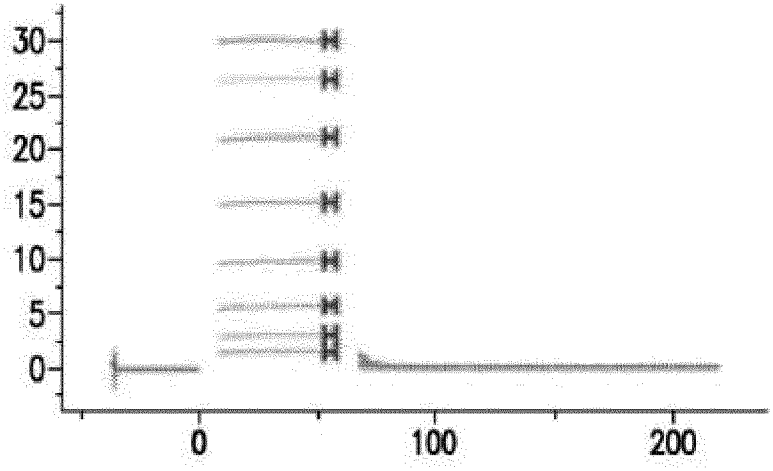



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 4200,0 ± 430,0 нМ**
**(4,2 ± 0,4 мкМ)**

**ФИГ. 51 продолжение**

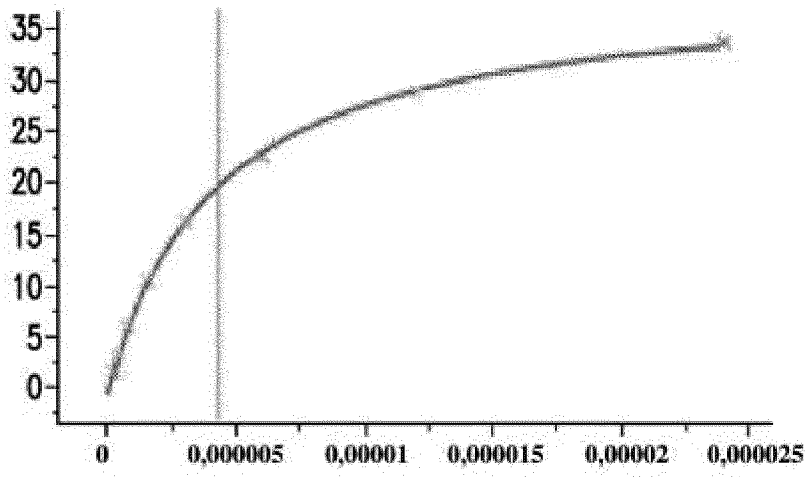



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 4200,0 ± 430,0 нМ**
**(4,2 ± 0,4 мкМ)**

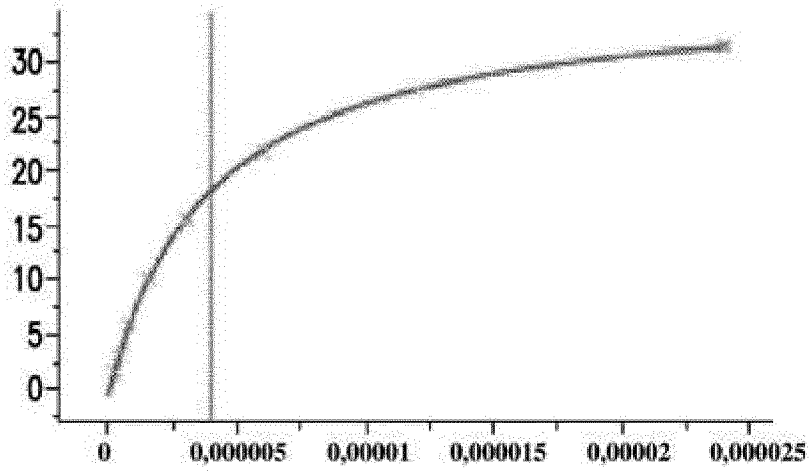



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 4200,0 ± 430,0 нМ**
**(4,2 ± 0,4 мкМ)**

**ФИГ. 51 продолжение**

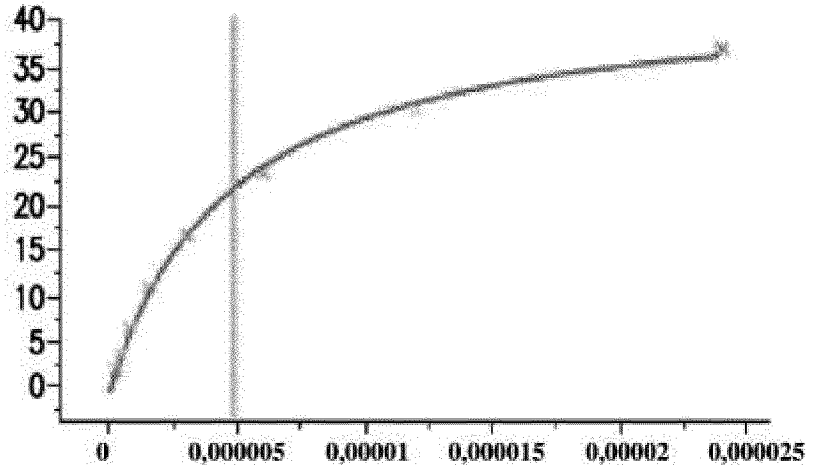



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 4200,0 ± 430,0 нМ**
**(4,2 ± 0,4 мкМ)**

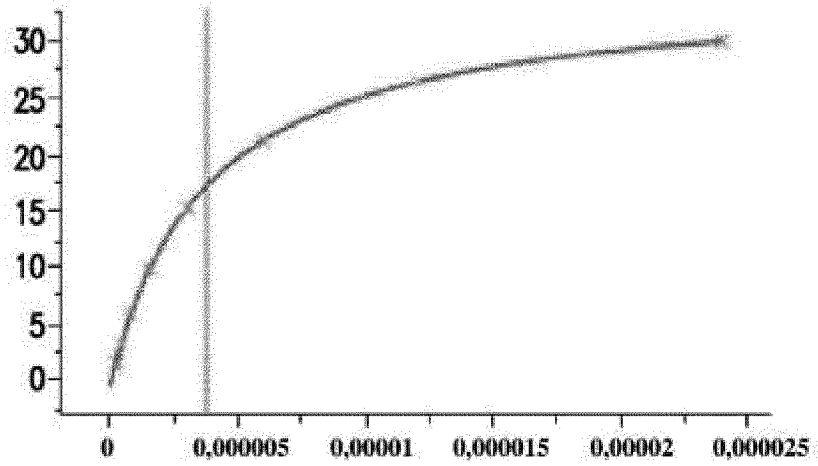



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 4200,0 ± 430,0 нМ**
**(4,2 ± 0,4 мкМ)**

**ФИГ. 51 продолжение**

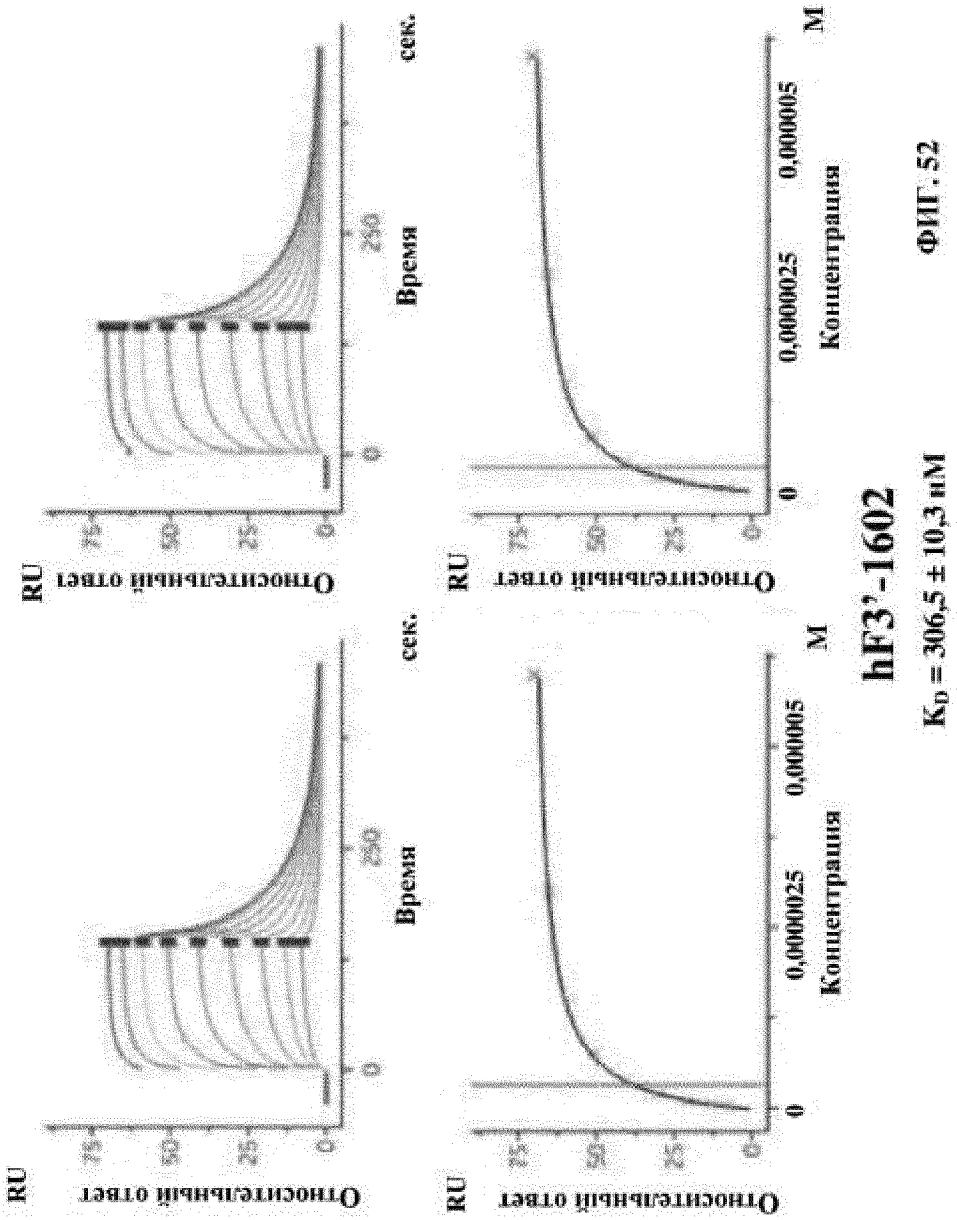



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 4200,0 ± 430,0 нМ**
**(4,2 ± 0,4 мкМ)**

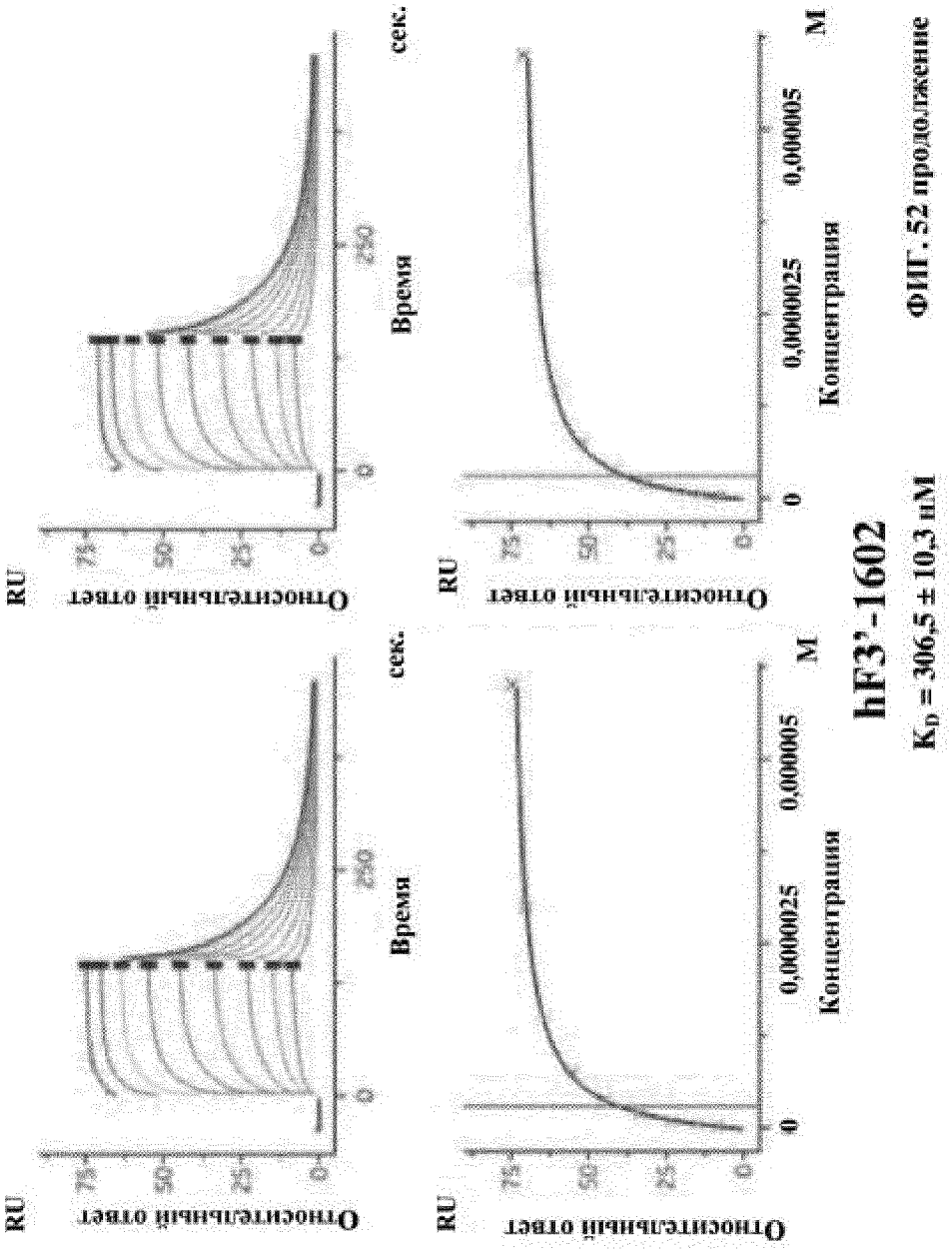



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 4200,0 ± 430,0 нМ**
**(4,2 ± 0,4 мкМ)**

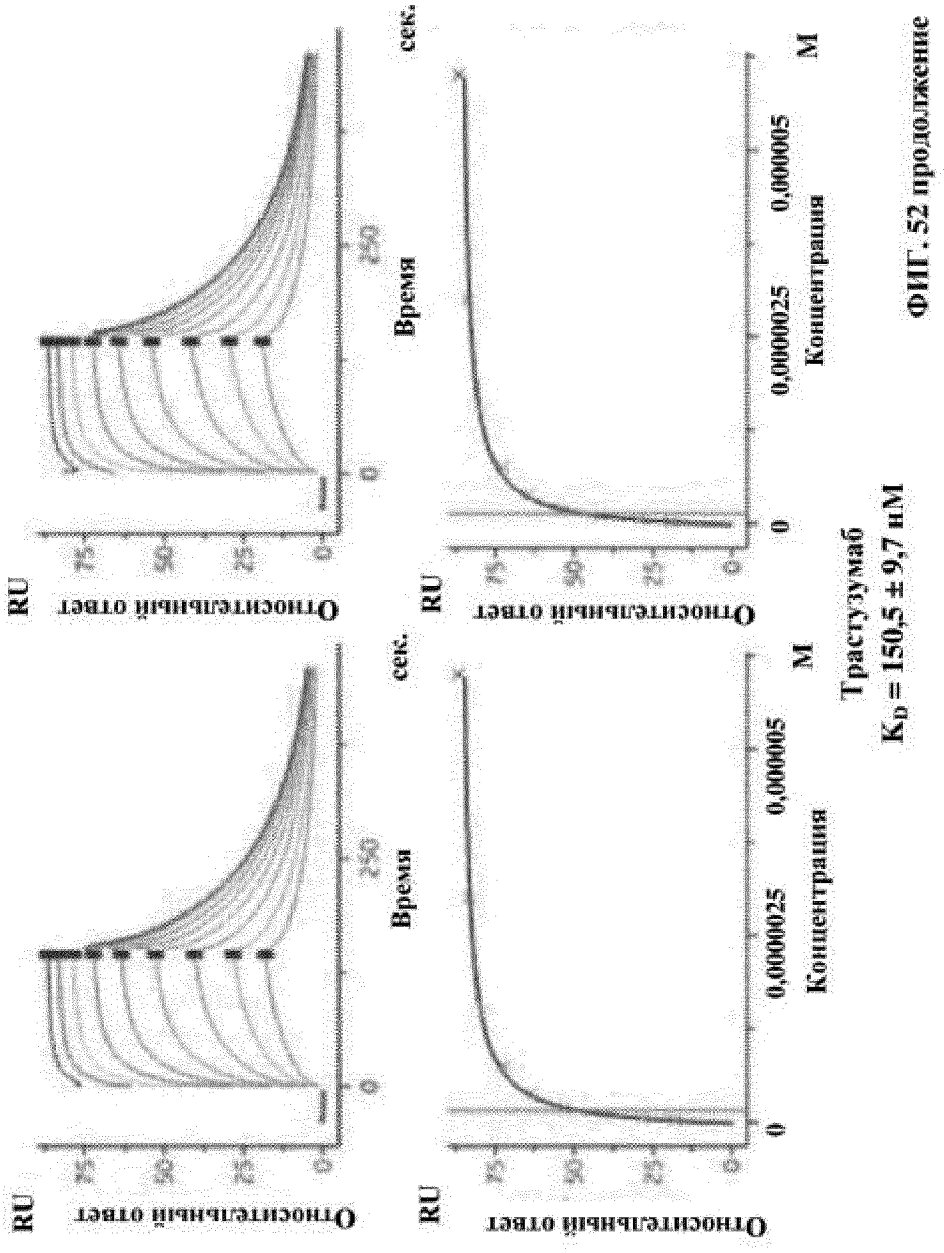
**ФИГ. 51 продолжение**


Относительный ответ
RU
Время
сек.
Концентрация
M
hF3'-1602
$K_D$ = 306,5 ± 10,3 нМ

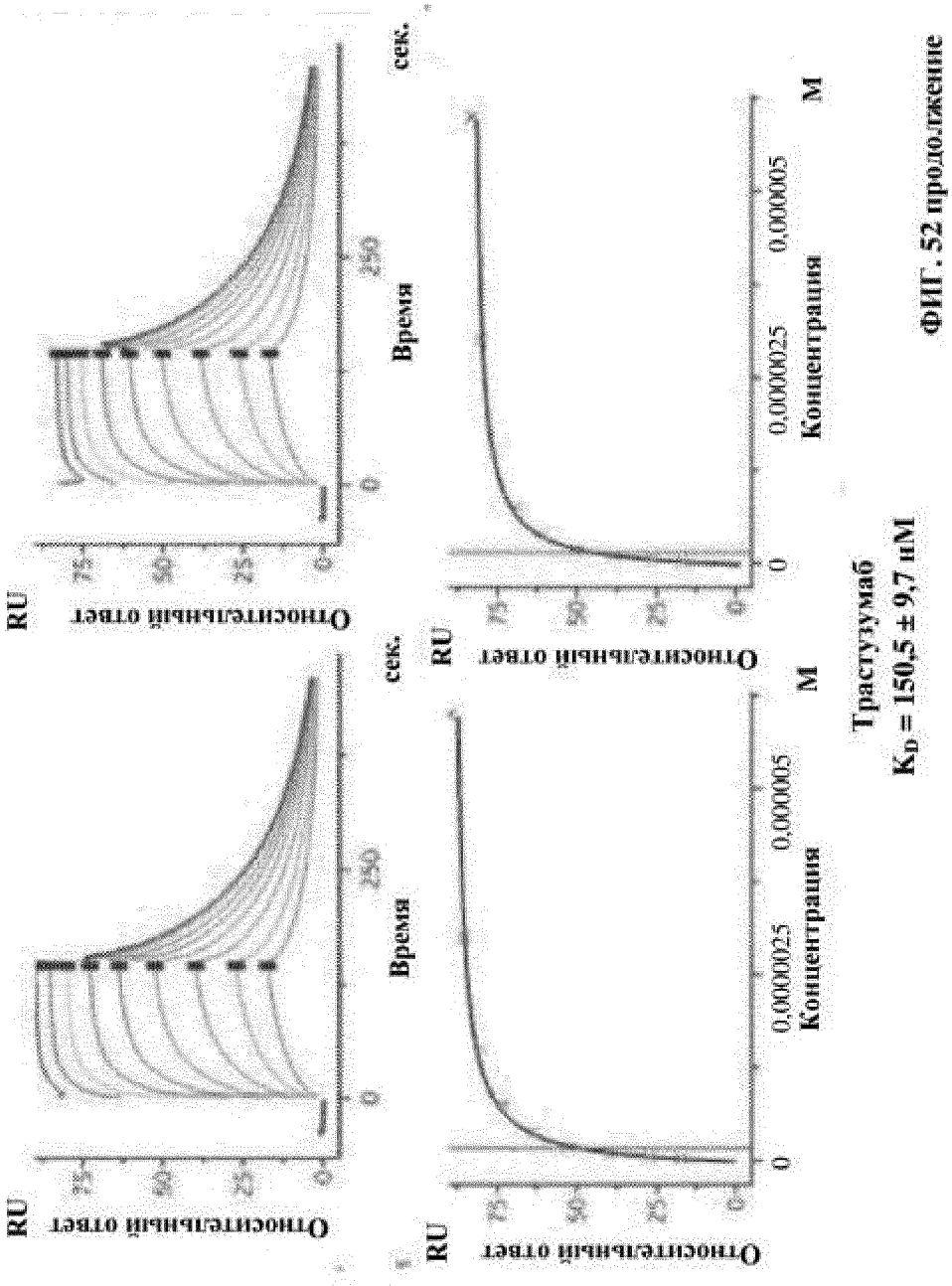
ФИГ. 52



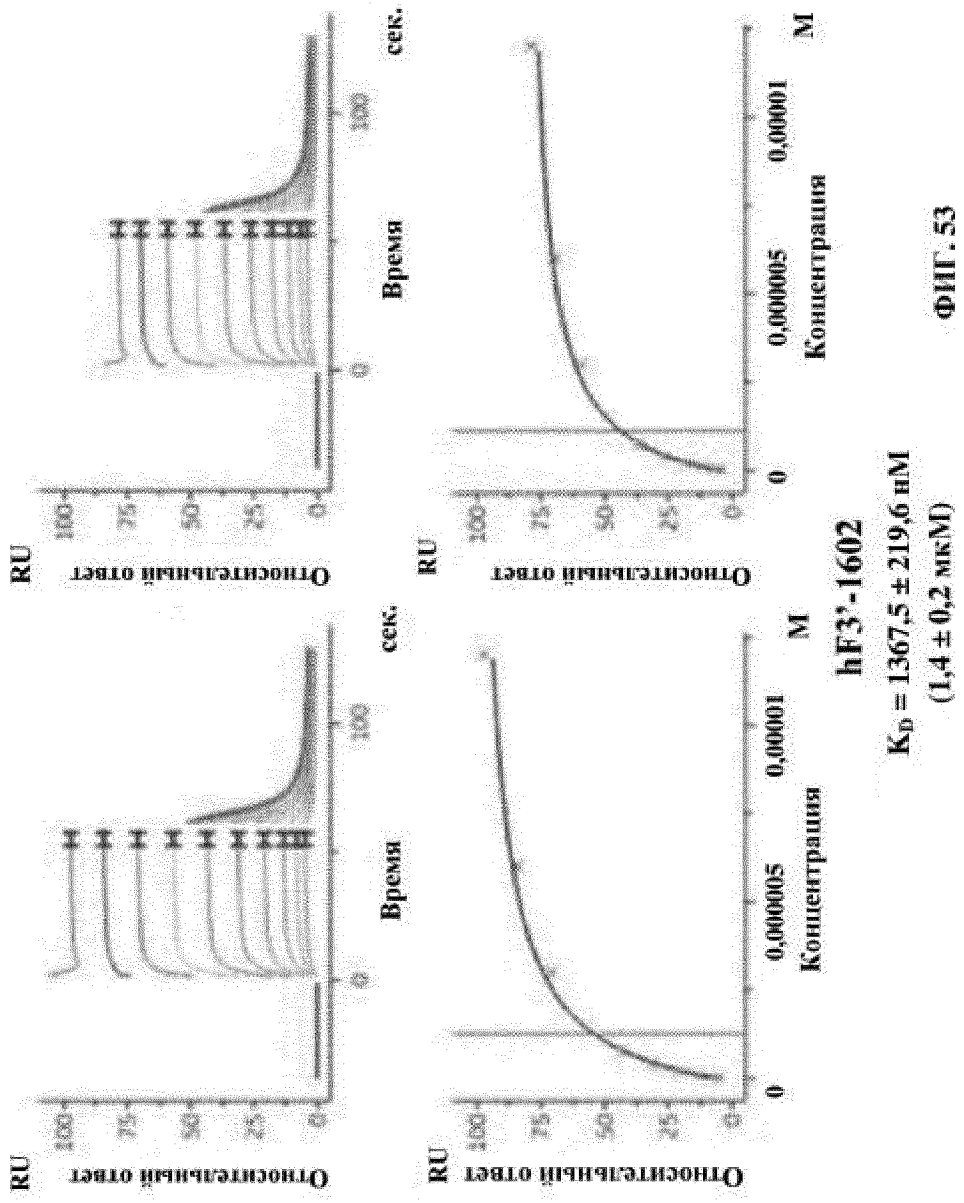

ФИГ. 52 продолжение



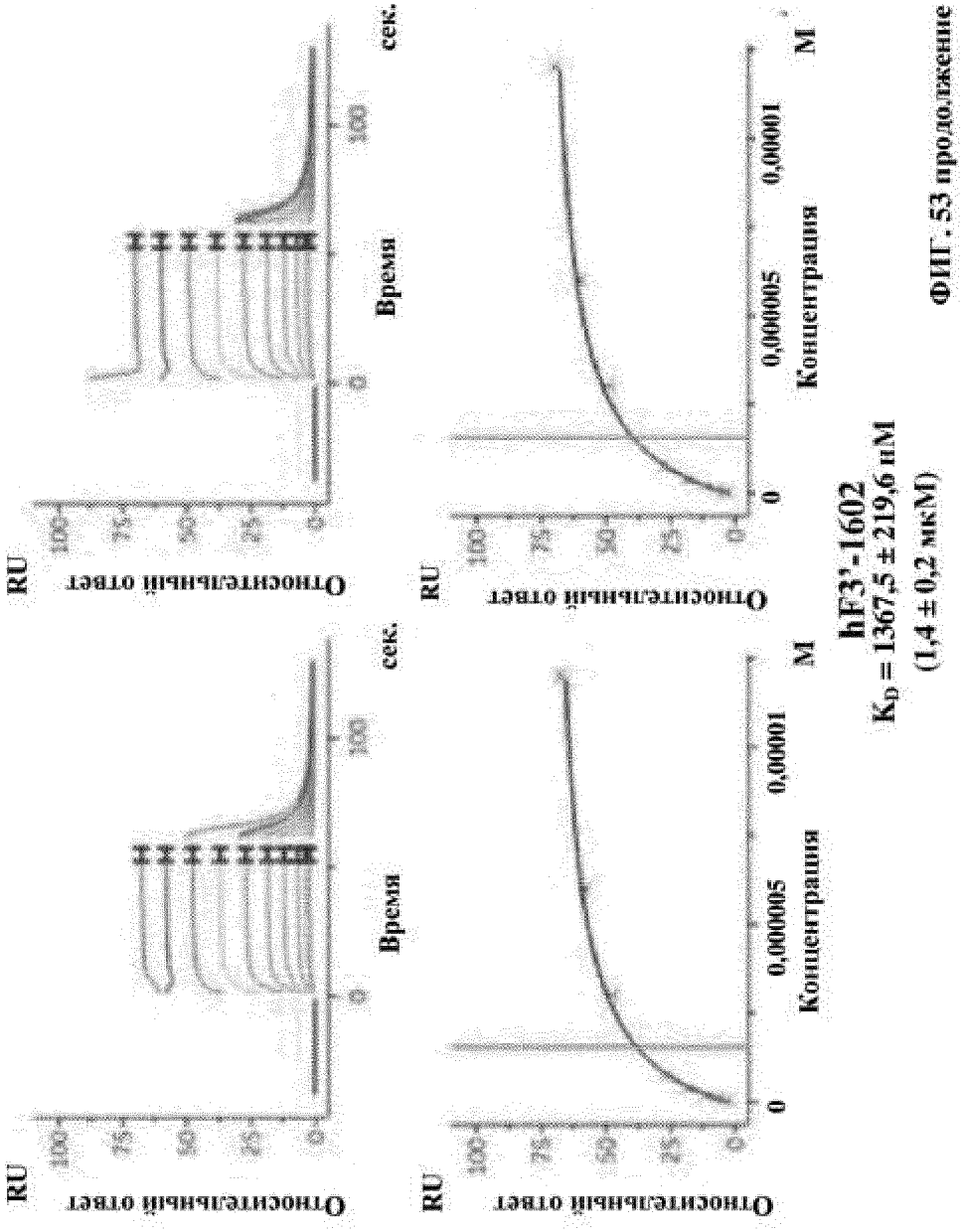

ФИГ. 52 продолжение



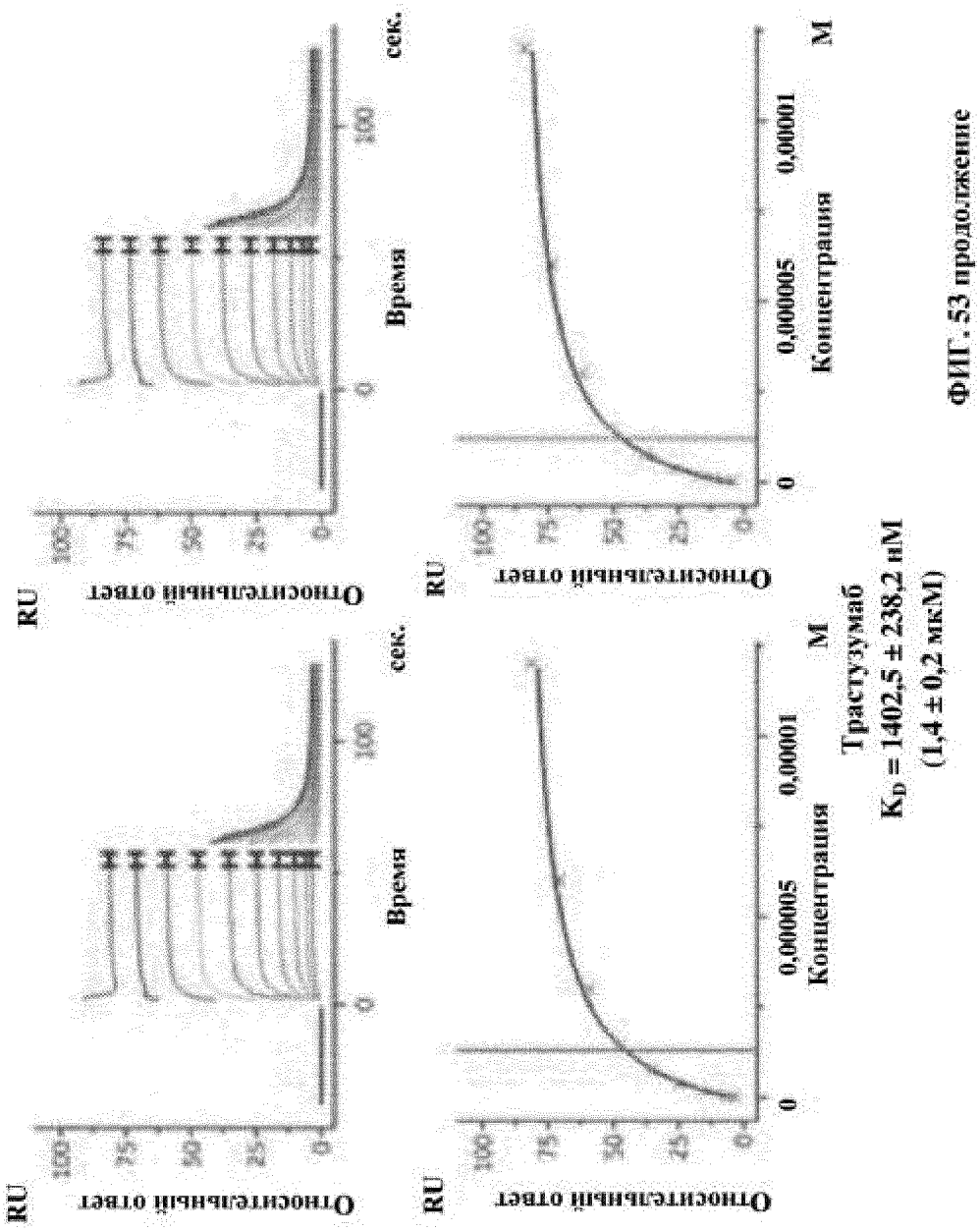

ФИГ. 52 продолжение


Относительный ответ
RU
100
75
50
25
0
Время
сек.
100
0
Концентрация
M
0,000005
0,00001
hF3'-1602
$K_D$ = 1367,5 ± 219,6 нМ
(1,4 ± 0,2 мкМ)

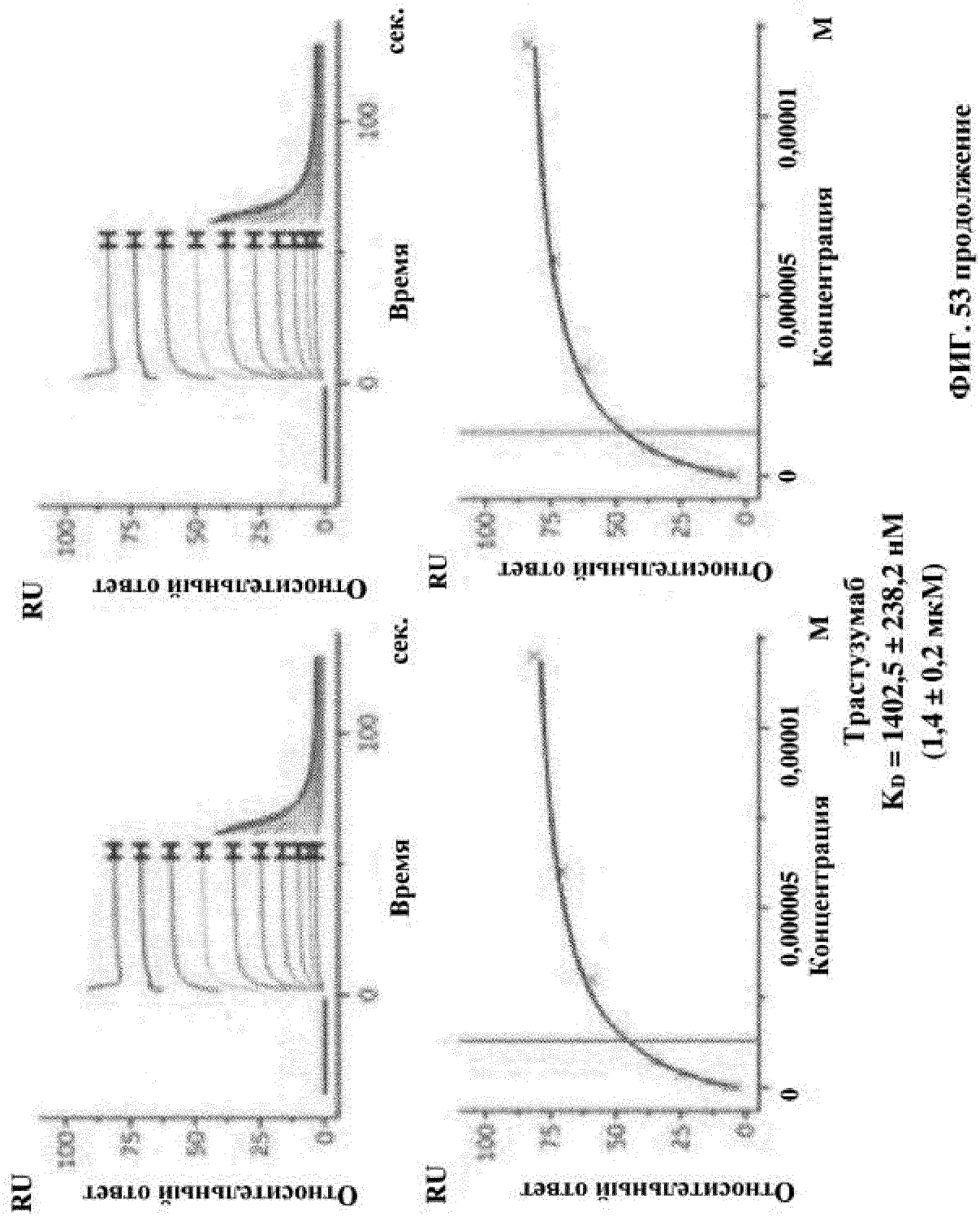
ФИГ. 53



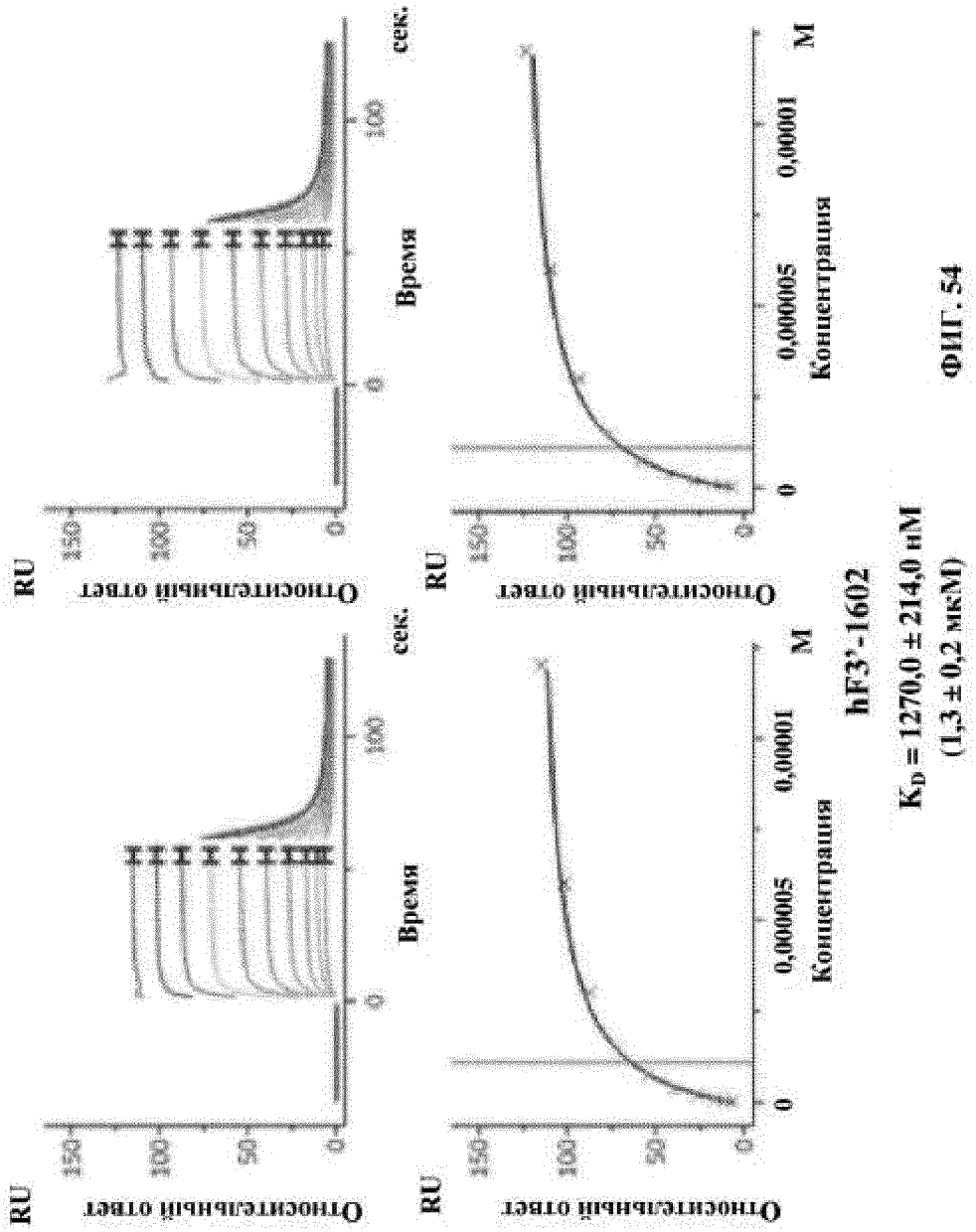

ФИГ. 53 продолжение



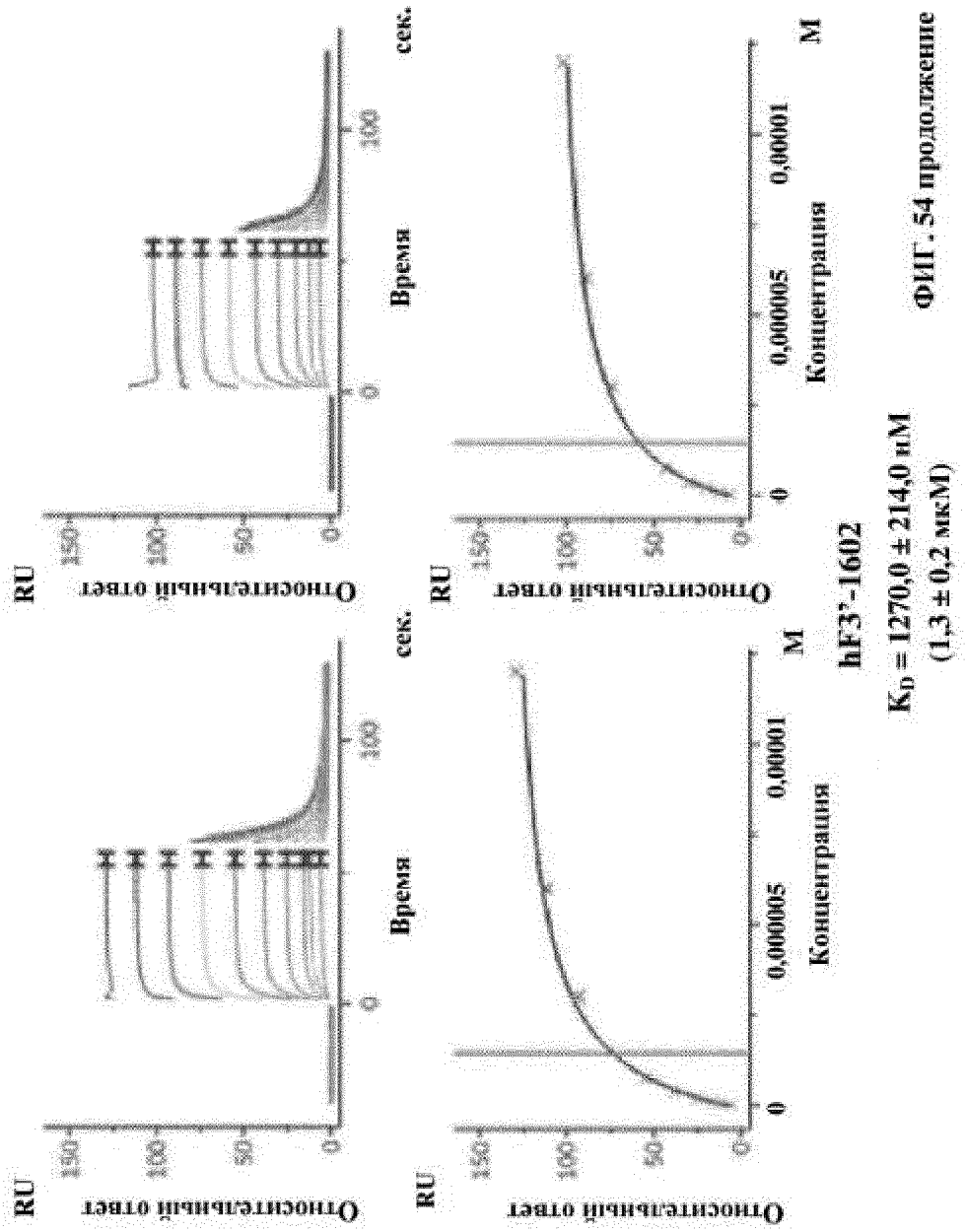

ФИГ. 53 продолжение



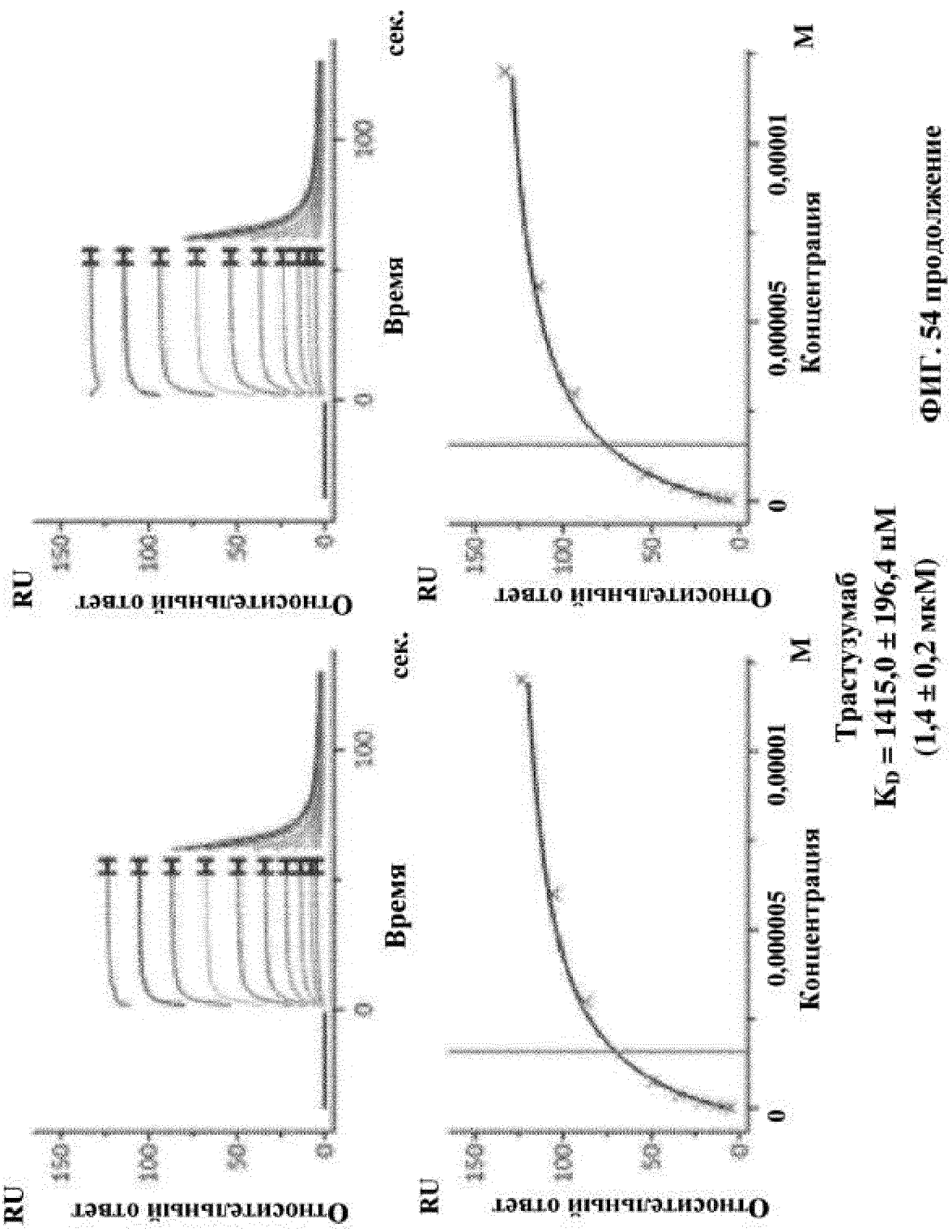

ФИГ. 53 продолжение


Относительный ответ
RU
150
100
50
0
Время
сек.
100
0
Концентрация
M
0,000005
0,00001
hF3'-1602
$K_D$ = 1270,0 ± 214,0 нМ
(1,3 ± 0,2 мкМ)

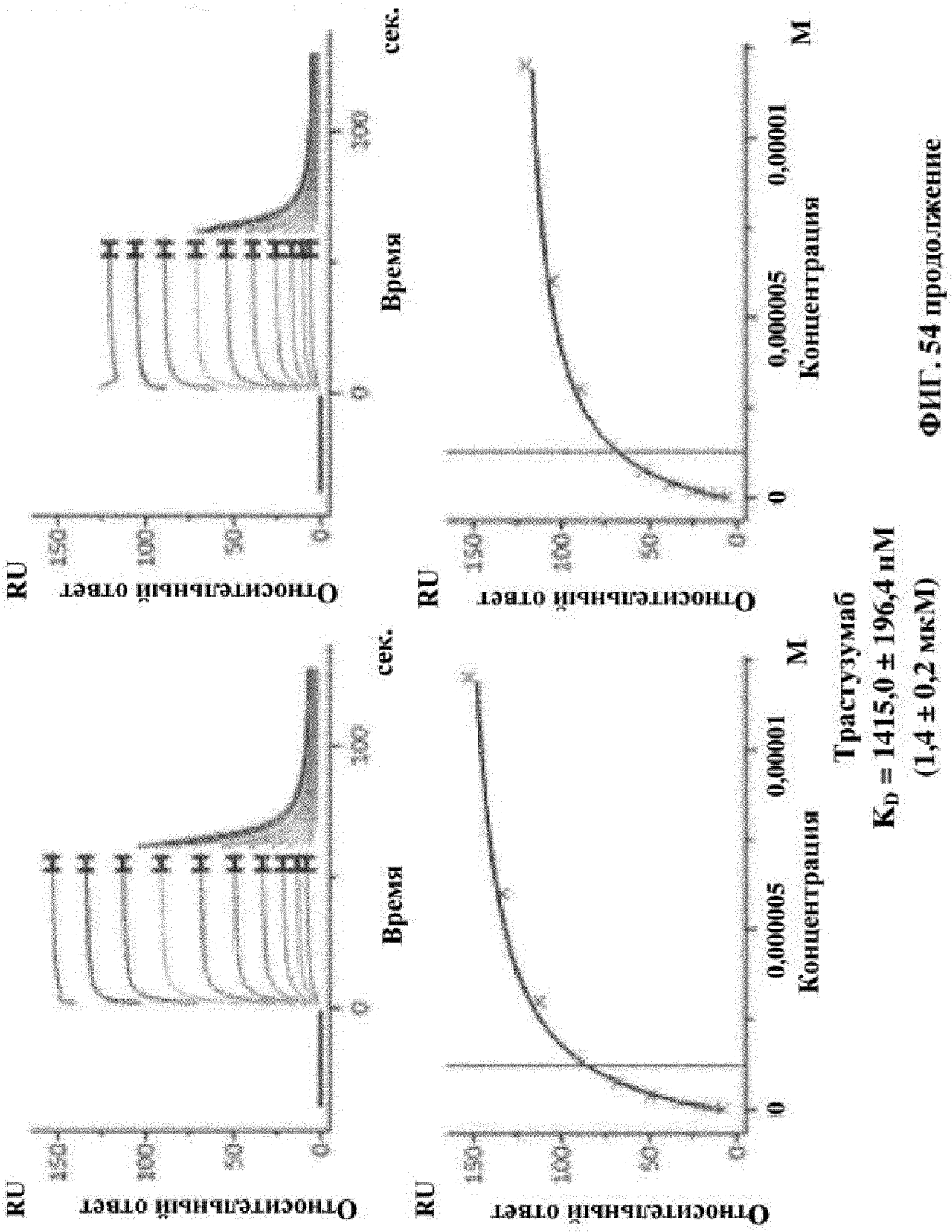
ФИГ. 54



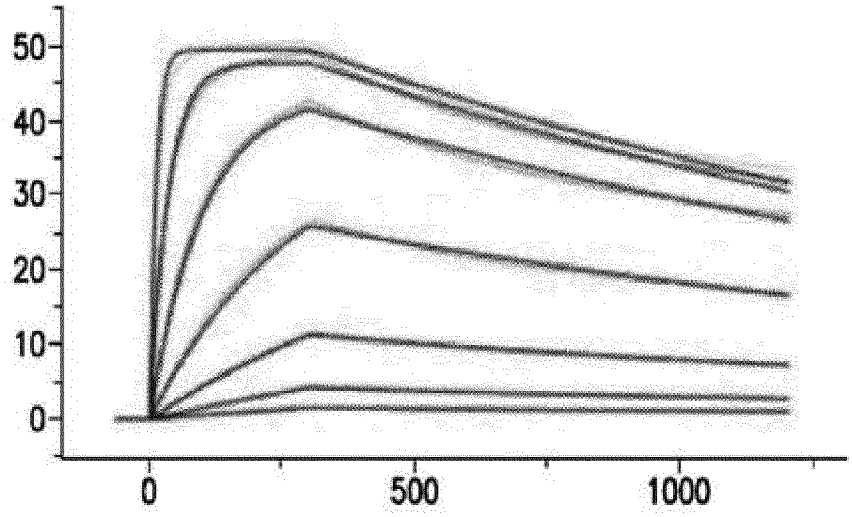

ФИГ. 54 продолжение



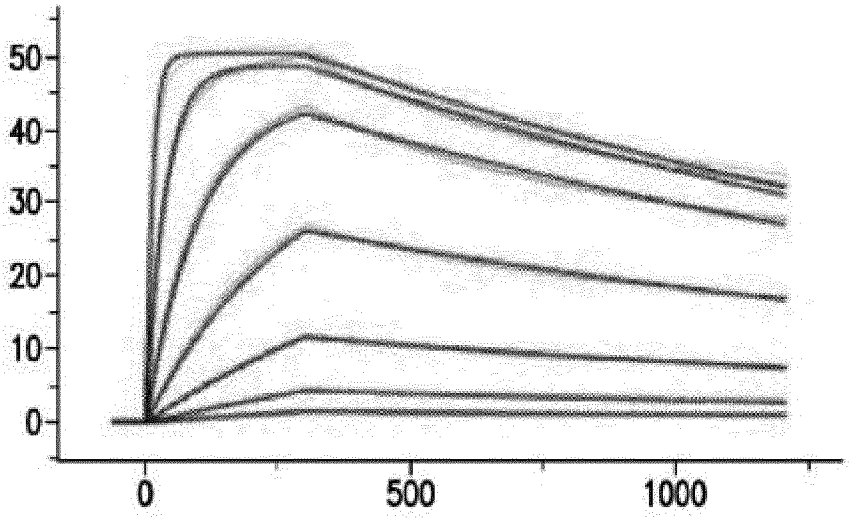

ФИГ. 54 продолжение




ФИГ. 54 продолжение

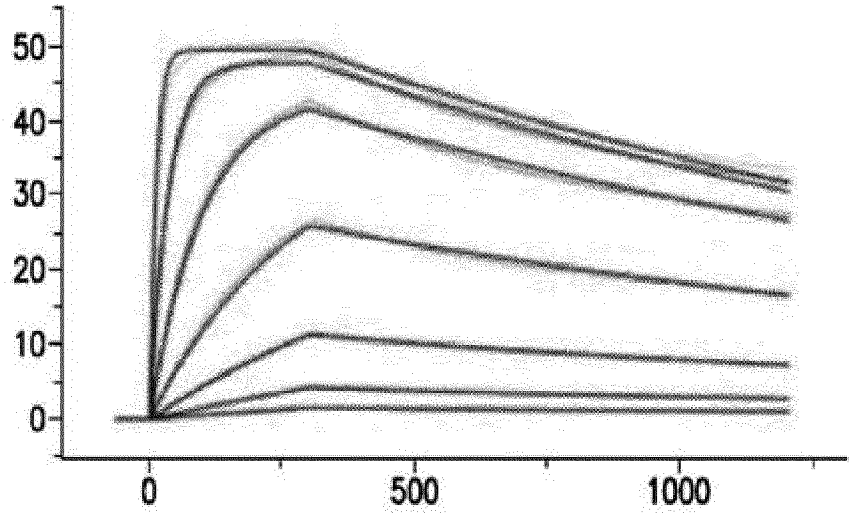



Группа 1
hCLEC12A-his; F3'1602; связывание 1:1

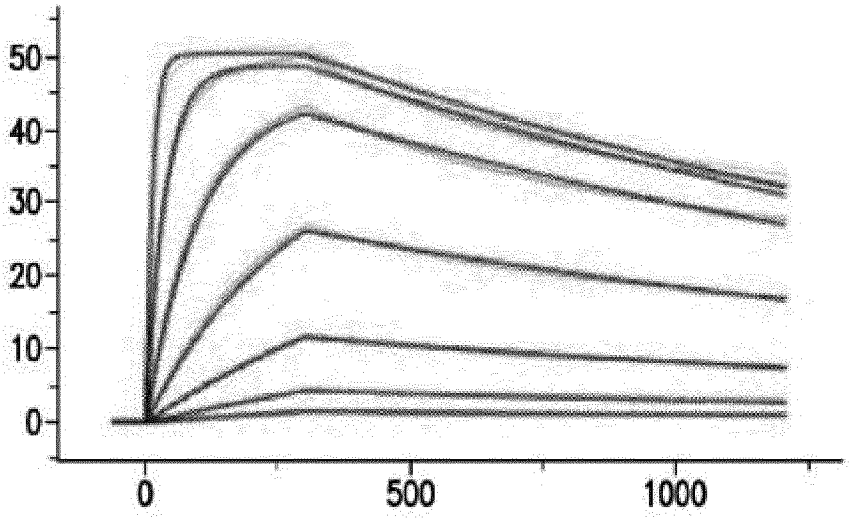



Группа 2
hCLEC12A-his; F3'1602; связывание 1:1

ФИГ. 55

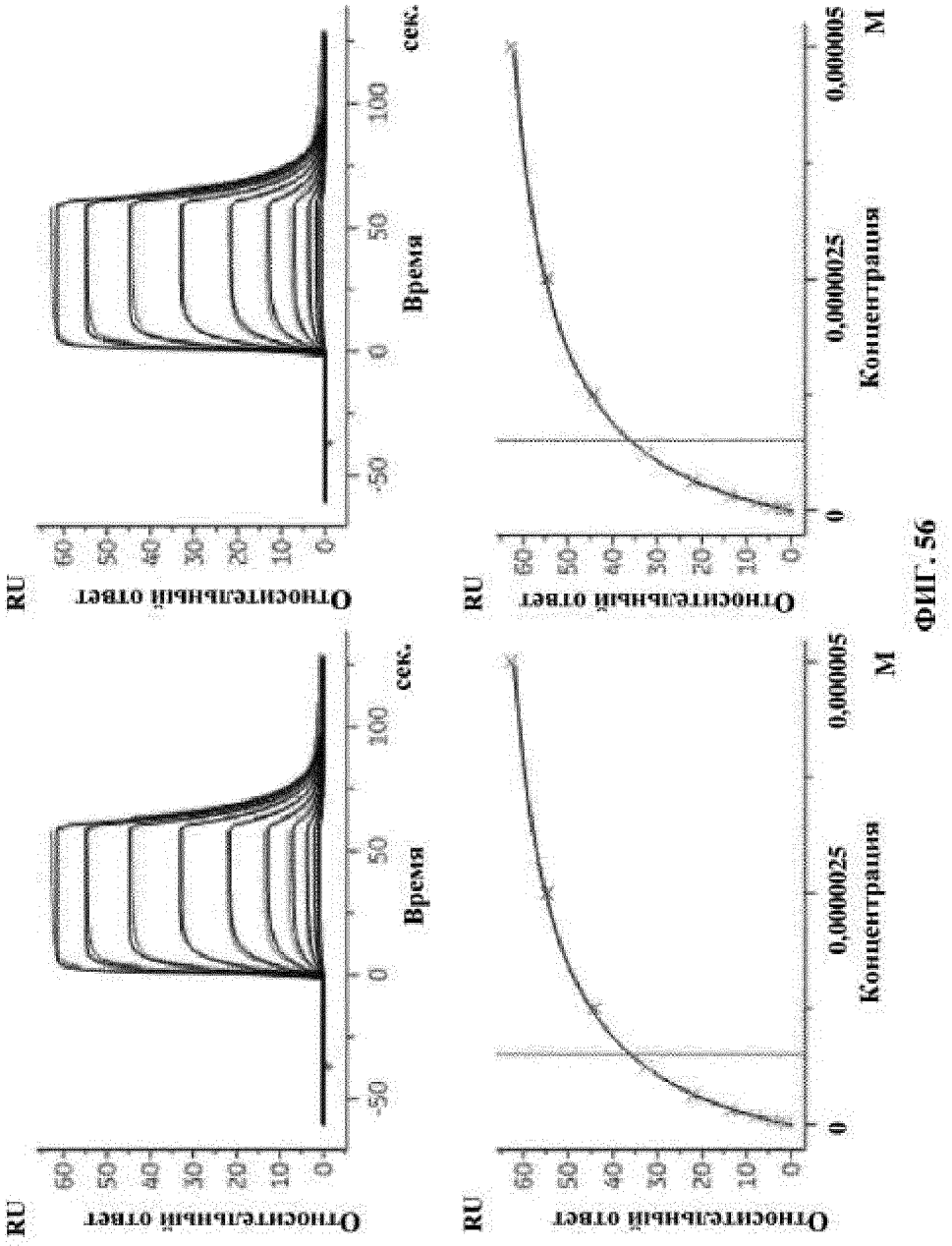



Группа 1
hCLEC12A-his; F3'1602; связывание 1:1

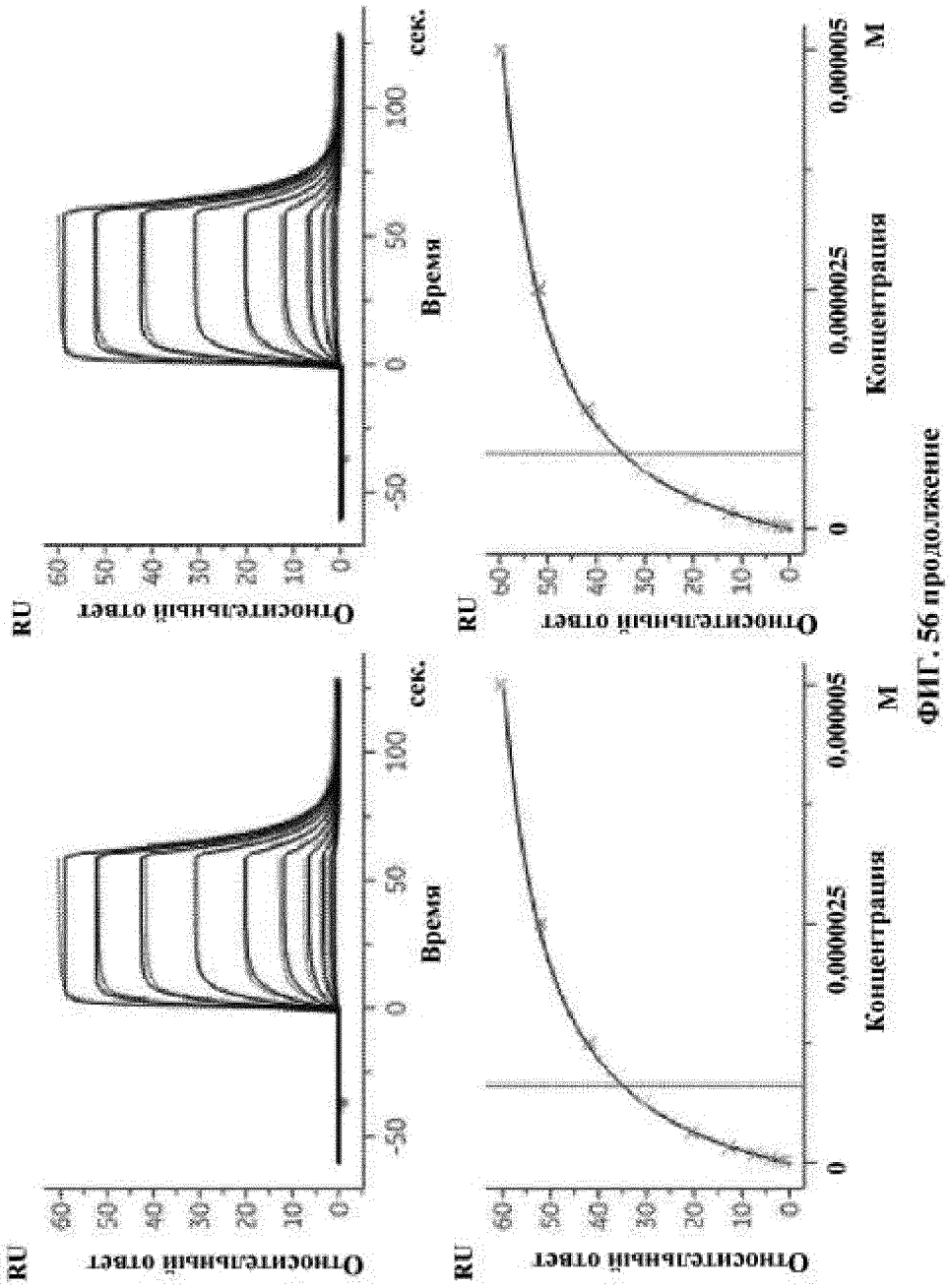



Группа 2
hCLEC12A-his; F3'1602; связывание 1:1

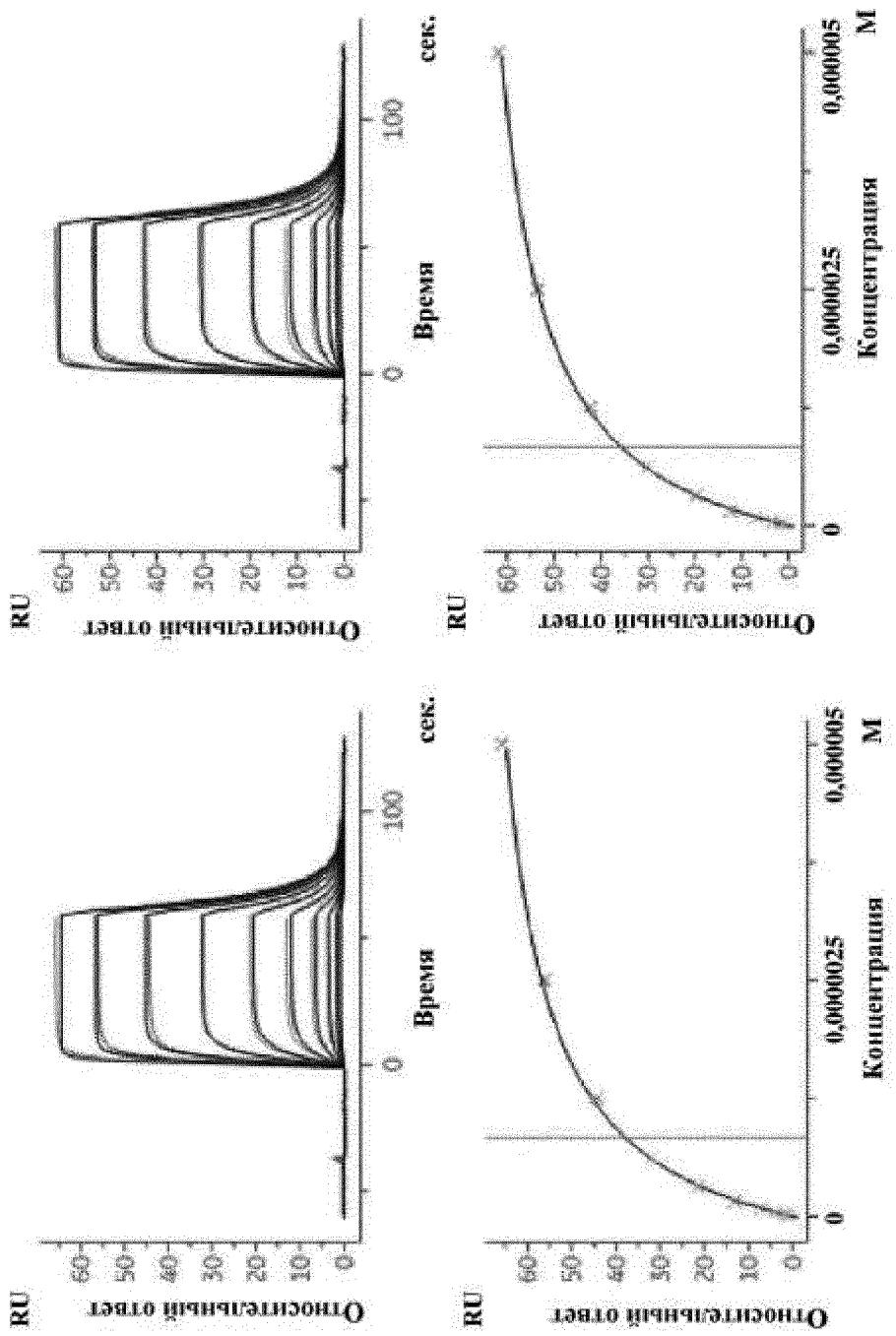
ФИГ. 55


RU
Относительный ответ
60
50
40
30
20
10
0
-50
0
50
100
Время
сек.
0
0,0000025
0,000005
Концентрация
M

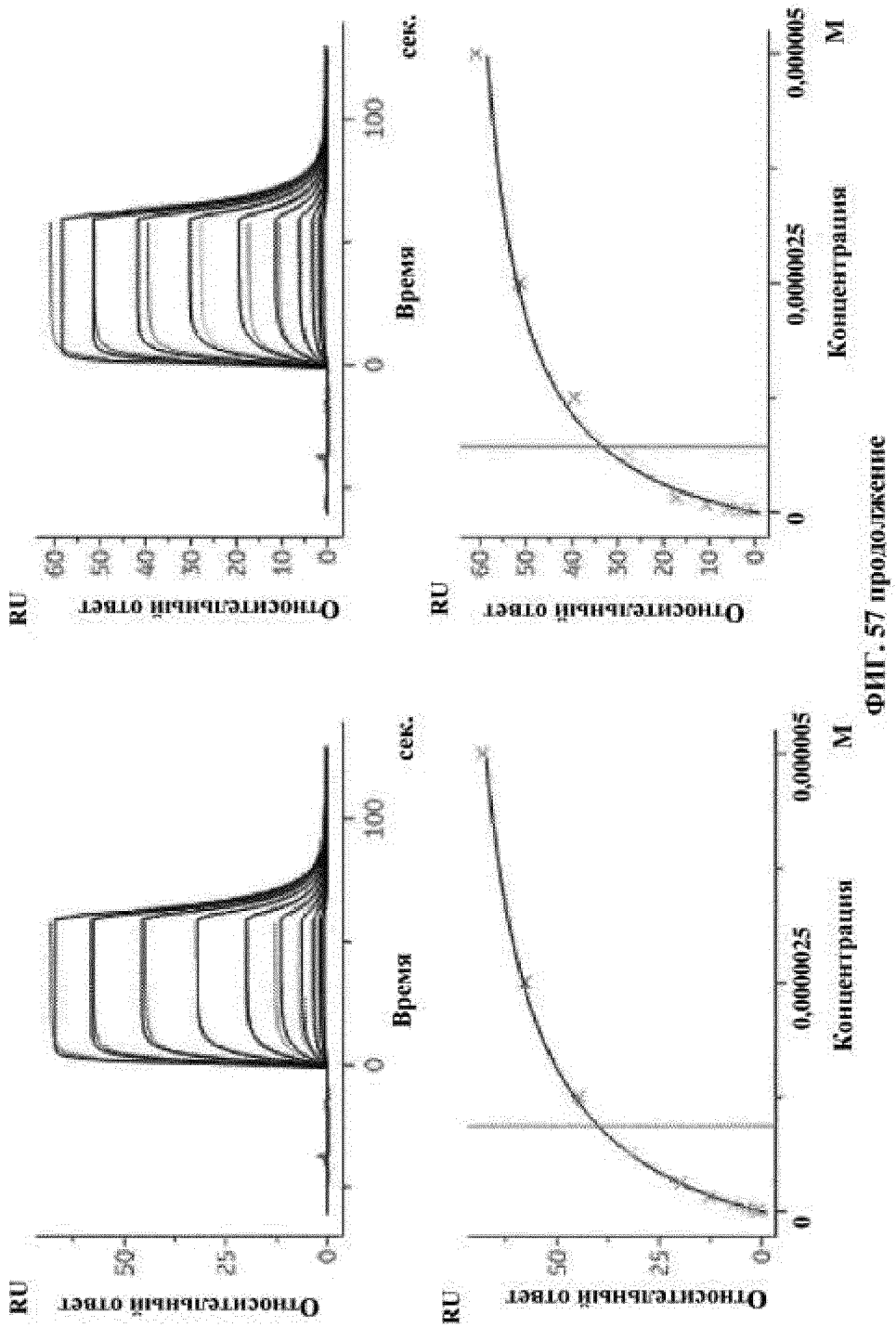
ФИГ. 56



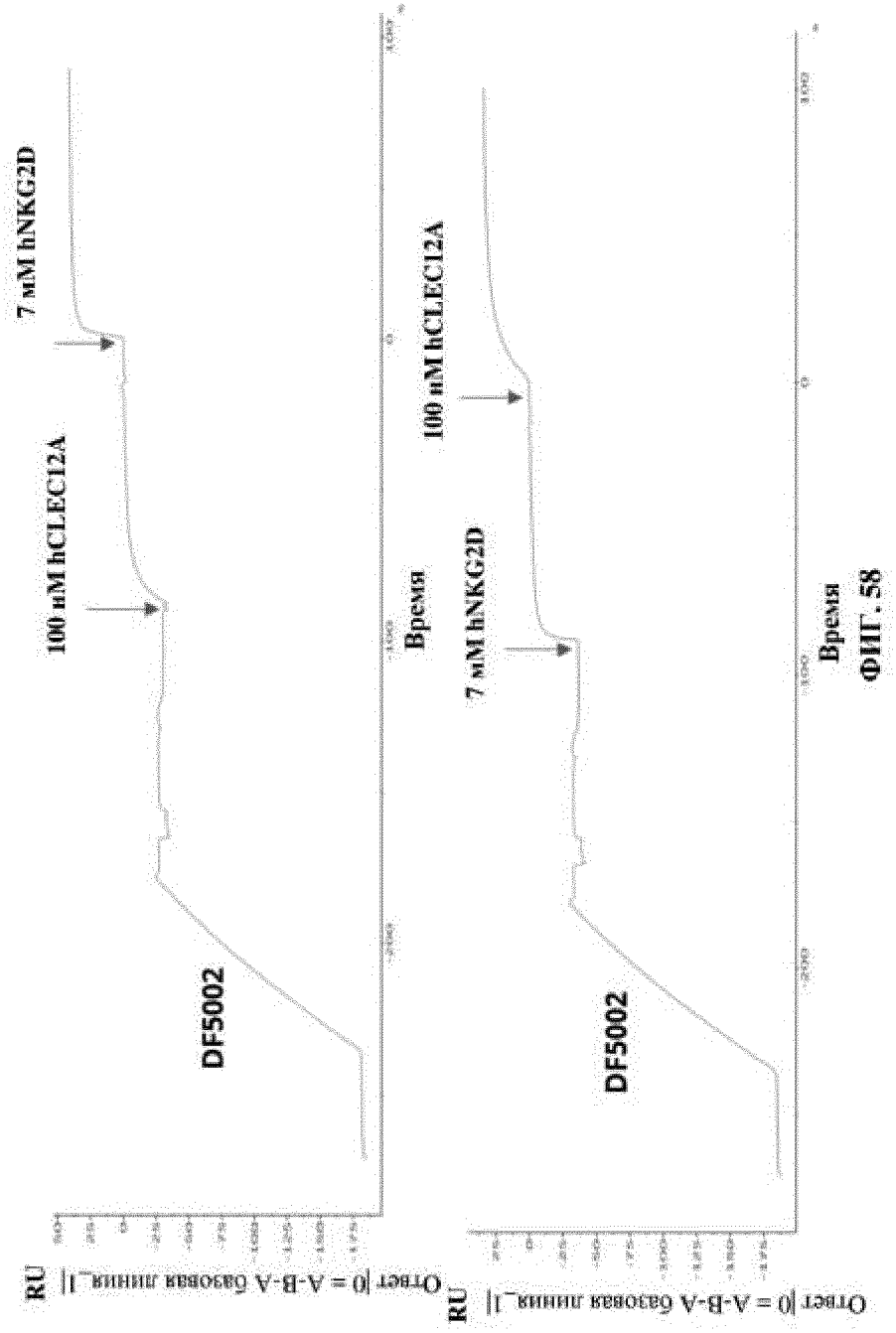

ФИГ. 56 продолжение


RU
Относительный ответ
60
50
40
30
20
10
0
0
100
Время
сек.
RU
Относительный ответ
60
50
40
30
20
10
0
0
0,0000025
0,000005
Концентрация
M

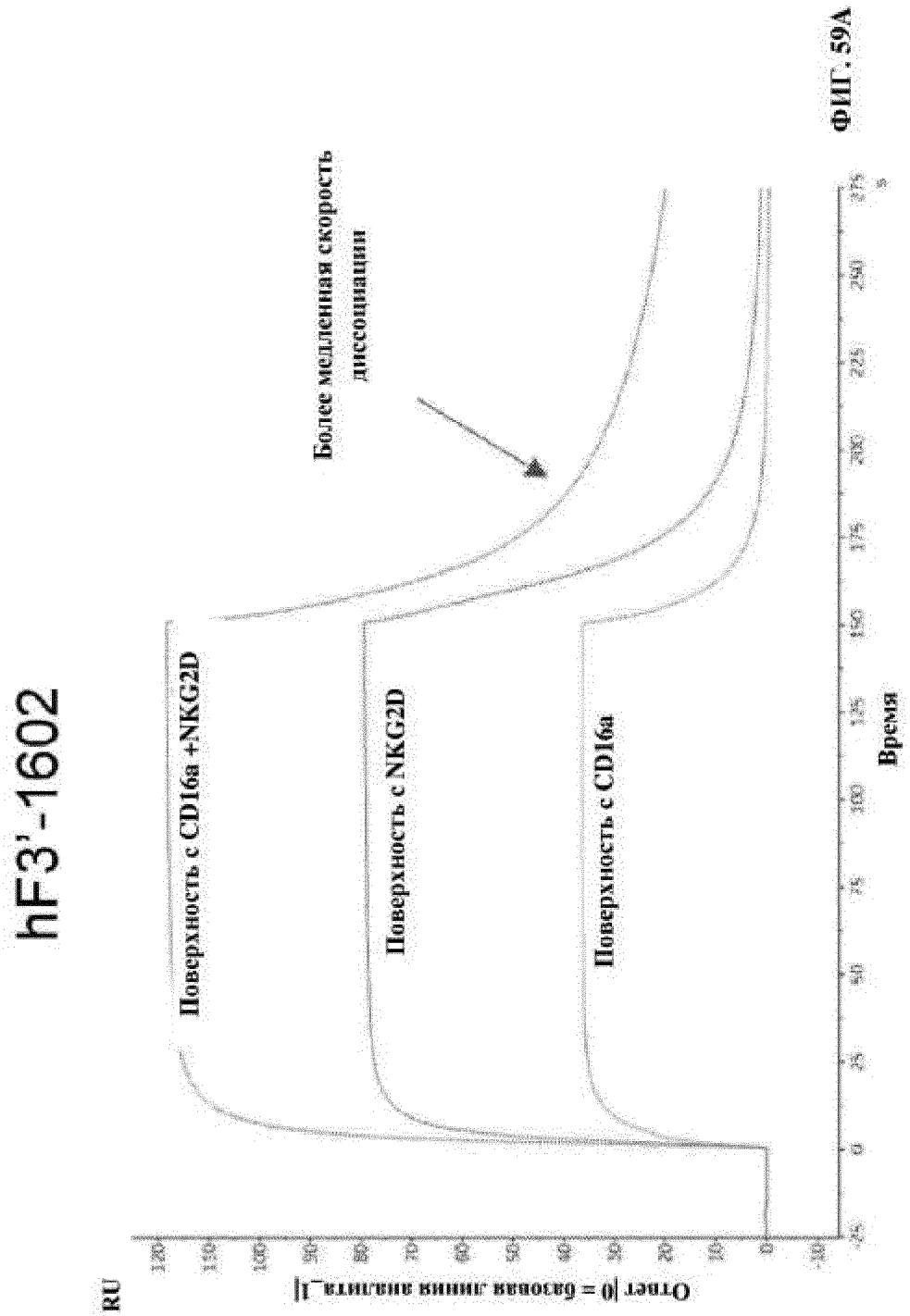
ФИГ. 57



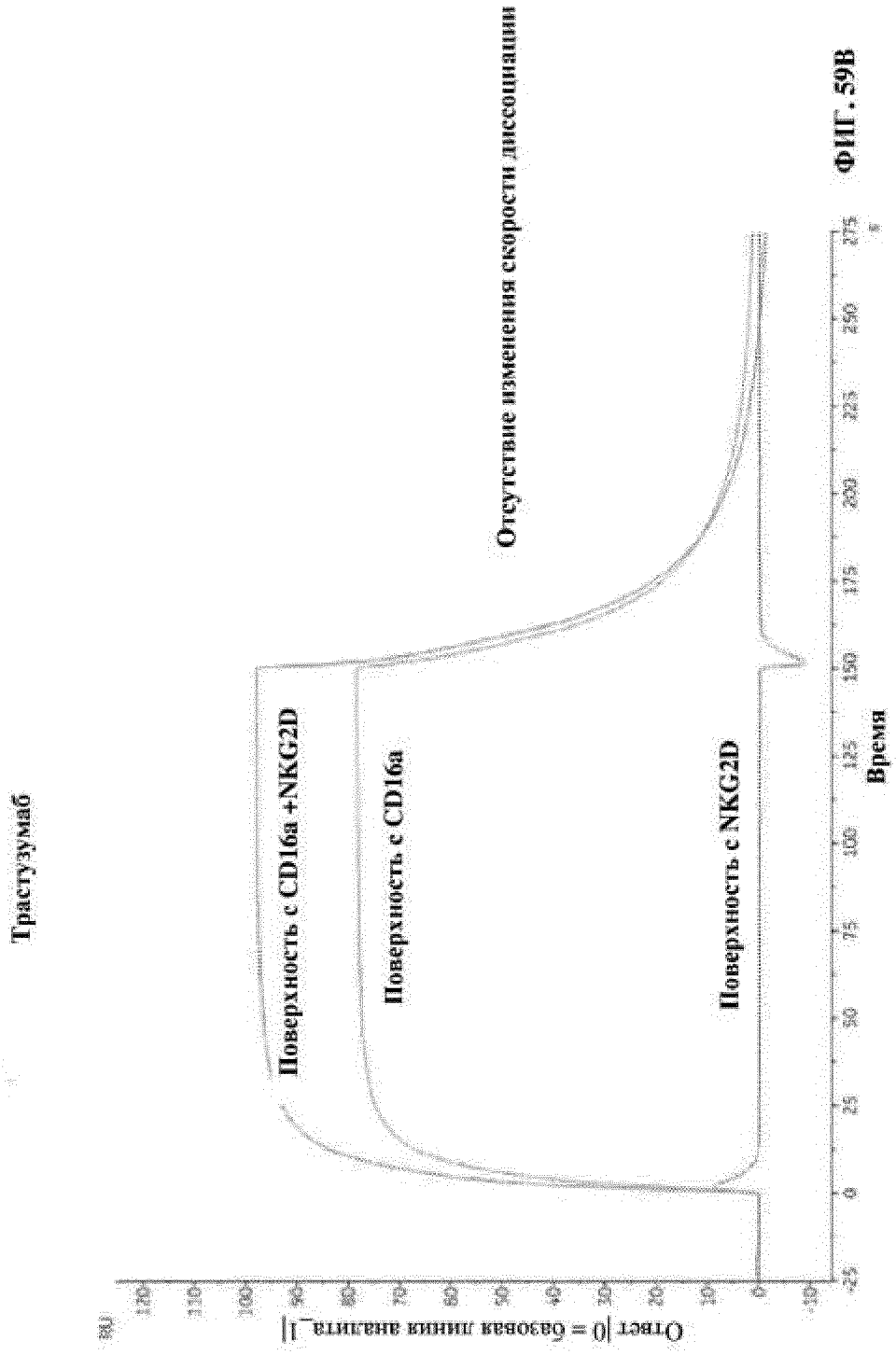

ФИГ. 57 продолжение


7 мМ hNKG2D
100 нМ hCLEC12A
DF5002
Время
RU
Ответ [0 = A-B-A базовая линия_1]
100 нМ hCLEC12A
7 мМ hNKG2D
DF5002
Время
RU
Ответ [0 = A-B-A базовая линия_1]

ФИГ. 58

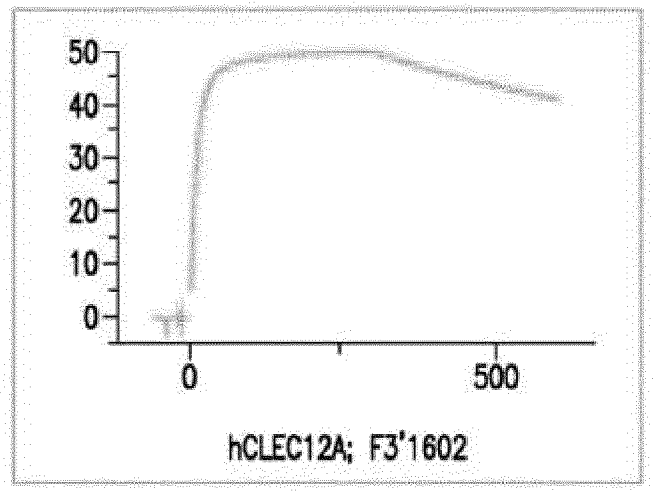

hF3'-1602
Более медленная скорость диссоциации
Поверхность с CD16a +NKG2D
Поверхность с NKG2D
Поверхность с CD16a
RU
Время
Ответ [0 = базовая линия анализа_1]

ФИГ. 59А


Трастузумаб
Поверхность с CD16a +NKG2D
Поверхность с CD16a
Поверхность с NKG2D
Отсутствие изменения скорости диссоциации
Ответ [0 = базовая линия значения_1]
Время

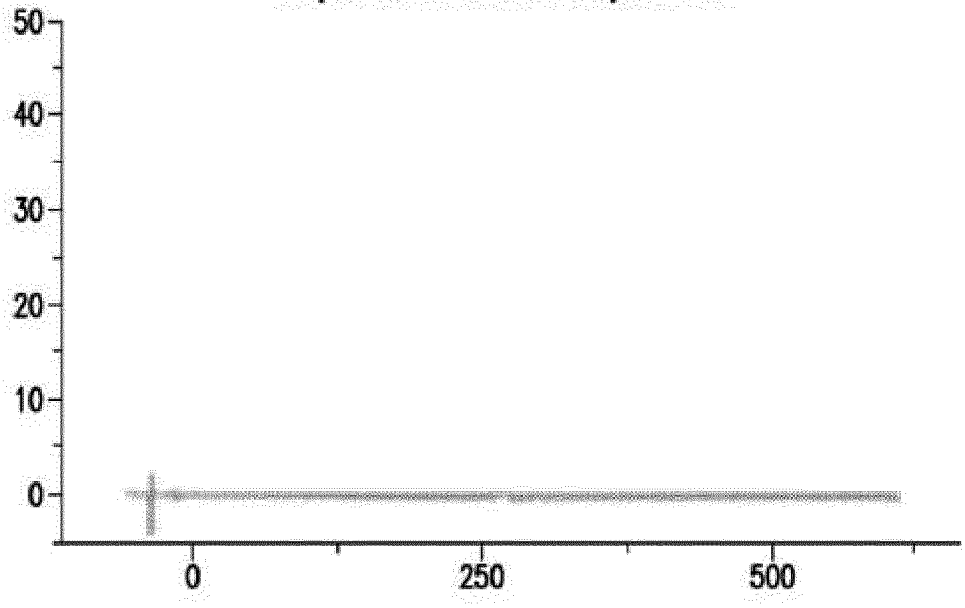
ФИГ. 59В

hCLEC12A при 100 нМ

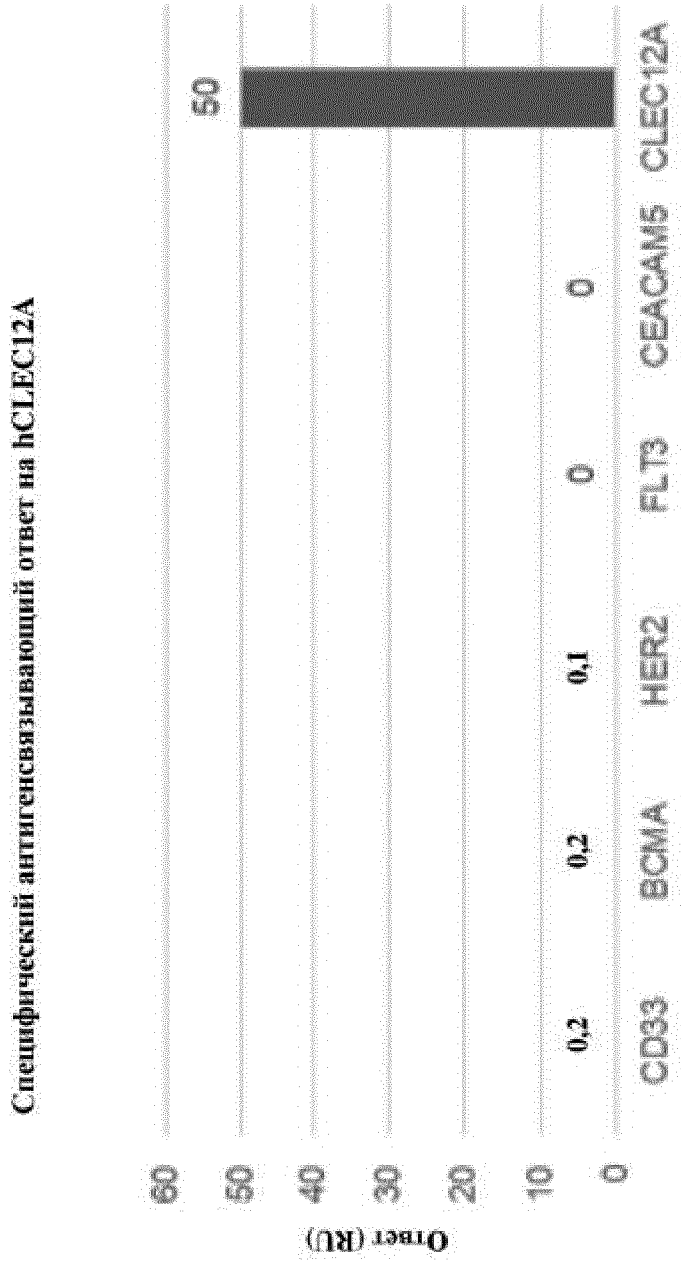



ФИГ. 60A

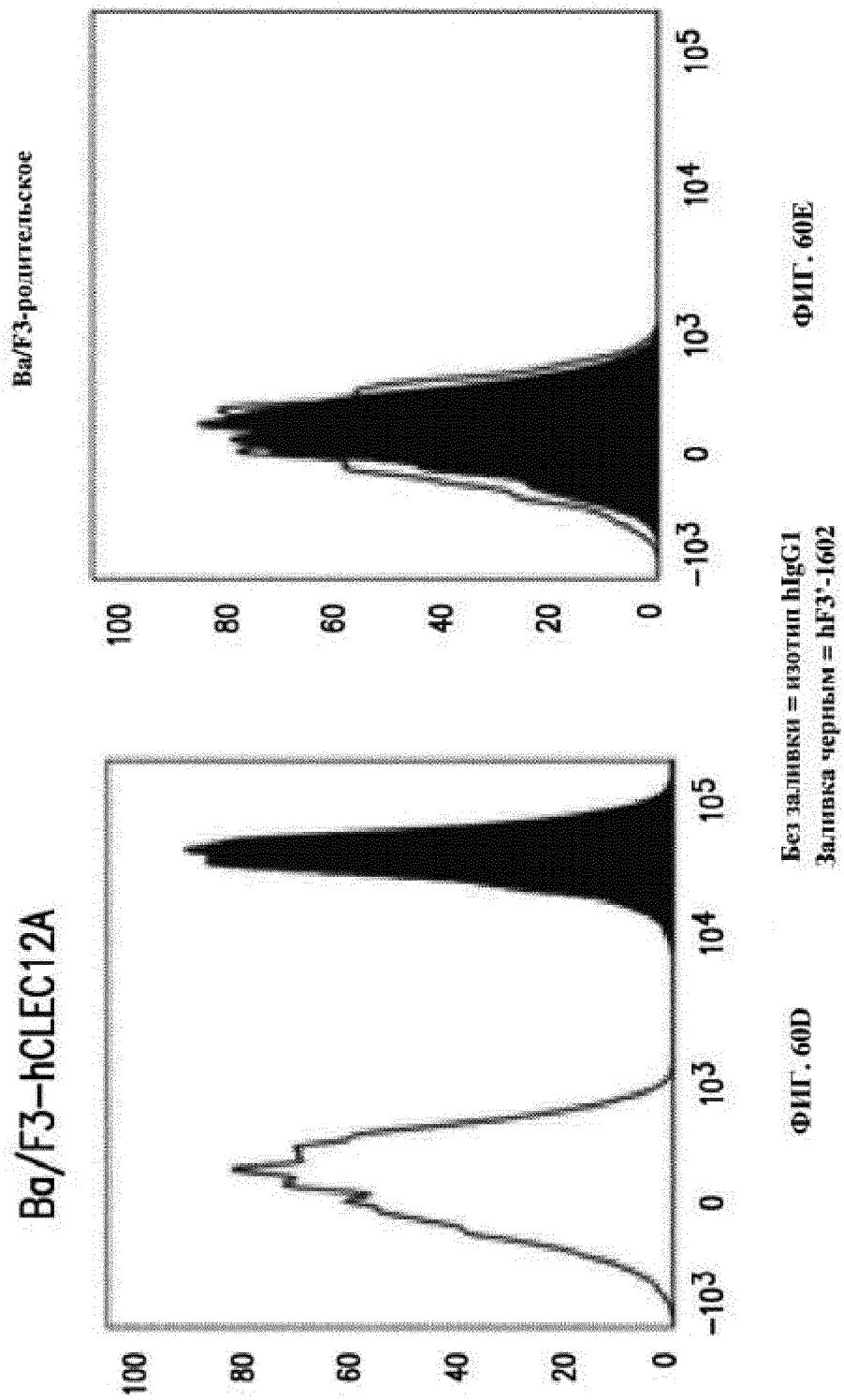
Неродственная мишень при 500 нМ




ФИГ. 60B

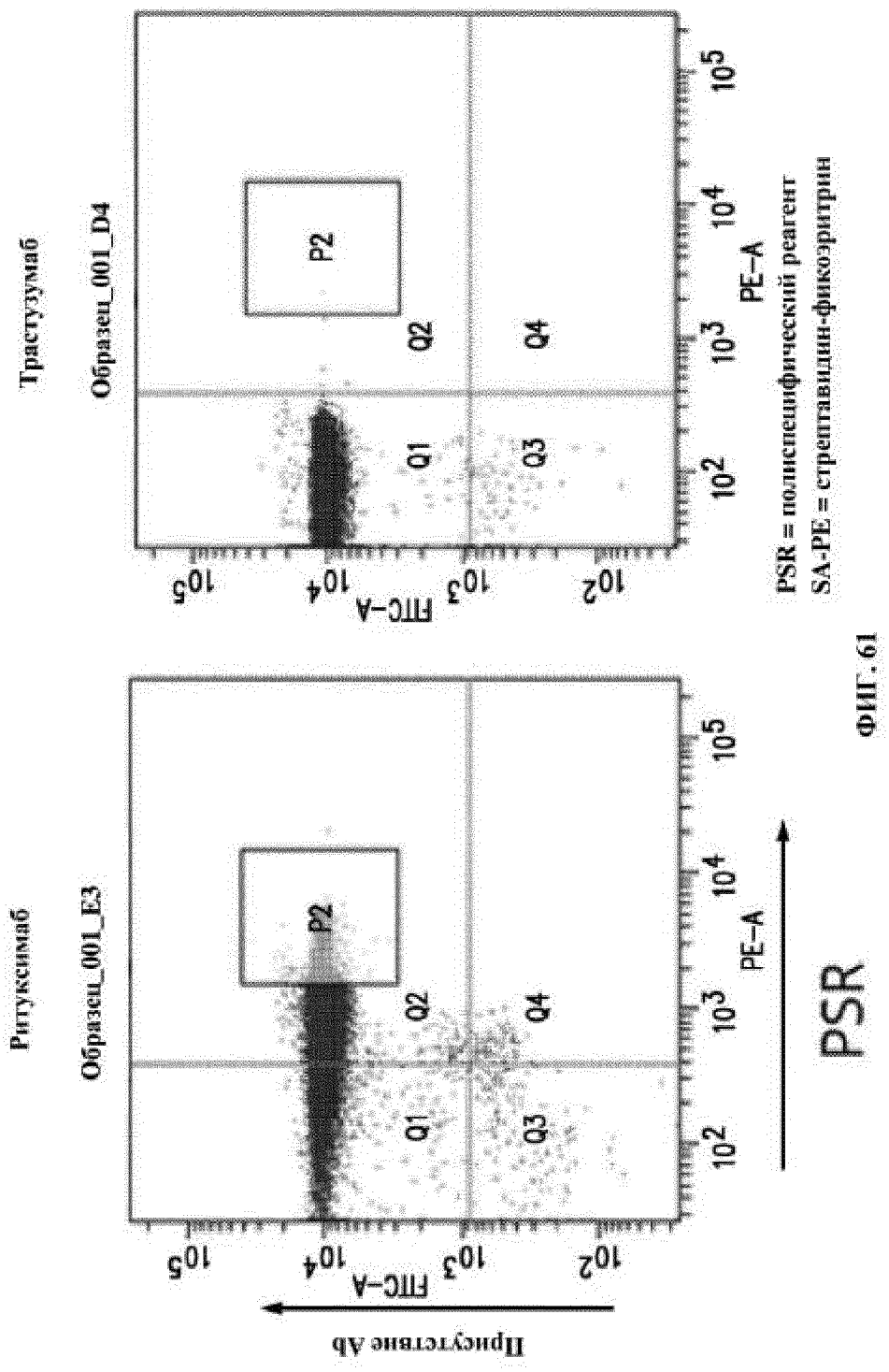

Специфический антигенсвязывающий ответ на hCLEC12A
Ответ (RU)
60
50
40
30
20
10
0
CD33
BCMA
HER2
FLT3
CEACAM5
CLEC12A
0,2
0,2
0,1
0
0
50
Антиген

ФИГ. 60C

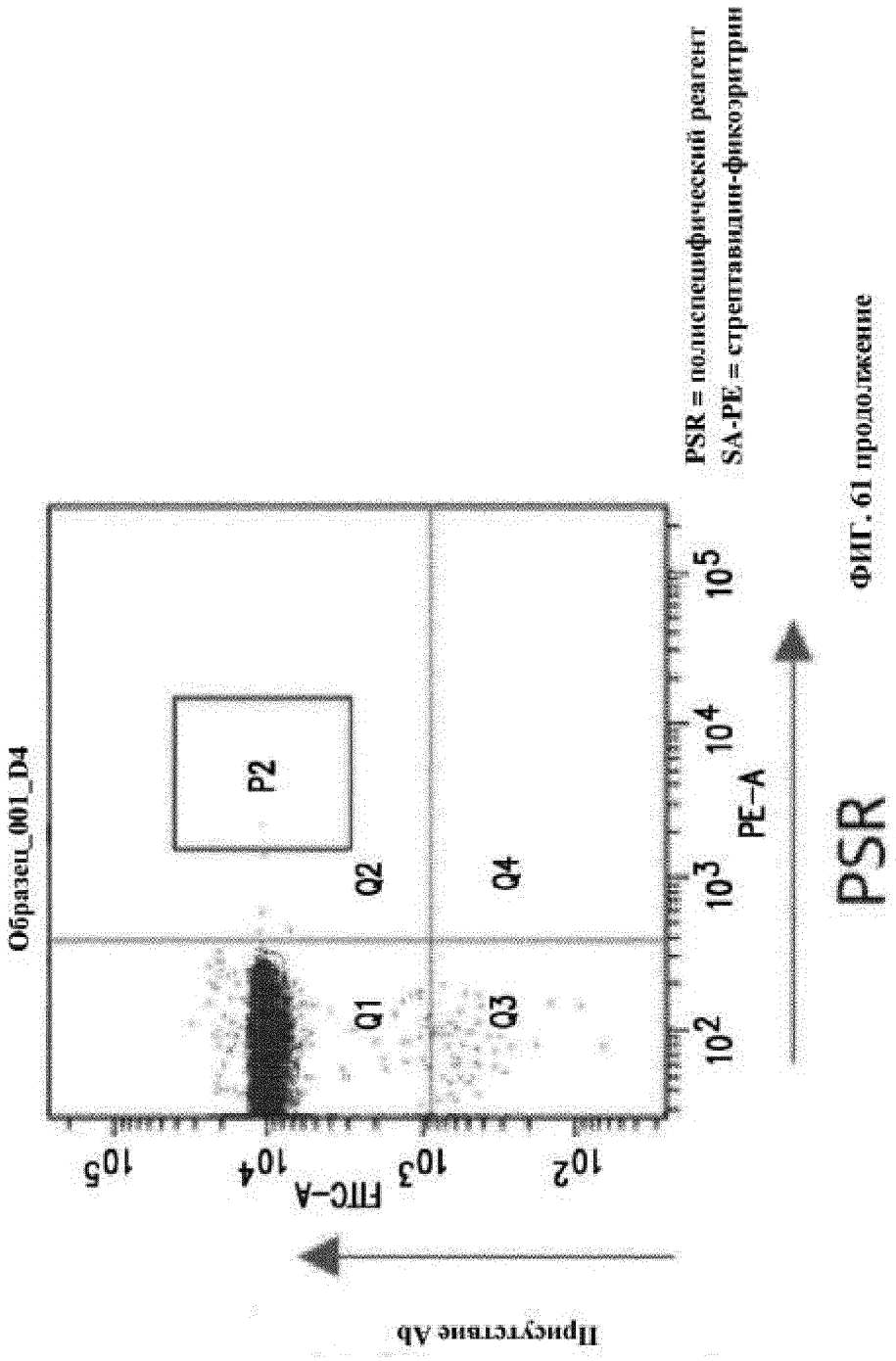



ФИГ. 60E

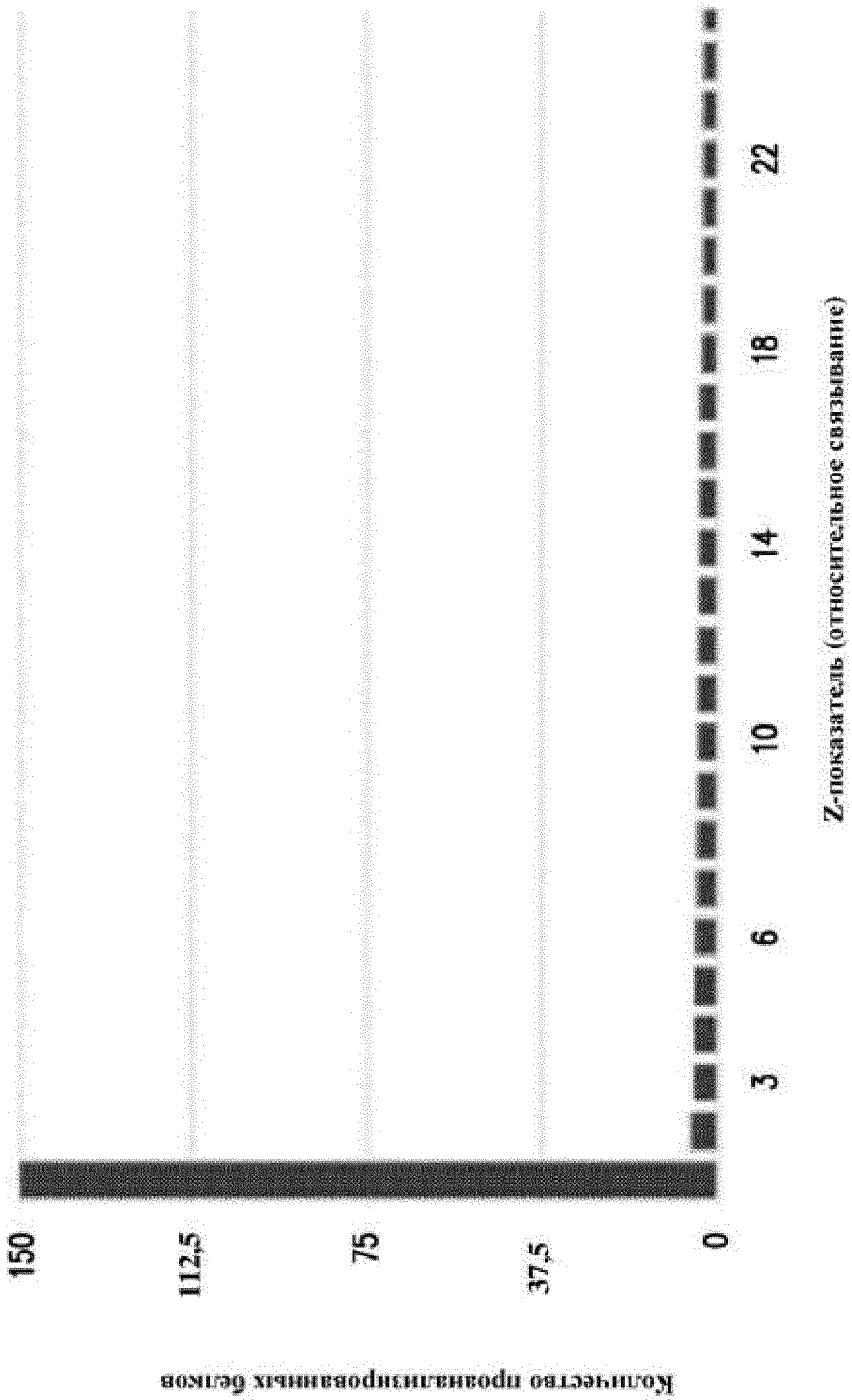
ФИГ. 60D


Трастузумаб
Образец_001_D4
P2
Q1
Q2
Q3
Q4
FITC-A
PE-A
PSR = полиспецифический реагент
SA-PE = стрептавидин-фикоэритрин
Ритуксимаб
Образец_001_E3
Пресутевие Ab
PSR

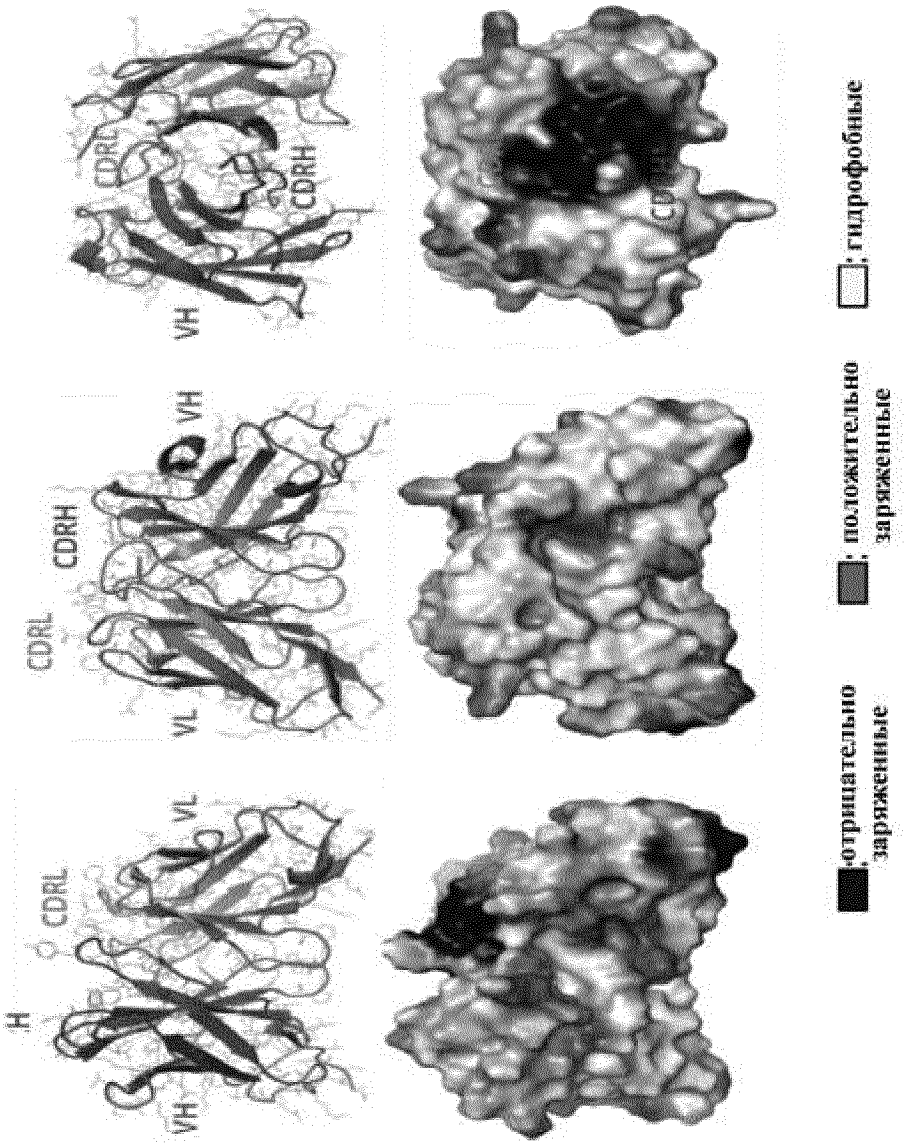
ФИГ. 61



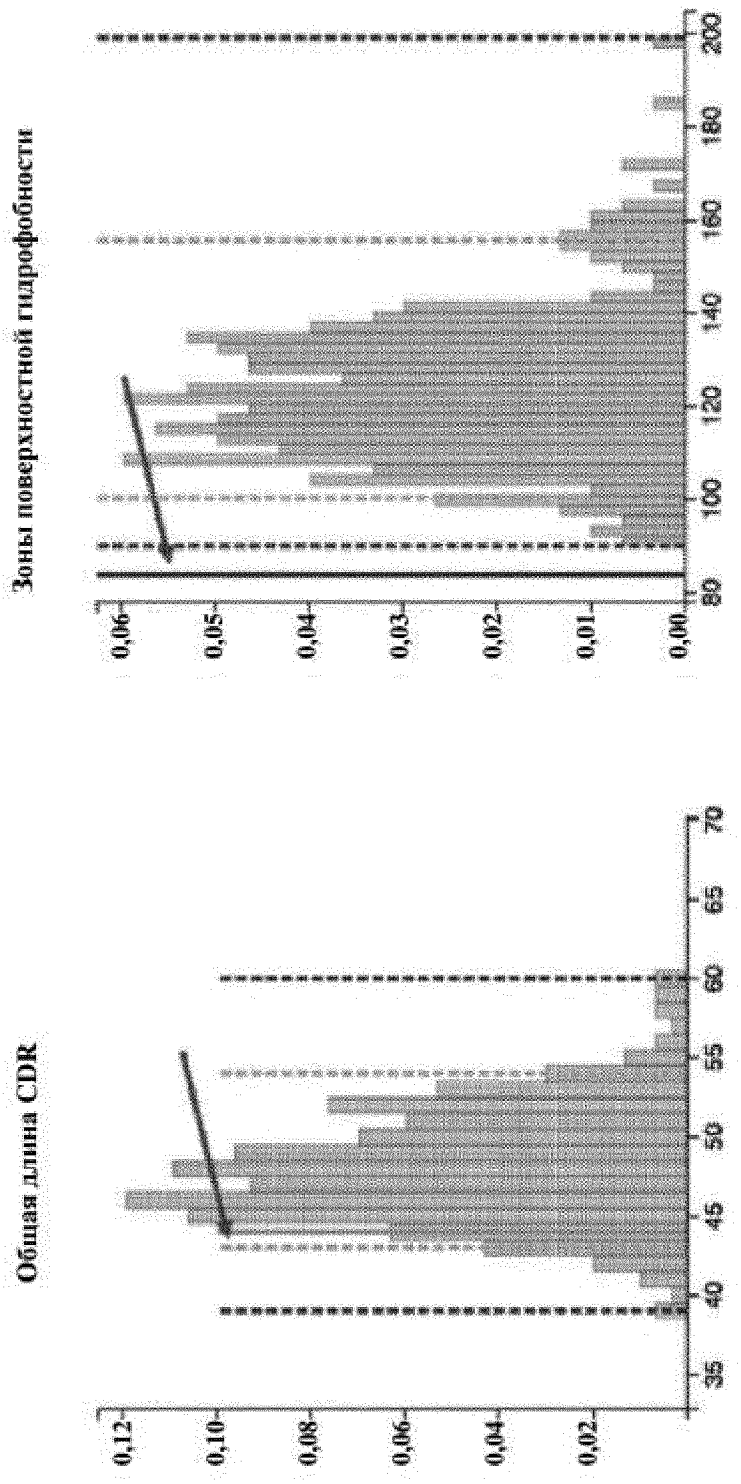

ФИГ. 61 продолжение


Количество праймированных белков
150
112,5
75
37,5
0
3
6
10
14
18
22
Z-показатель (относительное связывание)

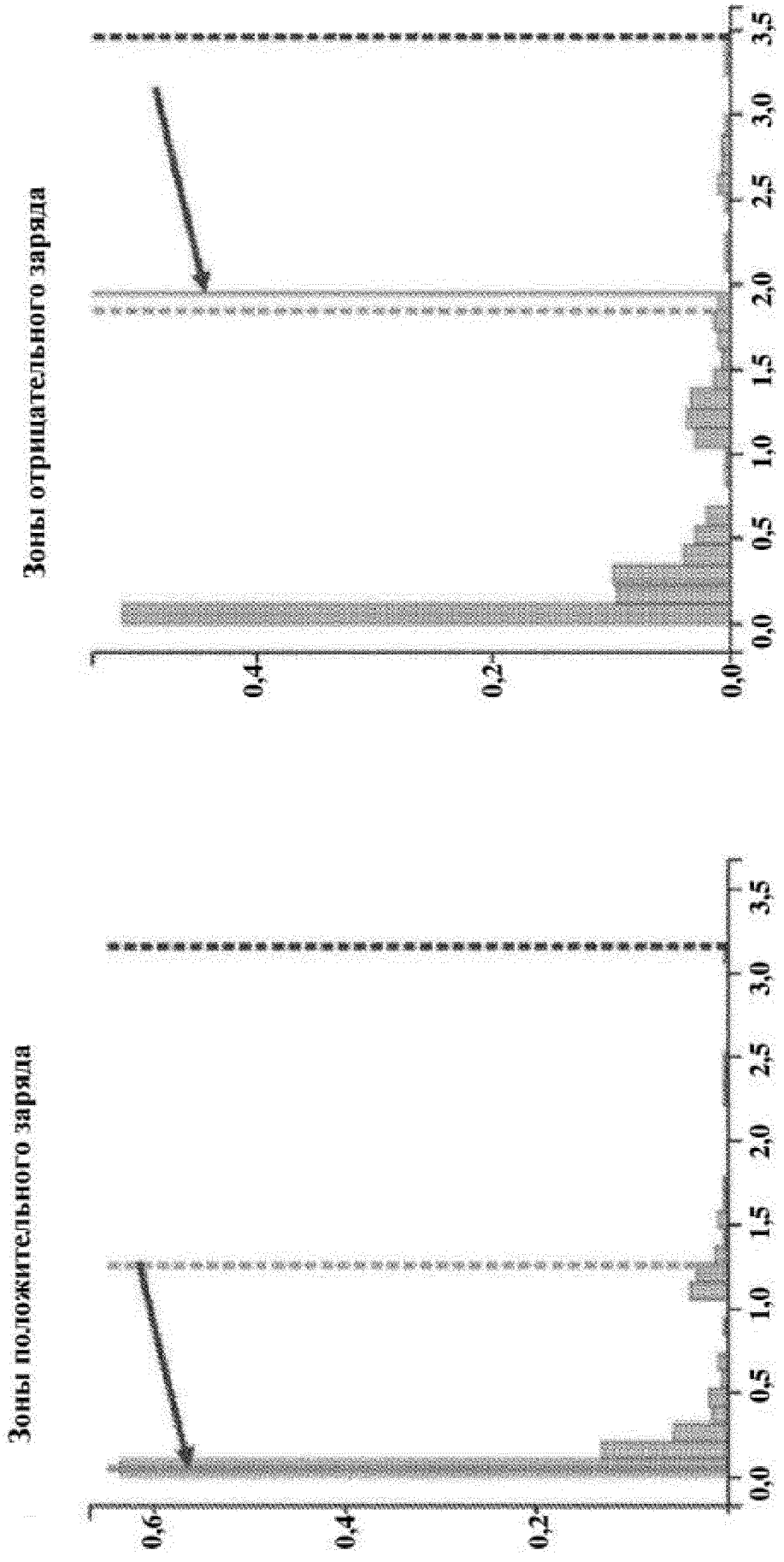
ФИГ. 62


CDRL
CDRH
VH
VL
; отрицательно заряженные
; положительно заряженные
; гидрофобные

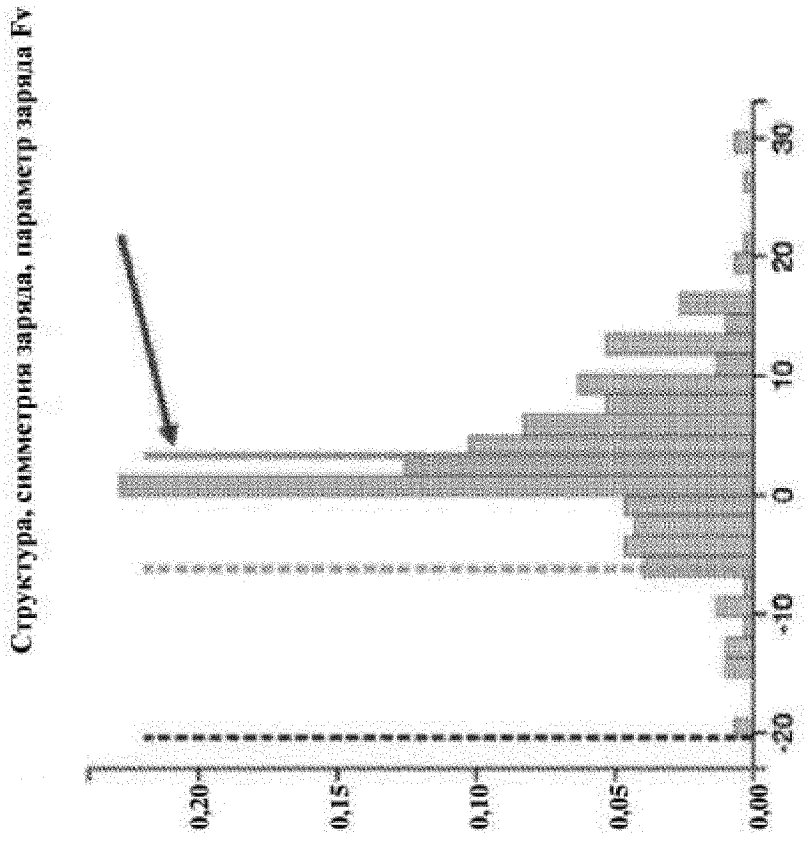
ФИГ. 63


Зоны поверхностной гидрофобности
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
80
100
120
140
160
180
200
Общая длина CDR
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
35
40
45
50
55
60
65
70

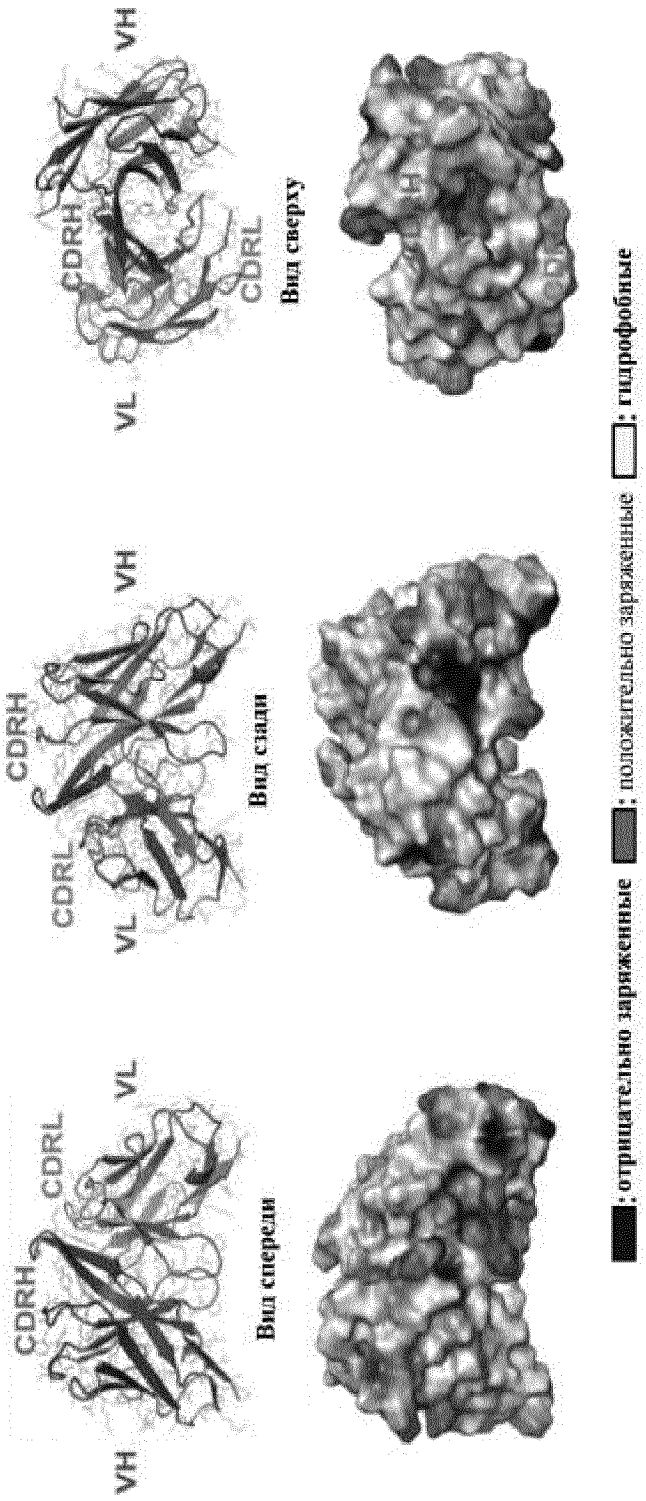
ФИГ. 64



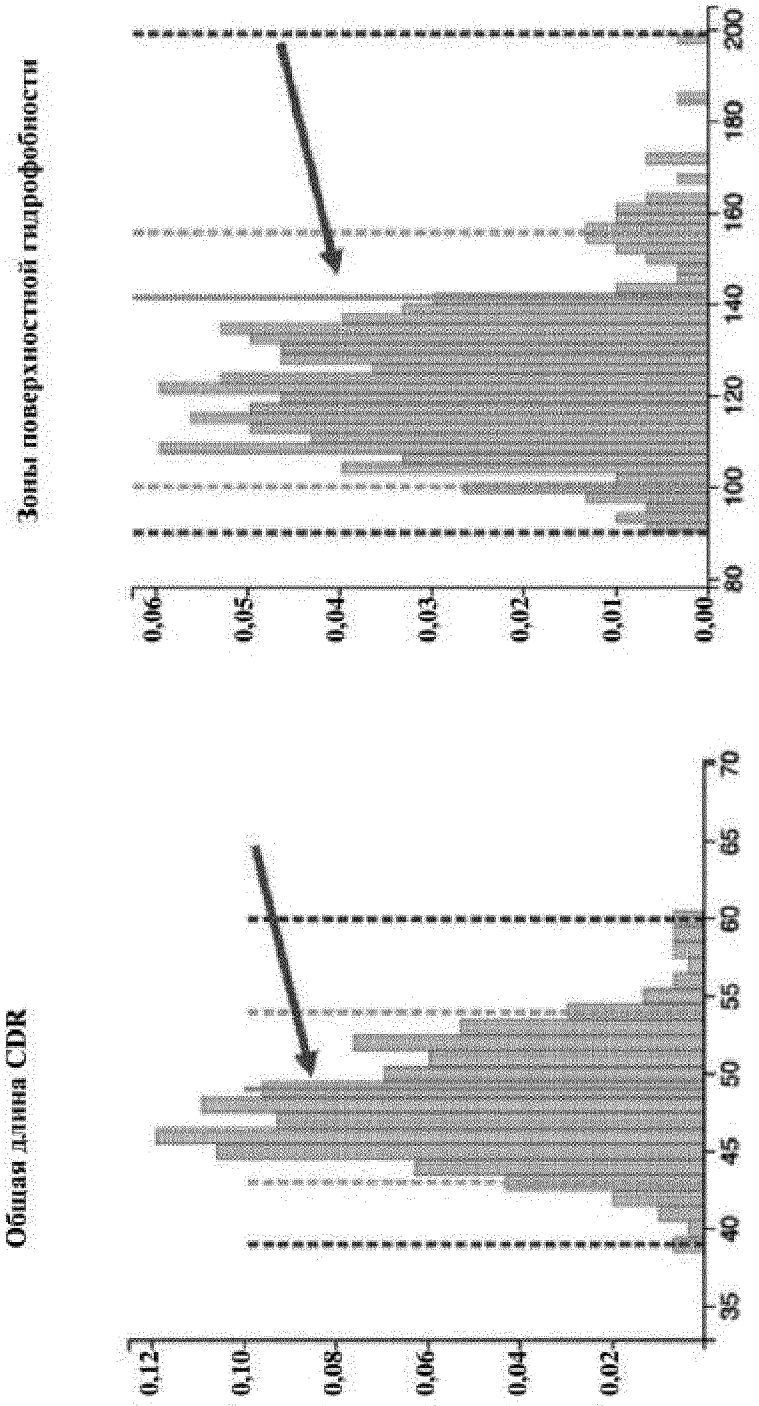

ФИГ. 64 продолжение



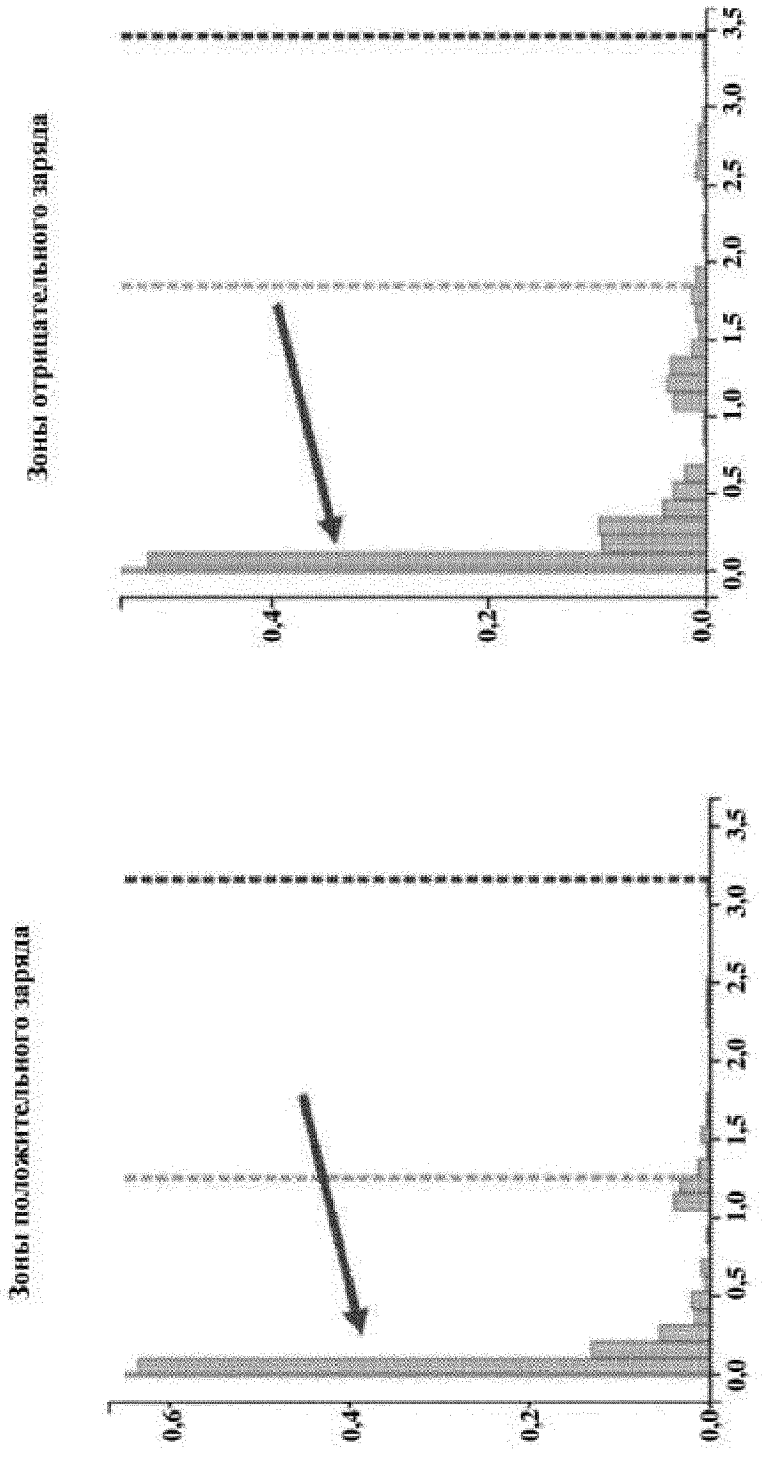

ФИГ. 64 продолжение


VH
CDRH
CDRL
VL
Вид спереди
Вид сзади
Вид сверху
: отрицательно заряженные
: положительно заряженные
: гидрофобные

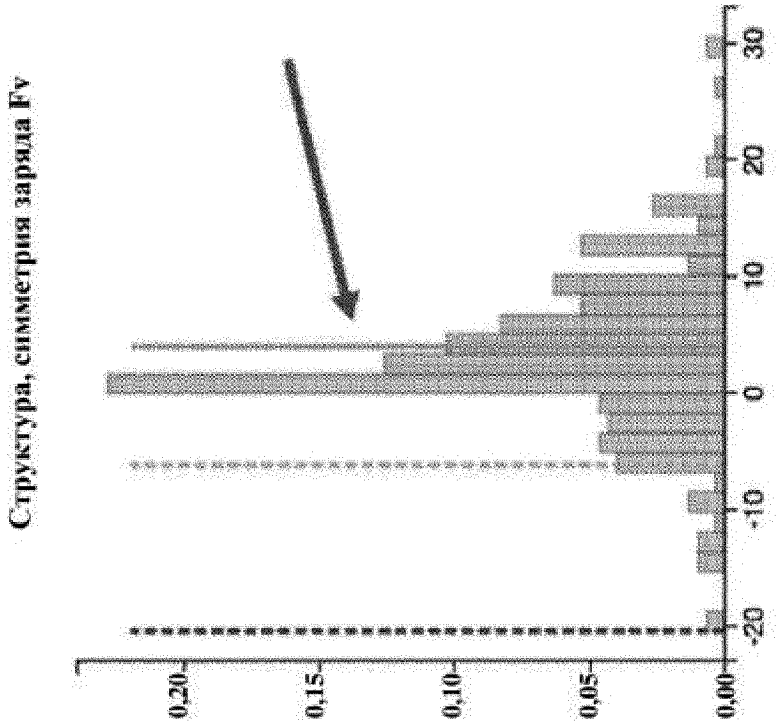
ФИГ. 65


Зоны поверхностной гидрофобности
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
80
100
120
140
160
180
200
Общая длина CDR
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
35
40
45
50
55
60
65
70

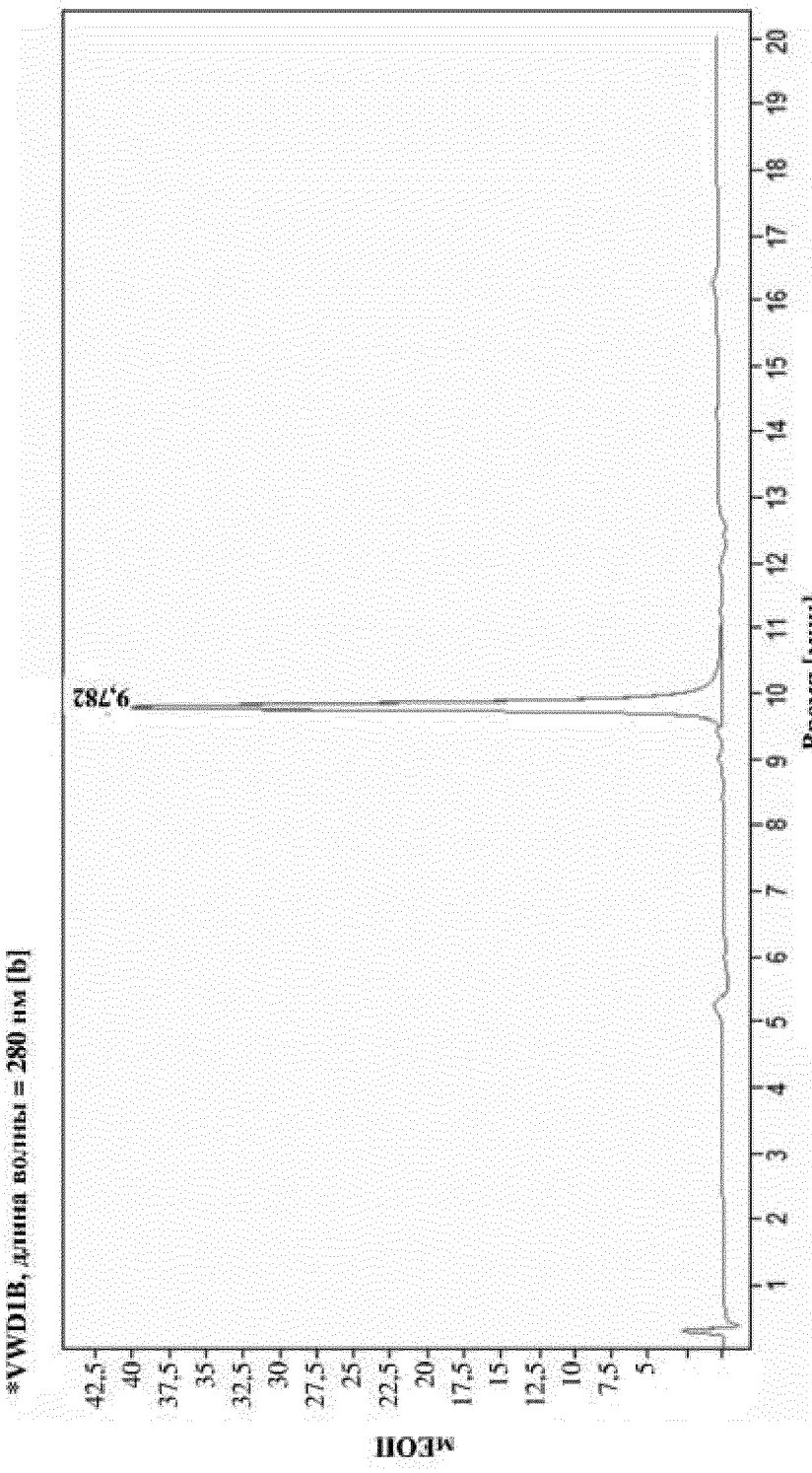
ФИГ. 66



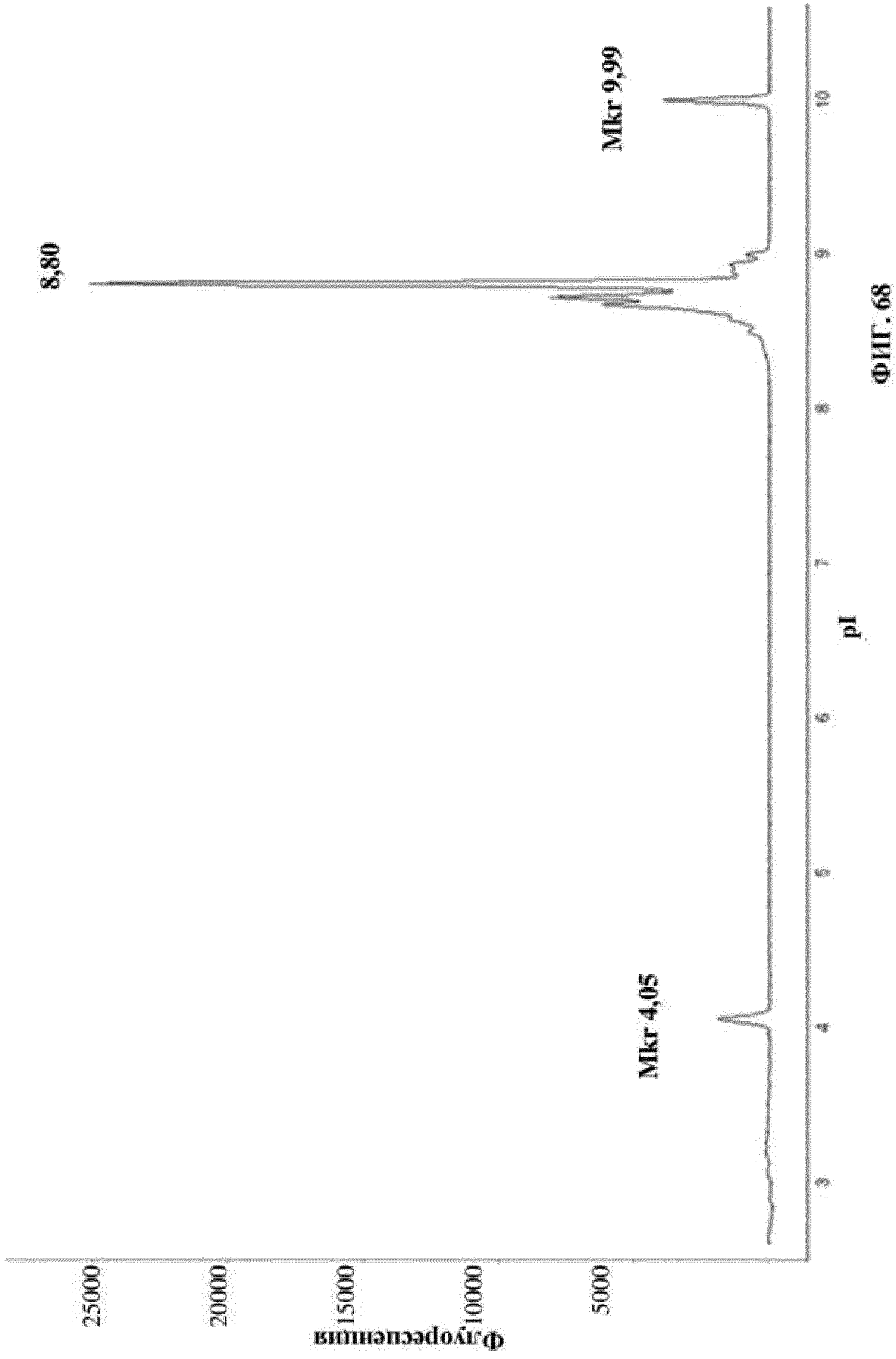

ФИГ. 6б продолжение



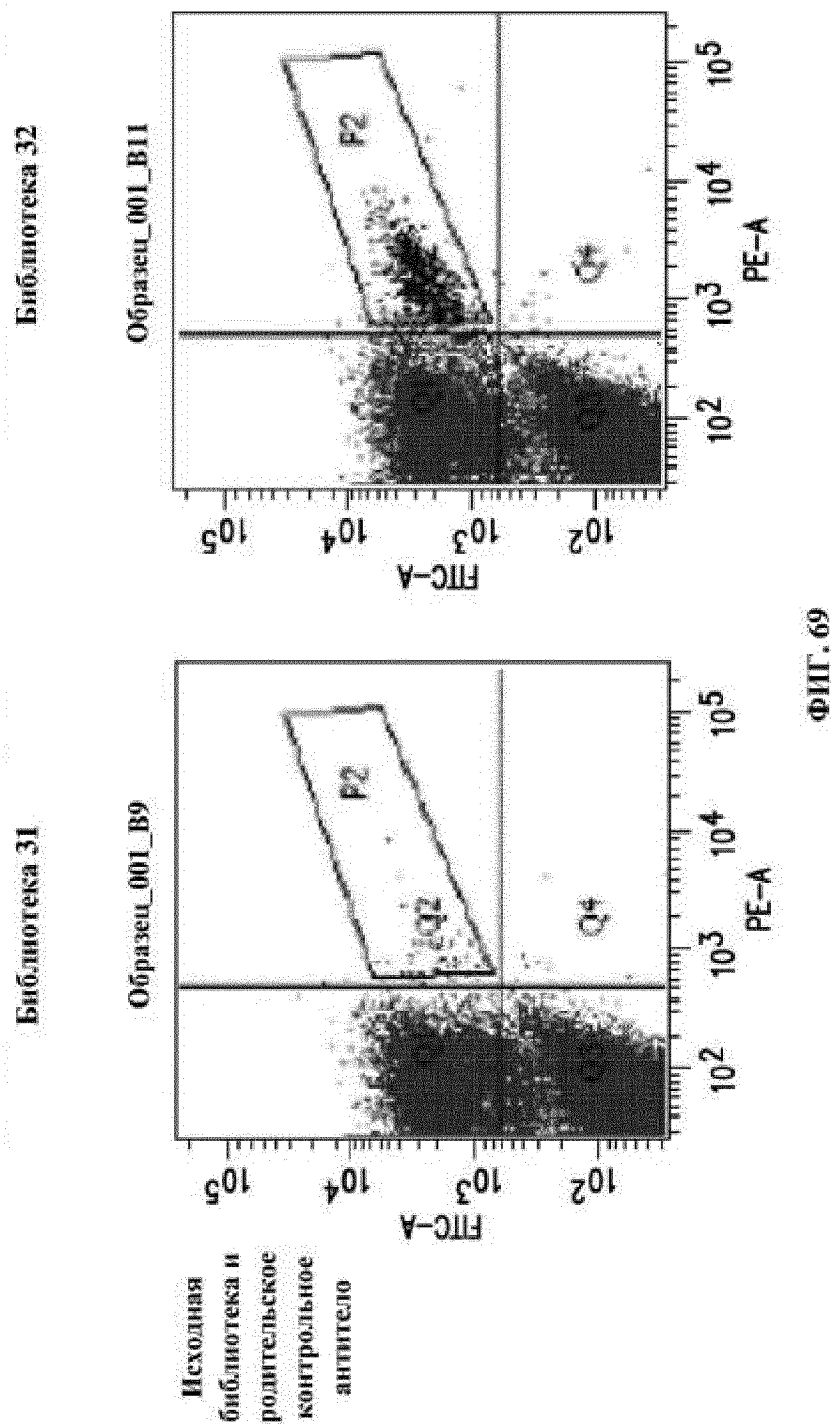

ФИГ. 66 продолжение


*VWD1B, длина волны = 280 нм [b]
мЕОП
42,5
40
37,5
35
32,5
30
27,5
25
22,5
20
17,5
15
12,5
10
7,5
5
9,782
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
Время [мин]

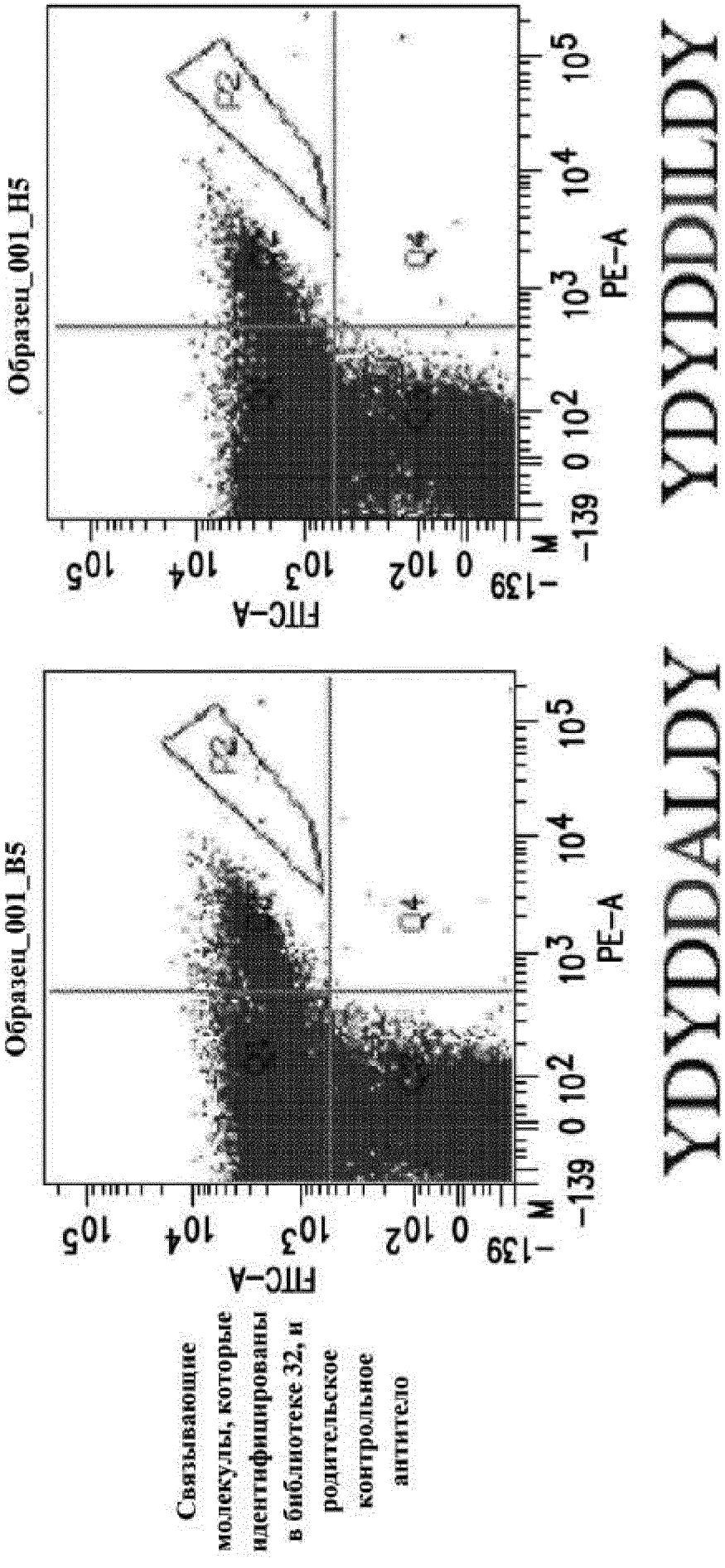
ФИГ. 67


8,80
Mkr 9,99
Mkr 4,05
pI
Флуоресценция
25000
20000
15000
10000
5000
3
4
5
6
7
8
9
10

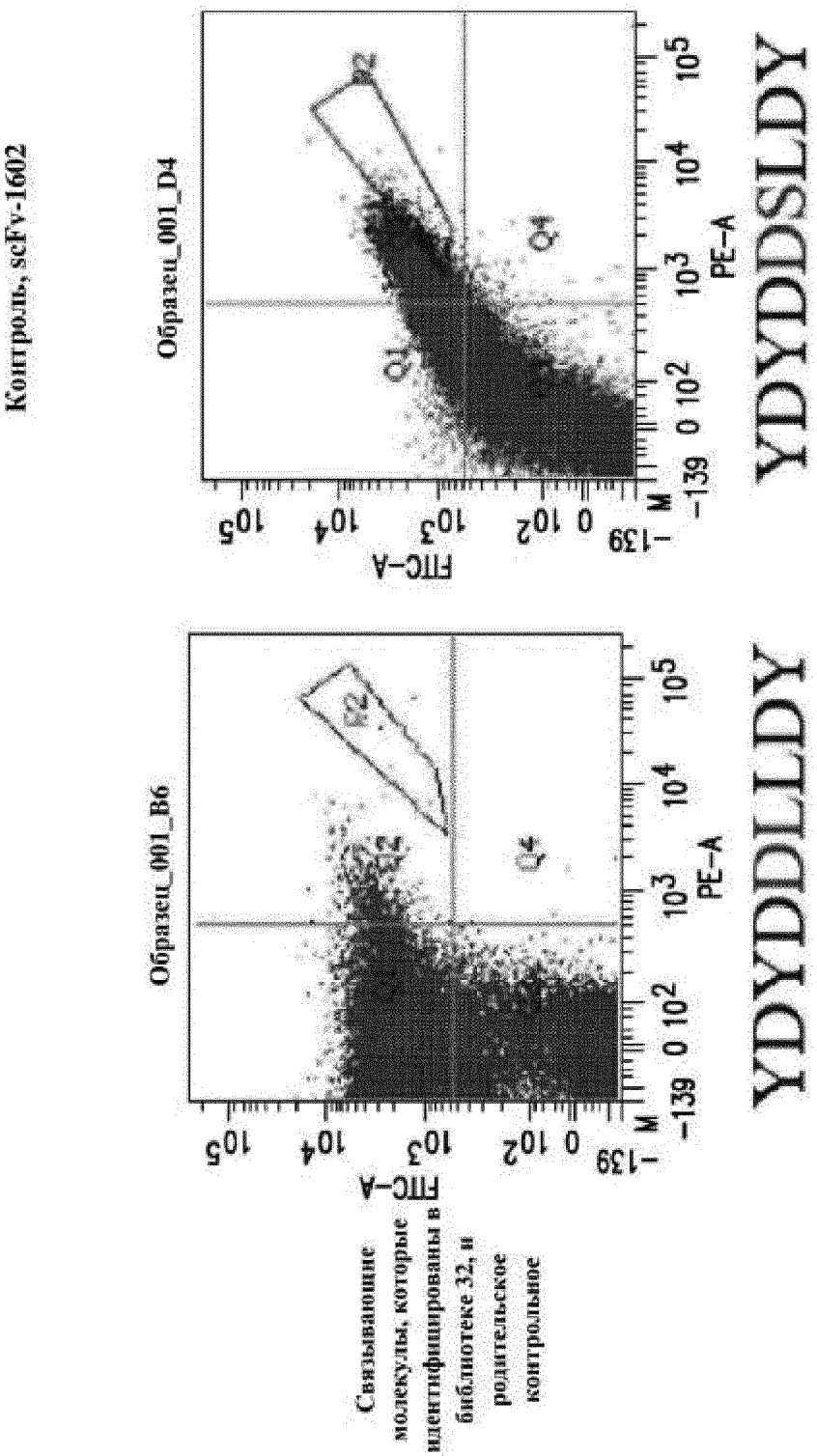
ФИГ. 68


Библиотека 32
Образец_001_B11
P2
Q4
FITC-A
PE-A
Библиотека 31
Образец_001_B9
P2
Q2
Q4
FITC-A
PE-A
Исходная библиотека и родительское контрольное антитело

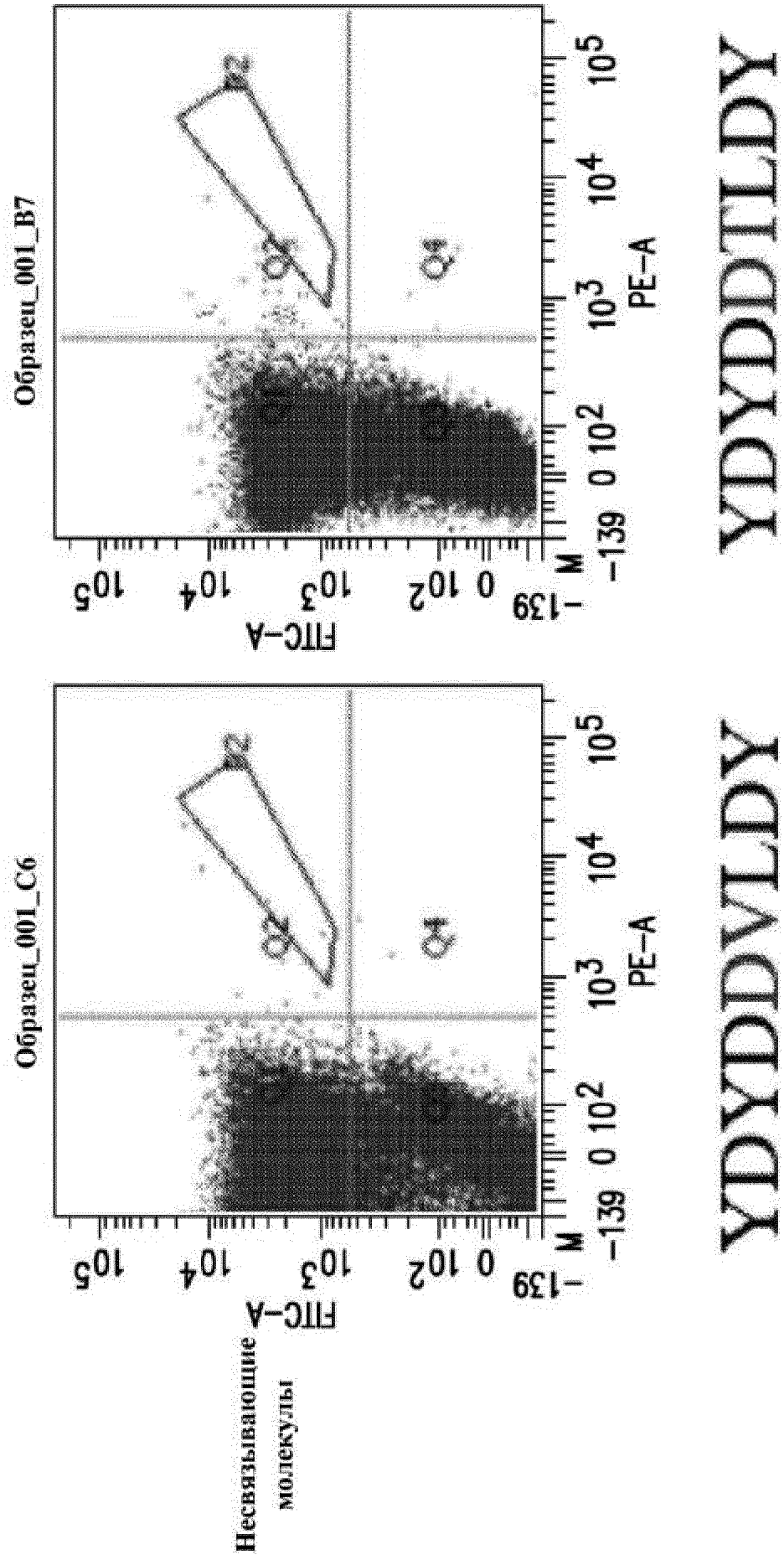
ФИГ. 69



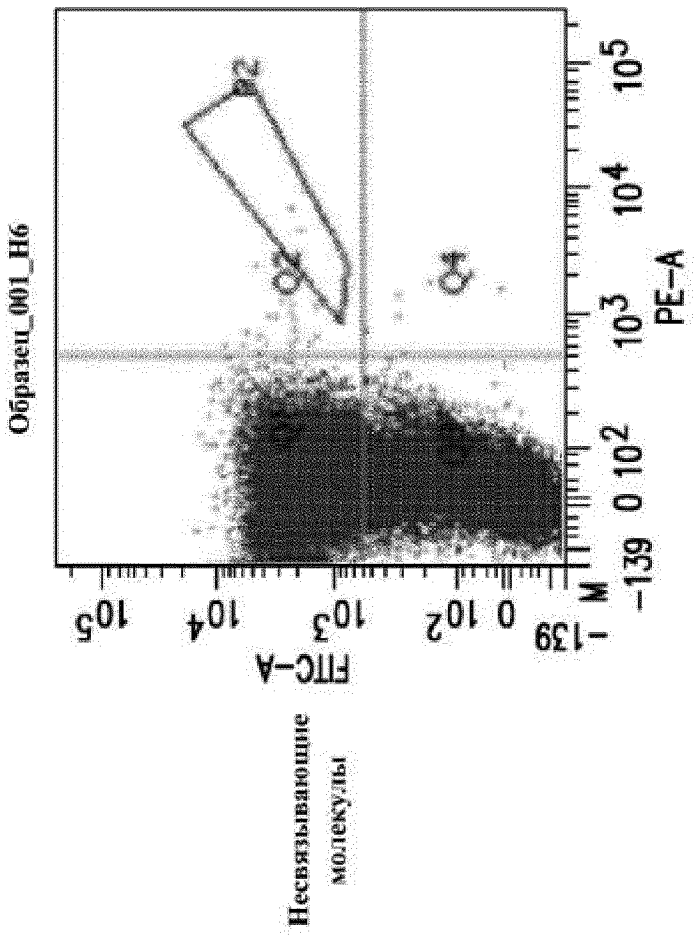

ФИГ. 69 продолжение




ФИГ. 69 продолжение

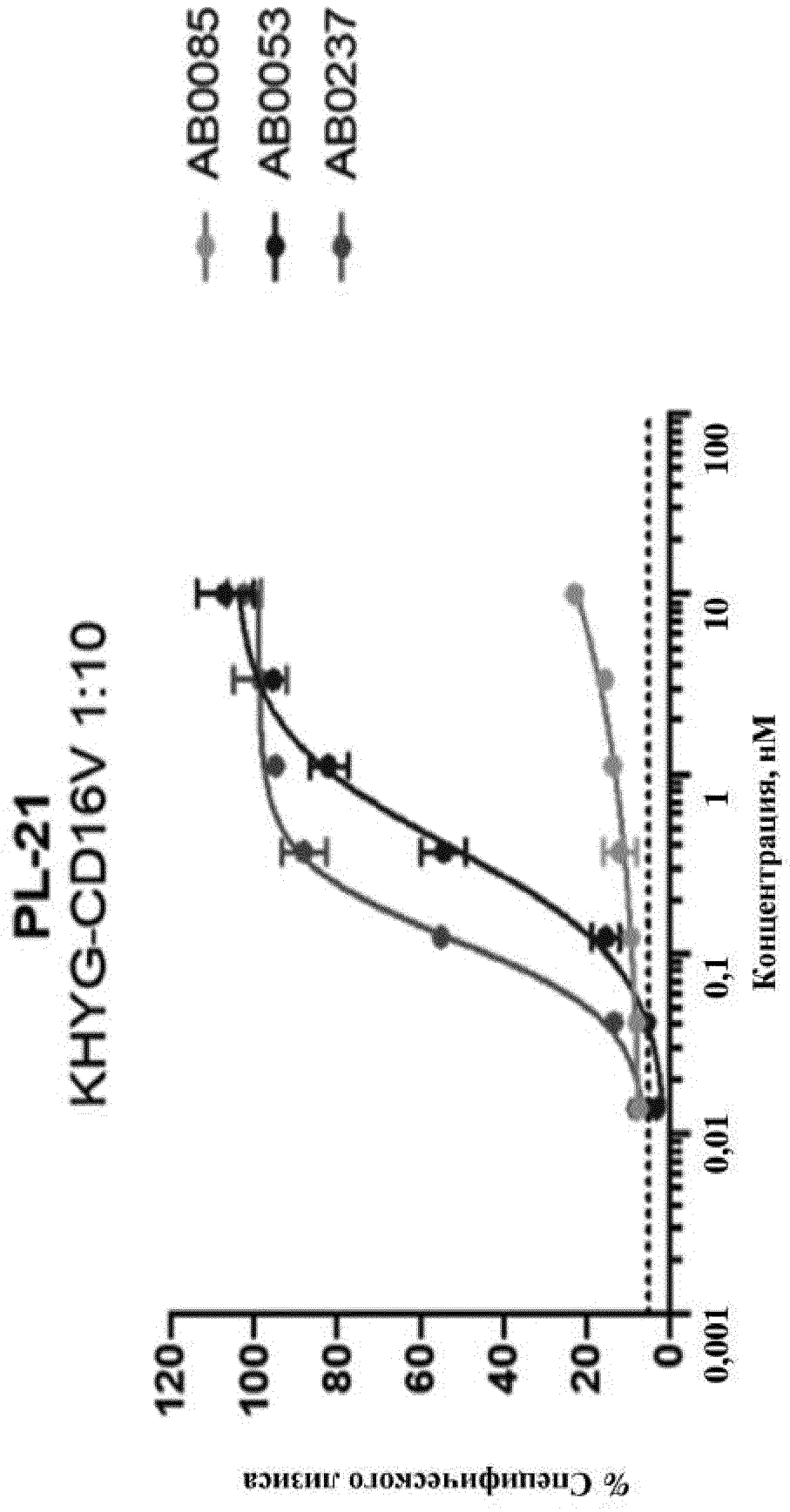



ФИГ. 69 продолжение

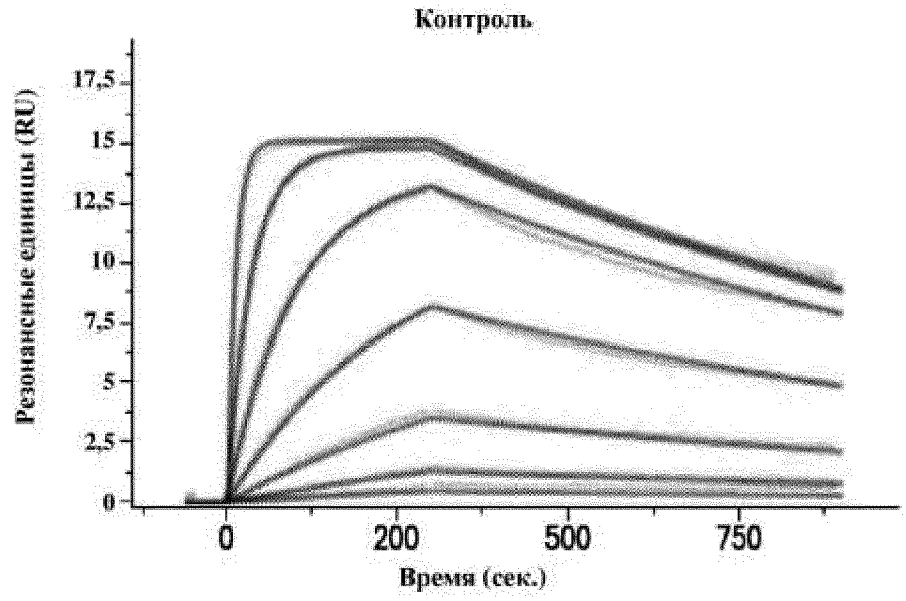


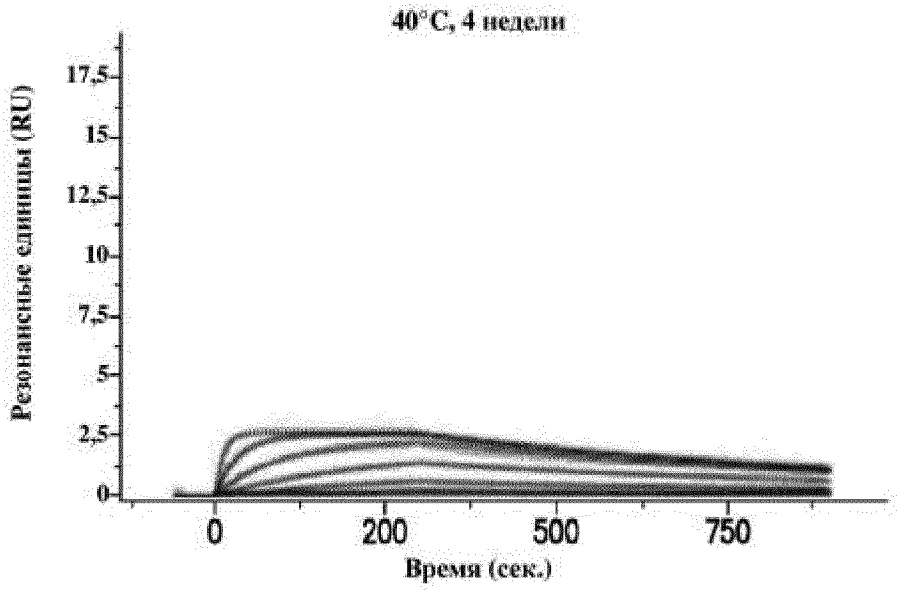

YDYDESLDY

ФИГ. 69 продолжение


AB0085
AB0053
AB0237
PL-21
KHYG-CD16V 1:10
% Специфического лизиса
120
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ

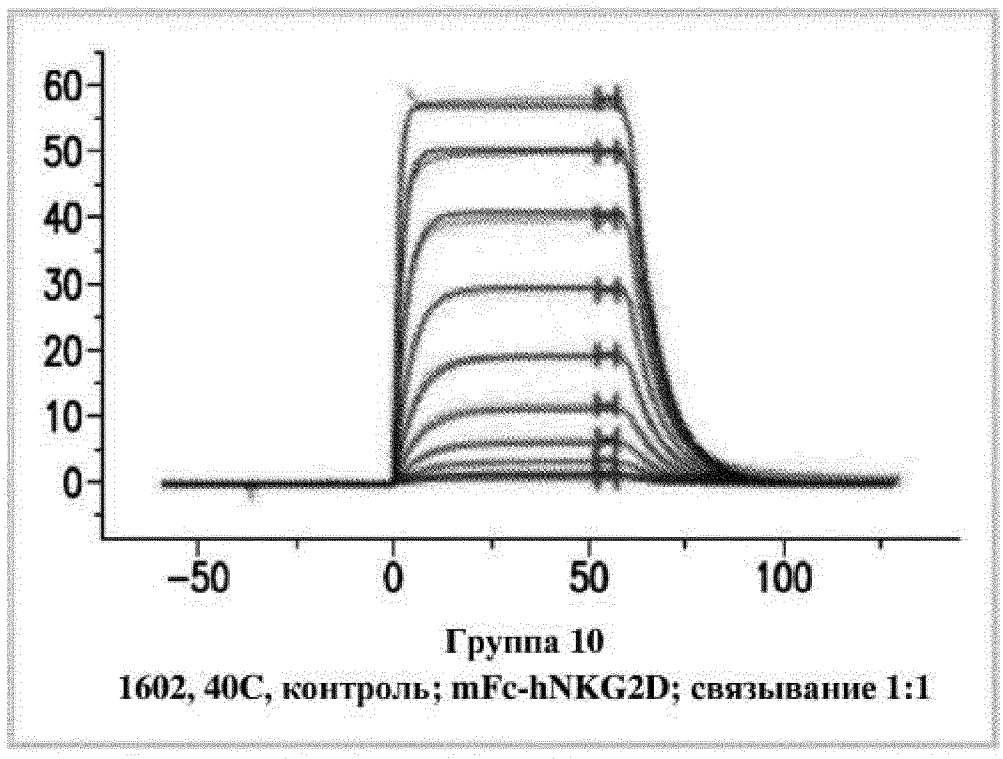
ФИГ. 70


Контроль
Резонансные единицы (RU)
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
0
200
500
750
Время (сек.)


40°C, 4 недели
Резонансные единицы (RU)
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
0
200
500
750
Время (сек.)

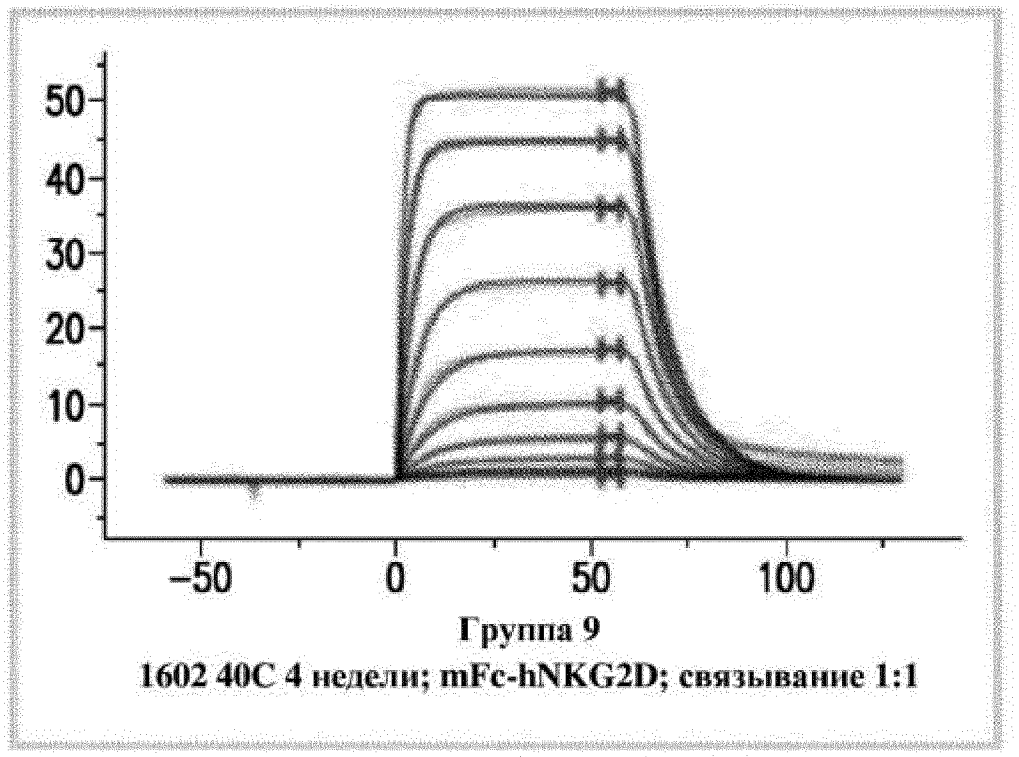
ФИГ. 71

**Контроль**



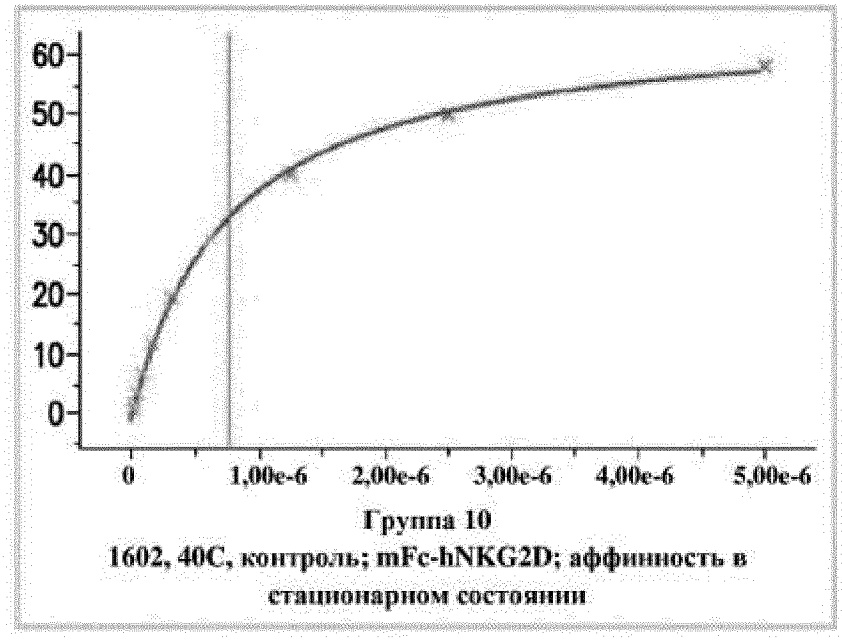

**Группа 10**
**1602, 40C, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1**

**40°C, 4 недели**

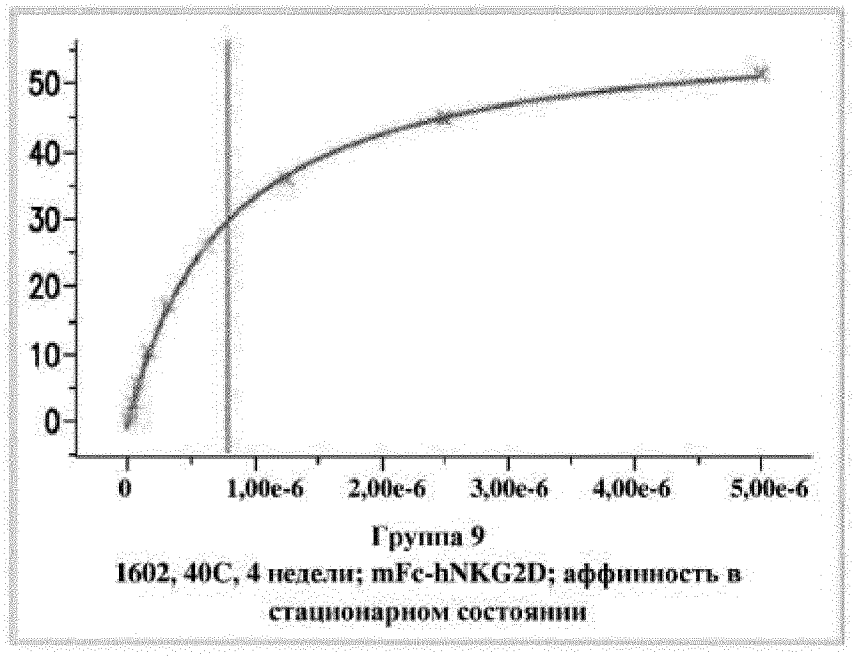



**Группа 9**
**1602 40C 4 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1**

**ФИГ. 72**

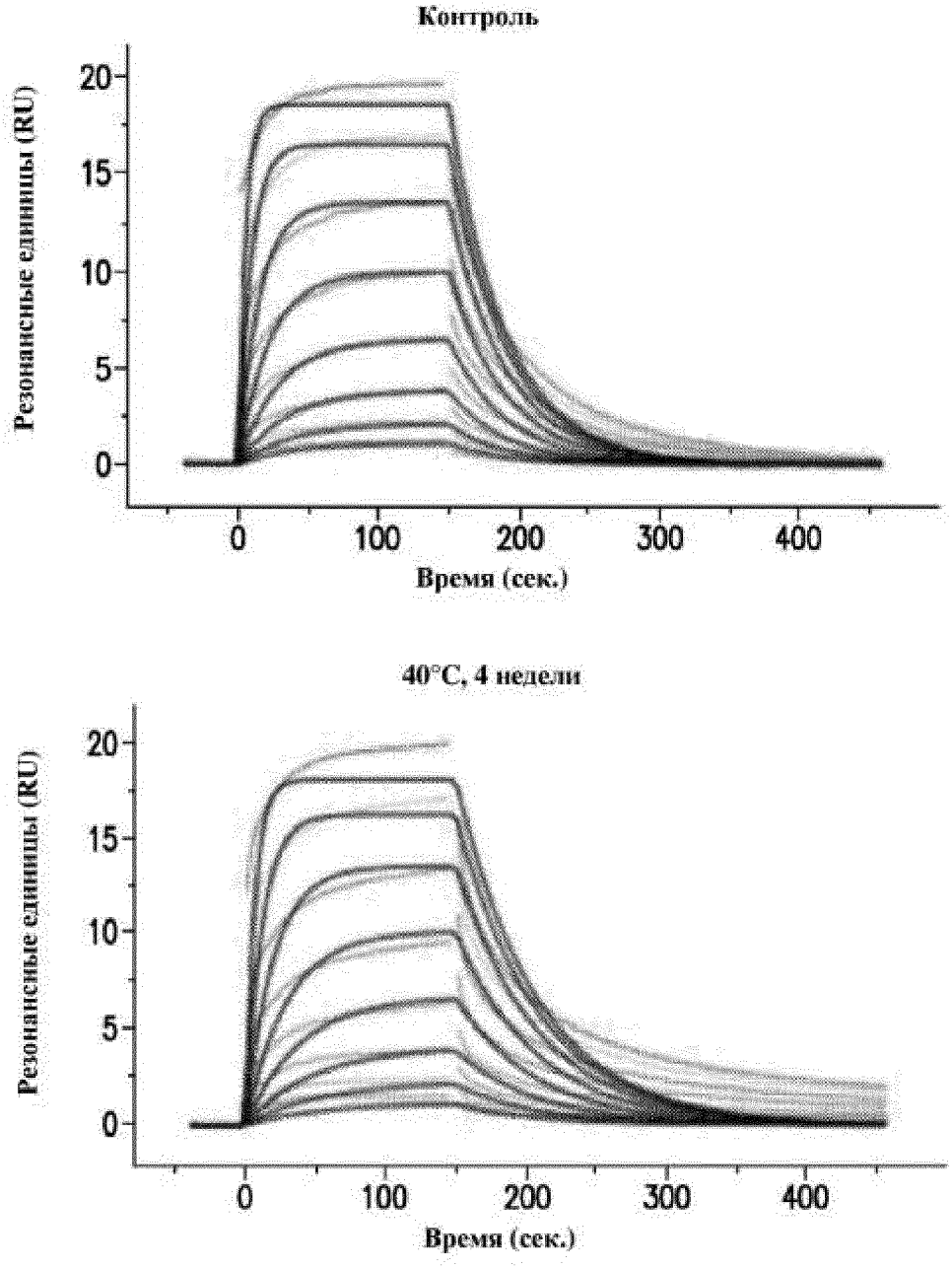



Группа 10
1602, 40C, контроль; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

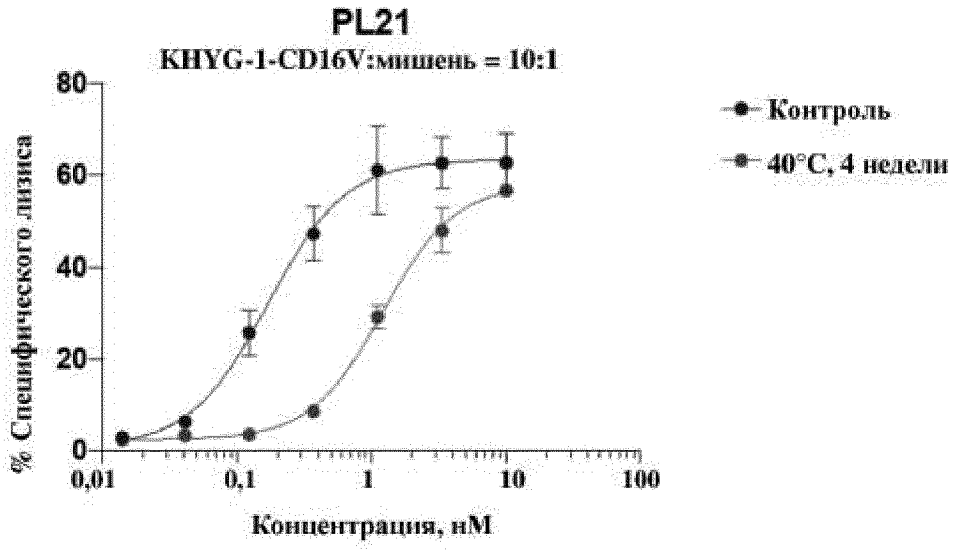



Группа 9
1602, 40C, 4 недели; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

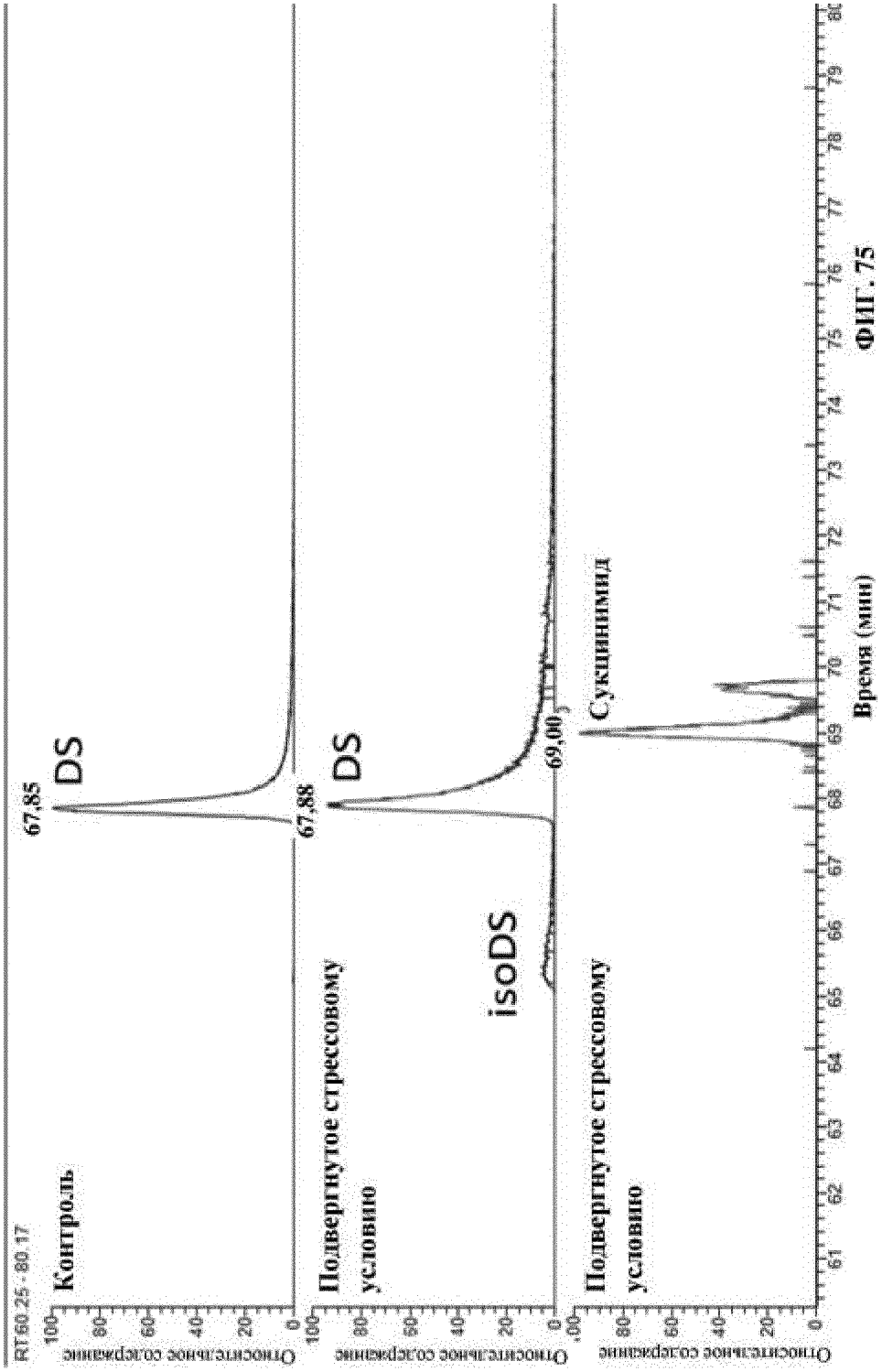
ФИГ. 72 продолжение


Контроль
Резонансные единицы (RU)
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
Время (сек.)
40°C, 4 недели
Резонансные единицы (RU)
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
Время (сек.)

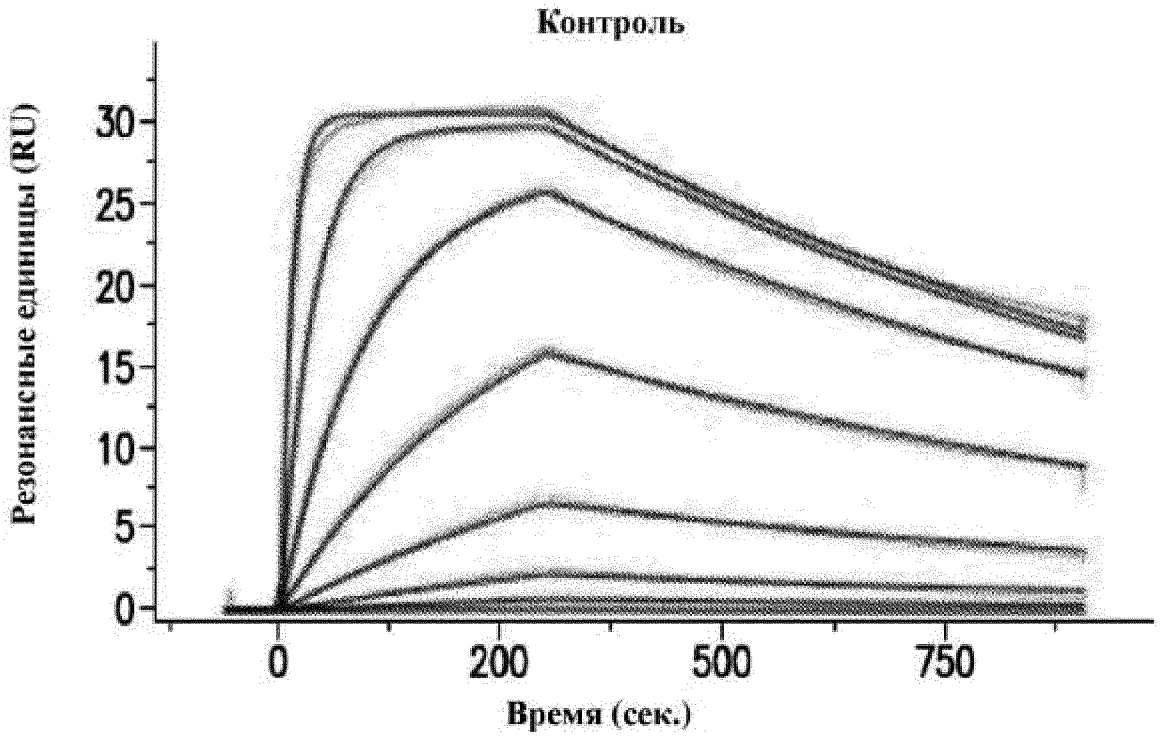
ФИГ. 73

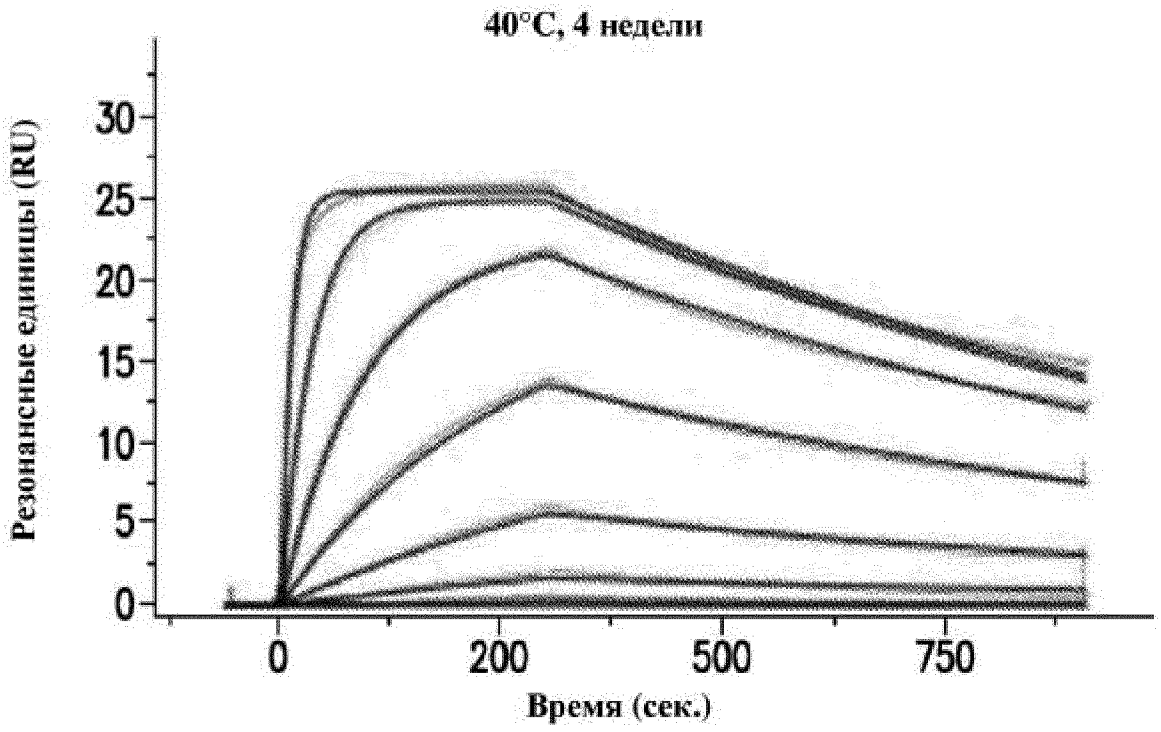

PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
Контроль
40°C, 4 недели

ФИГ. 74


RT 60.25 - 80.17
Контроль
67,85
DS
67,88
Подвергнутое стрессовому условию
DS
isoDS
69,00
Подвергнутое стрессовому условию
Сукцинимид
Относительное содержание
Время (мин)

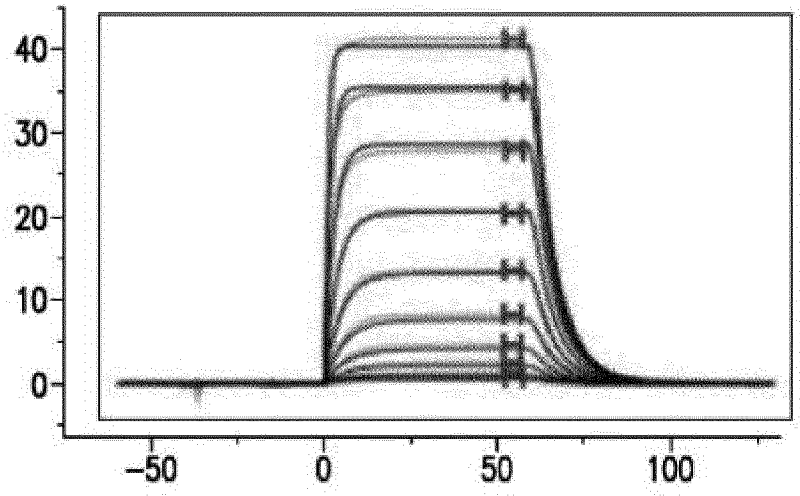
ФИГ. 75


Контроль
Резонансные единицы (RU)
30
25
20
15
10
5
0
0
200
500
750
Время (сек.)


40°C, 4 недели
Резонансные единицы (RU)
30
25
20
15
10
5
0
0
200
500
750
Время (сек.)

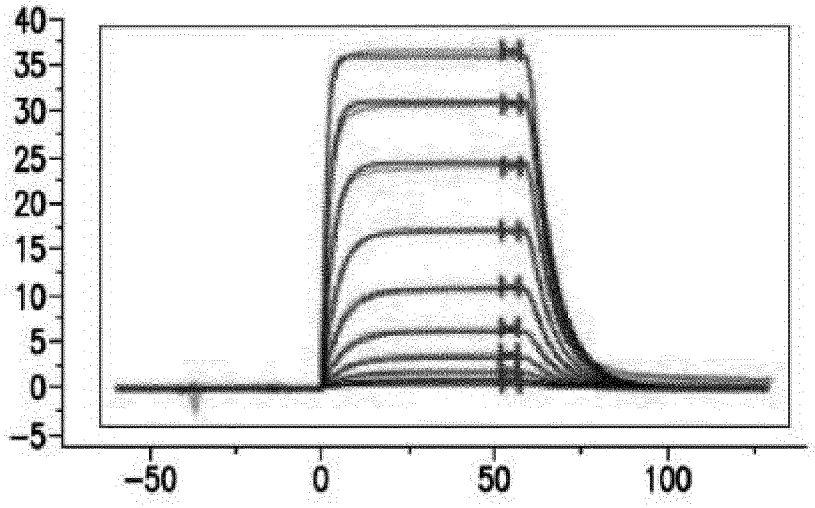
ФИГ. 76

Контроль



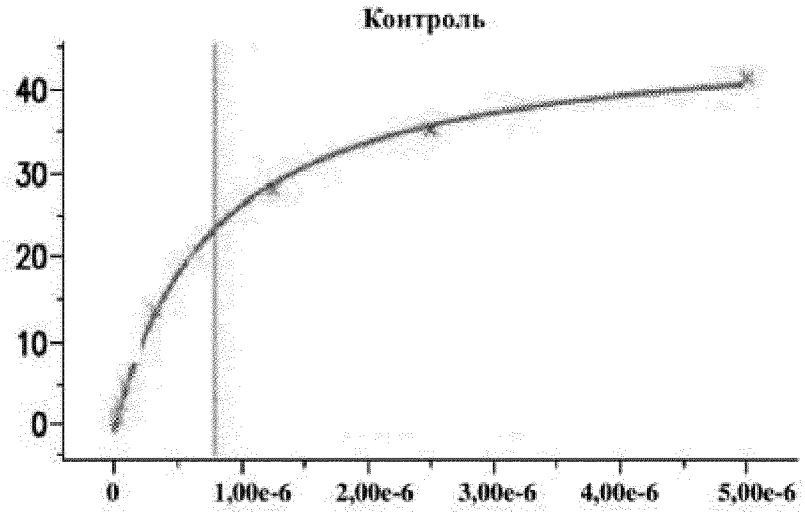

Группа 4
40C, буфер, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

40°C, 4 недели

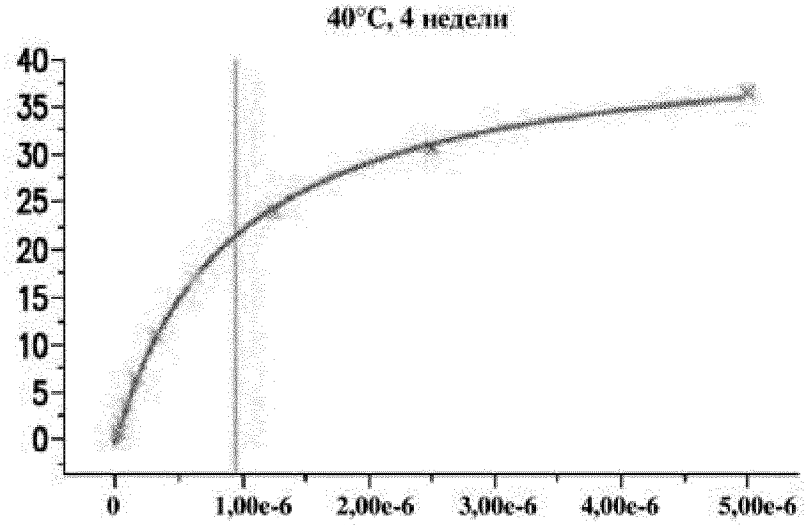



Группа 14
NaCl, 40C, 4 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 77

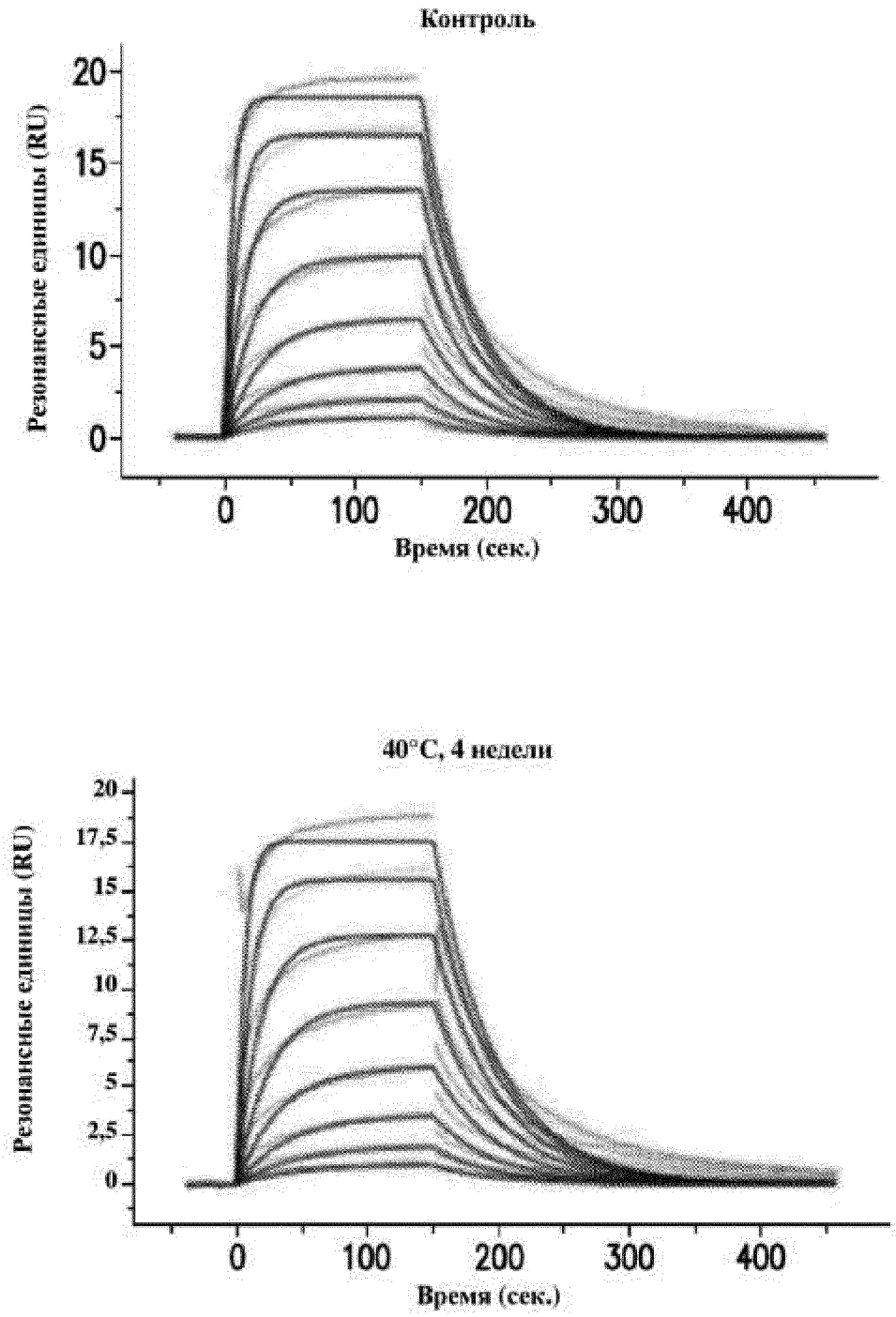



Группа 4
40C, буфер, контроль; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии



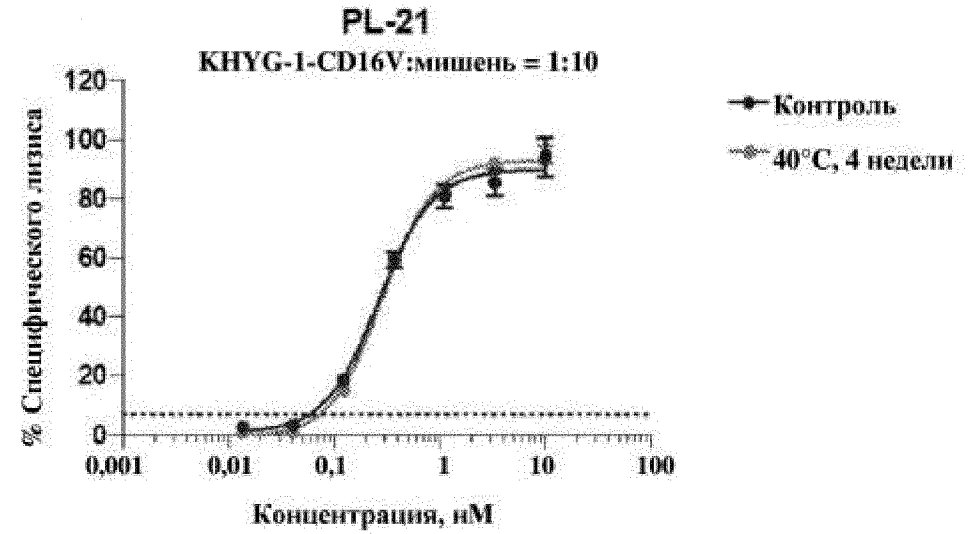

Группа 14
NaCl, 40C, 4 недели; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

ФИГ. 77 продолжение

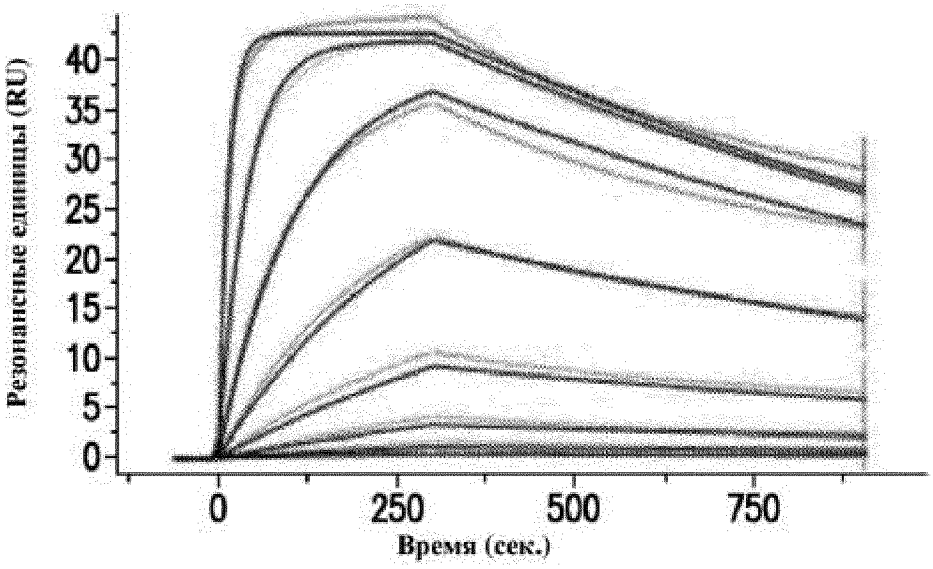

Контроль
Резонансные единицы (RU)
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
Время (сек.)
40°C, 4 недели
Резонансные единицы (RU)
20
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
0
100
200
300
400
Время (сек.)

ФИГ. 78

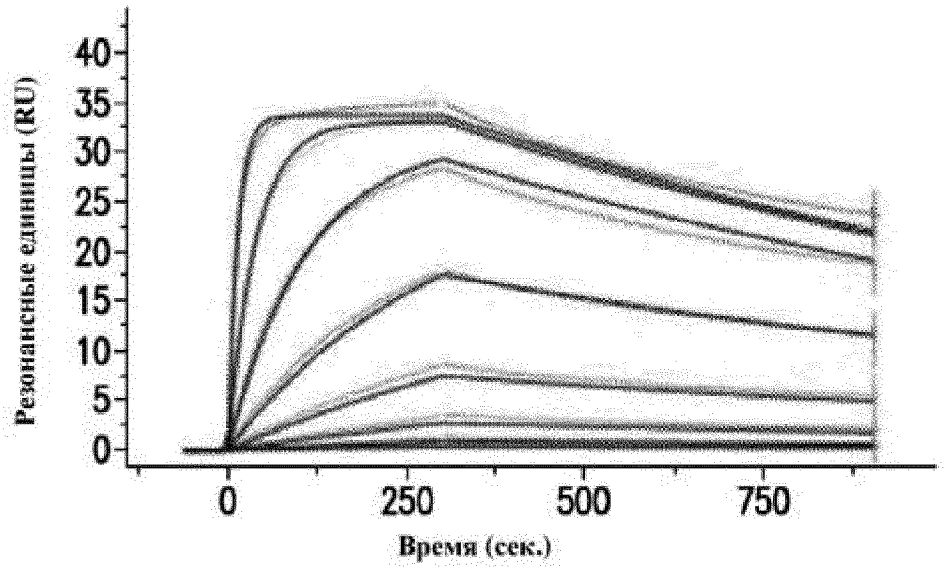
ФИГ. 79


PL-21
KHYG-1-CD16V:мишень = 1:10
% Специфического лизиса
120
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
Контроль
40°C, 4 недели

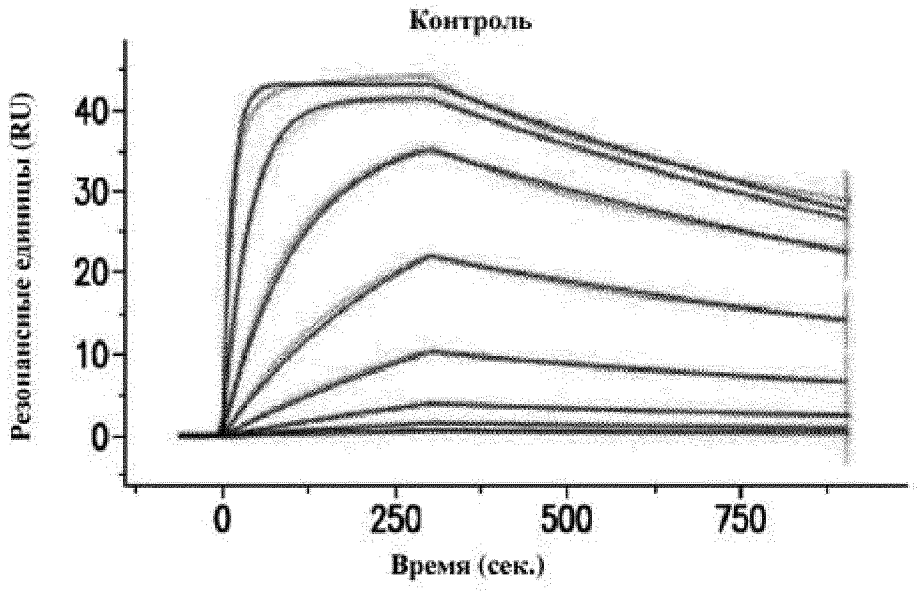
Контроль

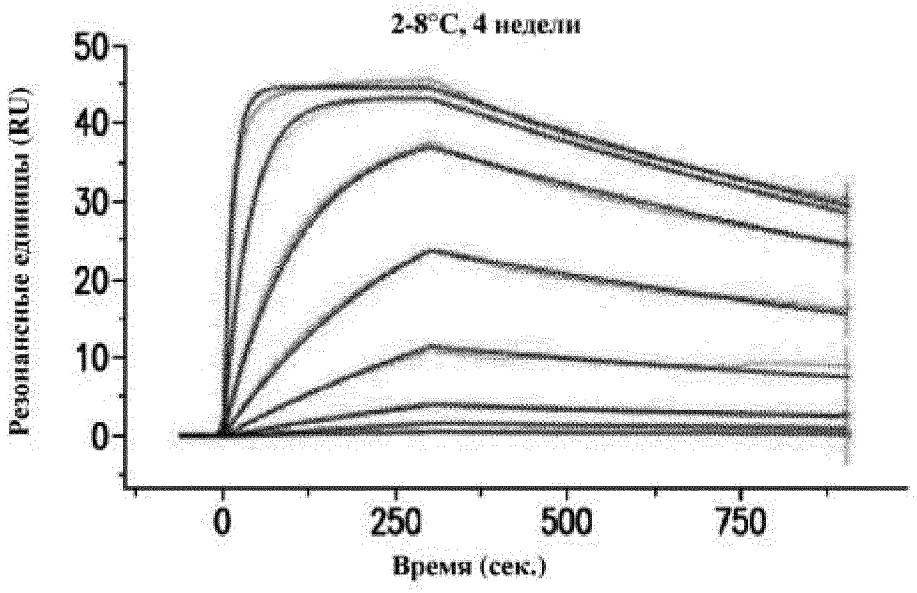



40°C, 4 недели

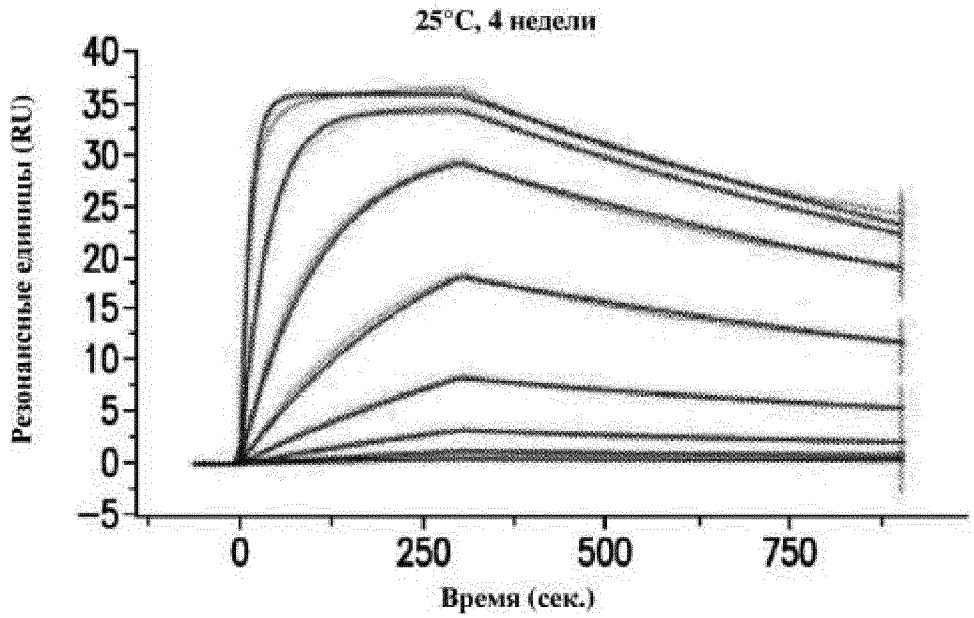



ФИГ. 80

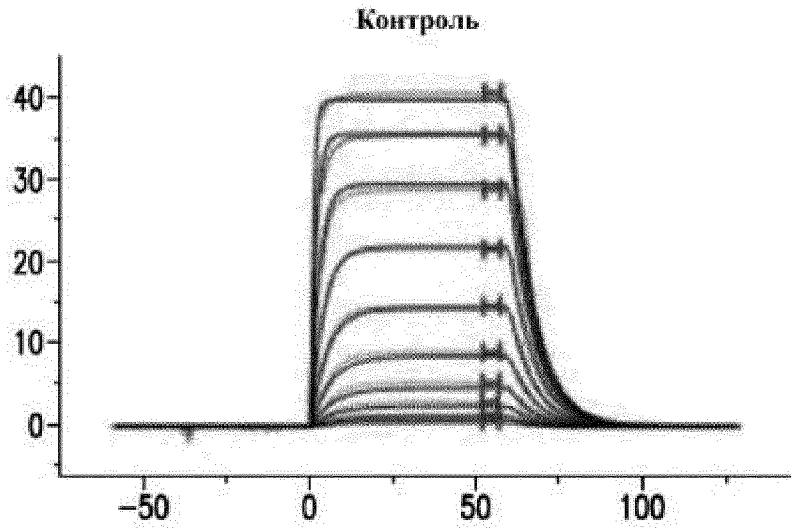

Контроль
Резонансные единицы (RU)
40
30
20
10
0
0
250
500
750
Время (сек.)


2-8°C, 4 недели
Резонансные единицы (RU)
50
40
30
20
10
0
0
250
500
750
Время (сек.)

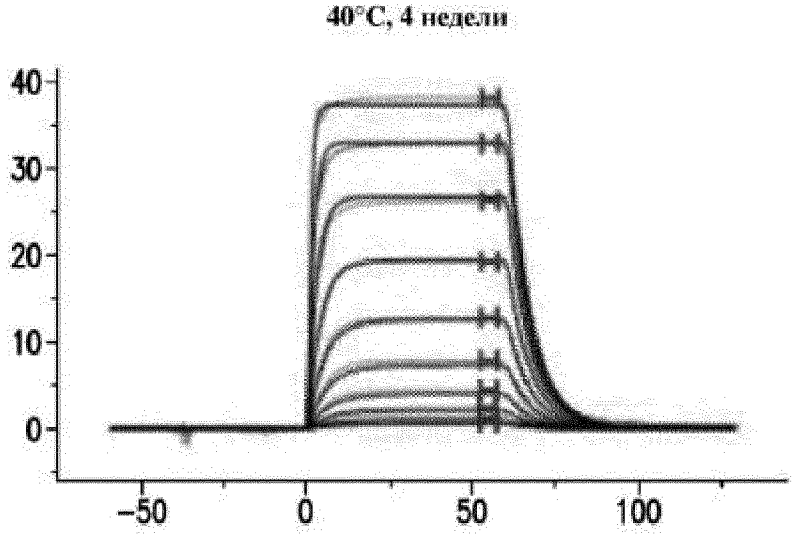
ФИГ. 81




ФИГ. 81 продолжение

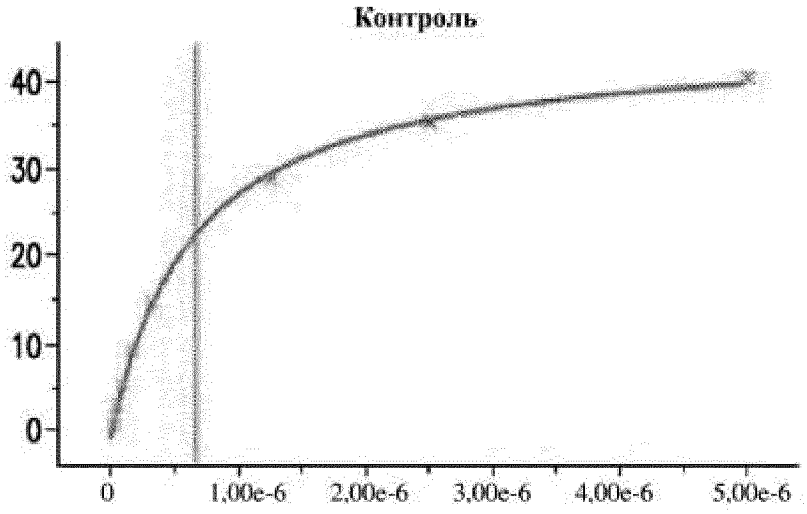



Группа 5
40C, 4 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

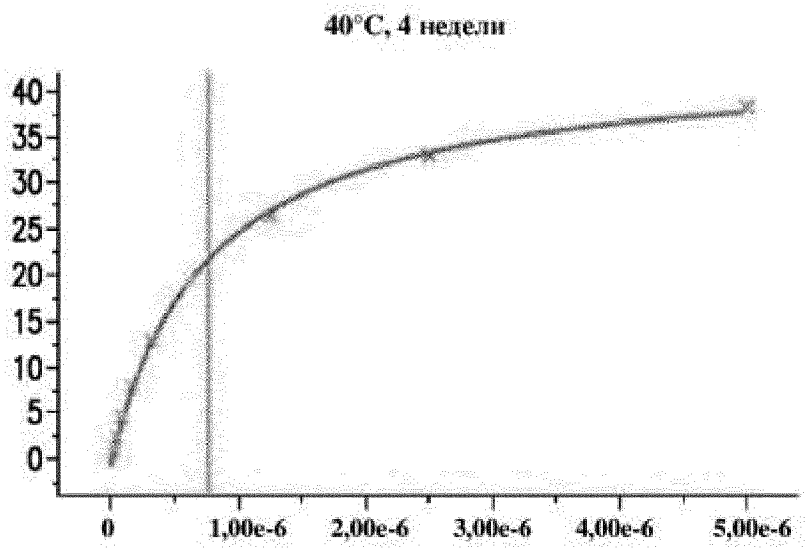



Группа 1
NaCl, 40C, 4 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 82

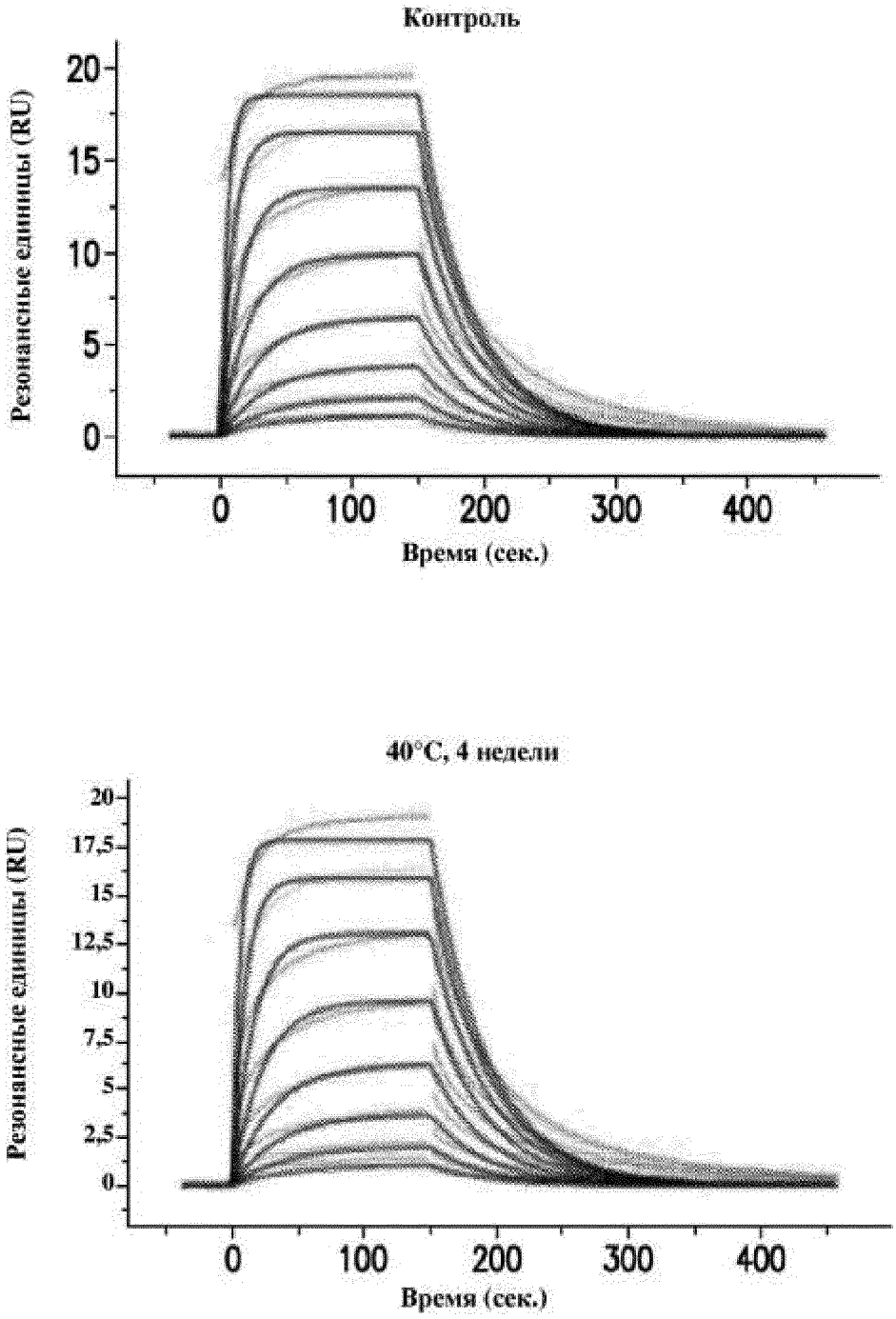



**Группа 5**
**40C, контроль; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии**



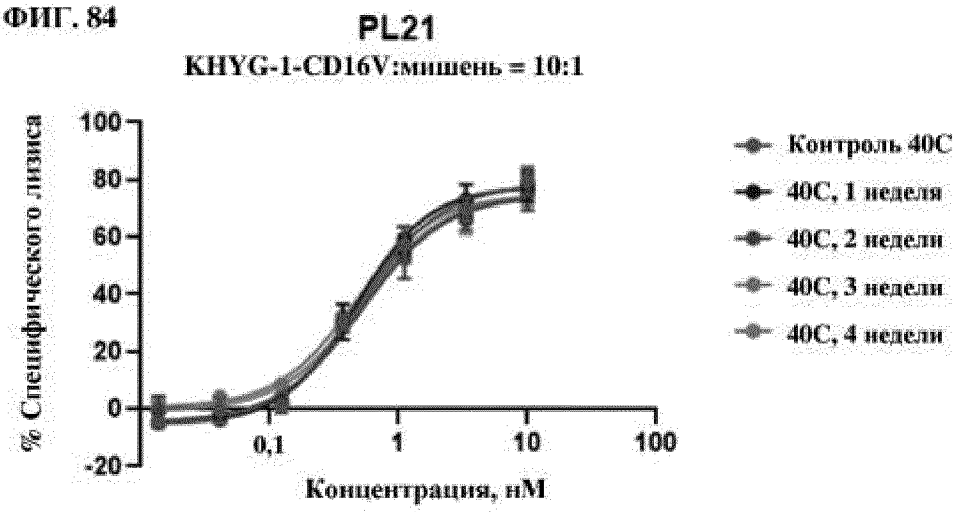

**Группа 1**
**NaCl, 40C, 4 недели; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии**

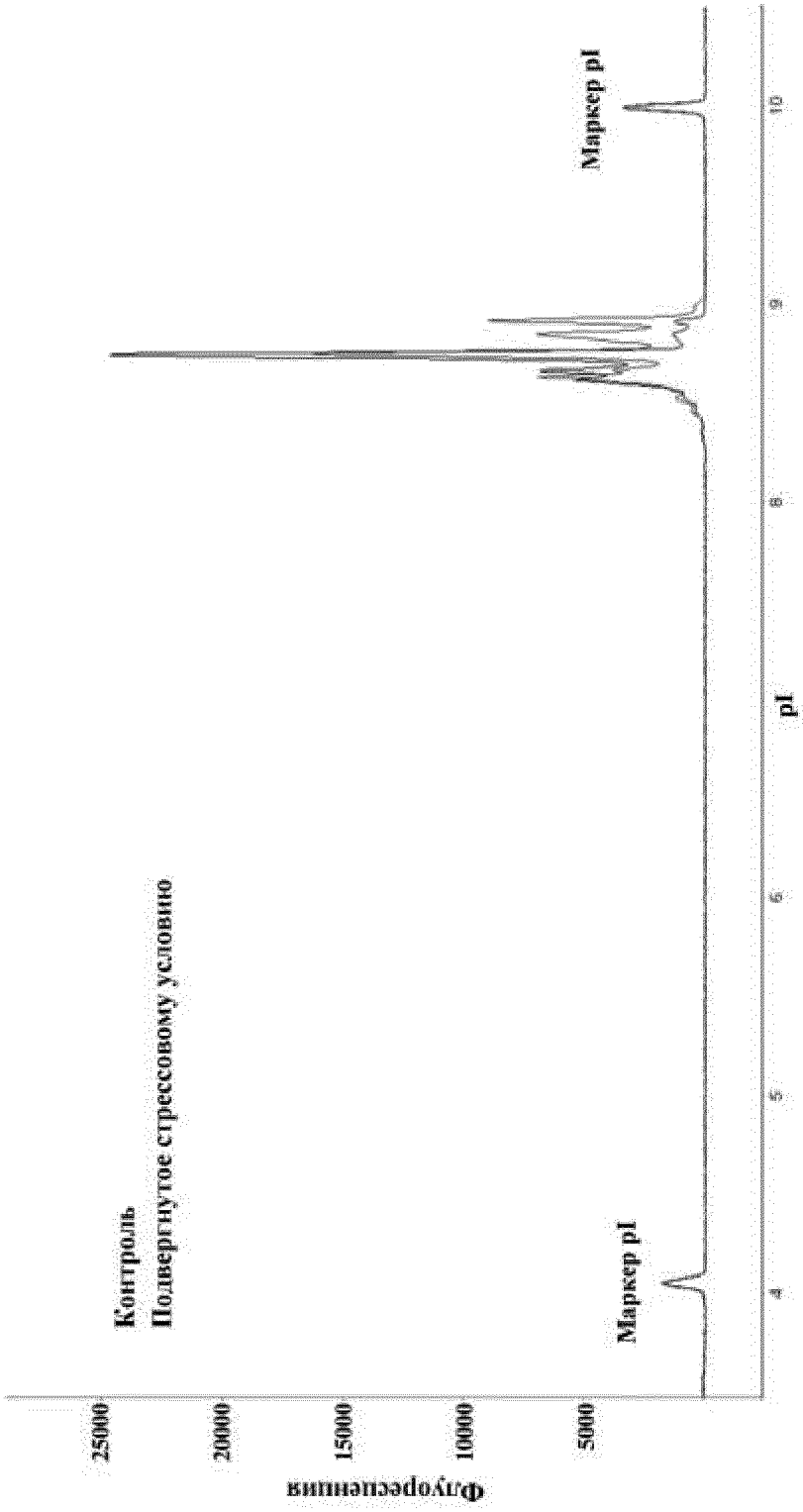
**ФИГ. 82 продолжение**


Контроль
Резонансные единицы (RU)
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
Время (сек.)
40°C, 4 недели
Резонансные единицы (RU)
20
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
0
100
200
300
400
Время (сек.)

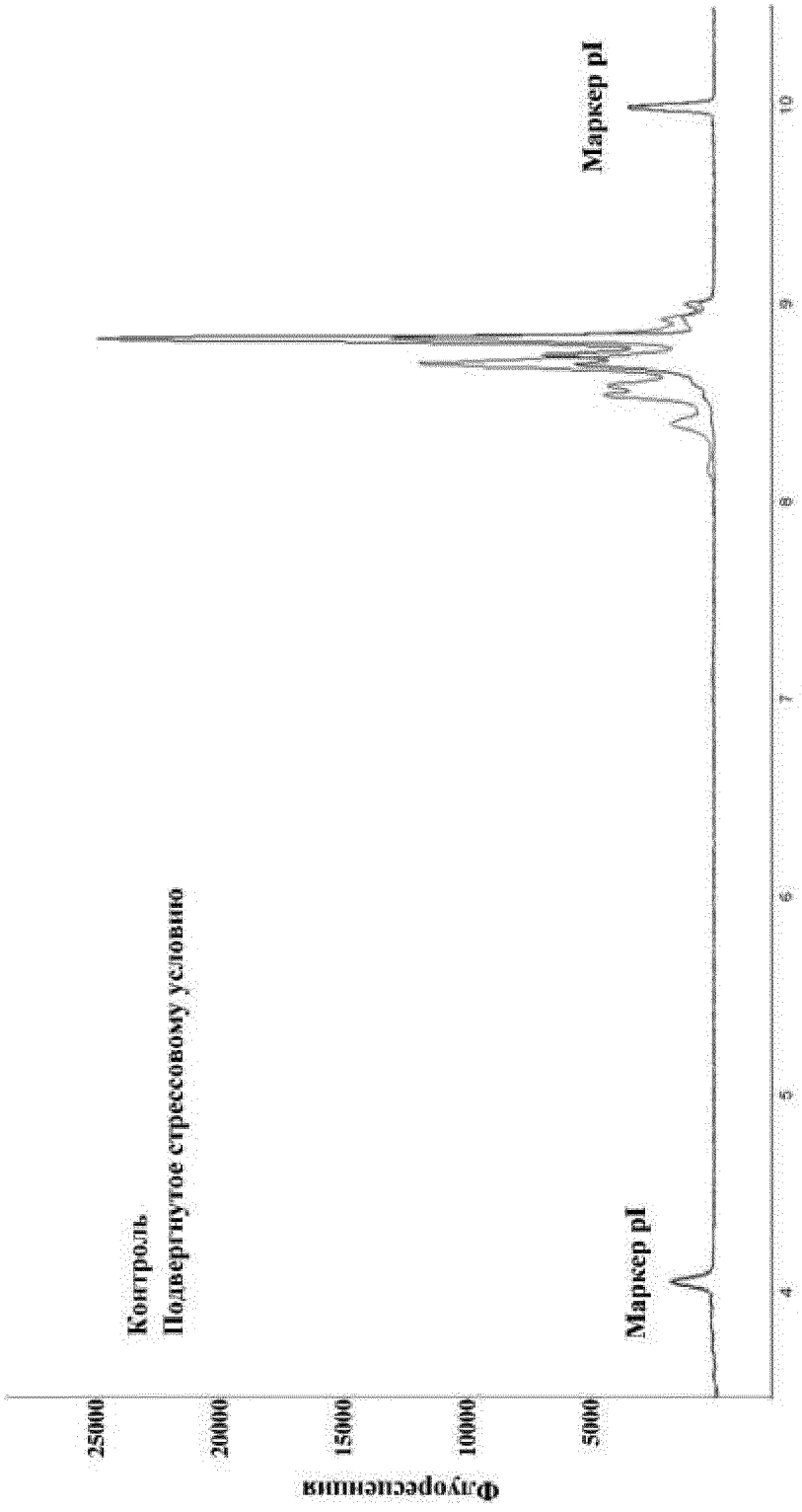
ФИГ. 83

ФИГ. 84

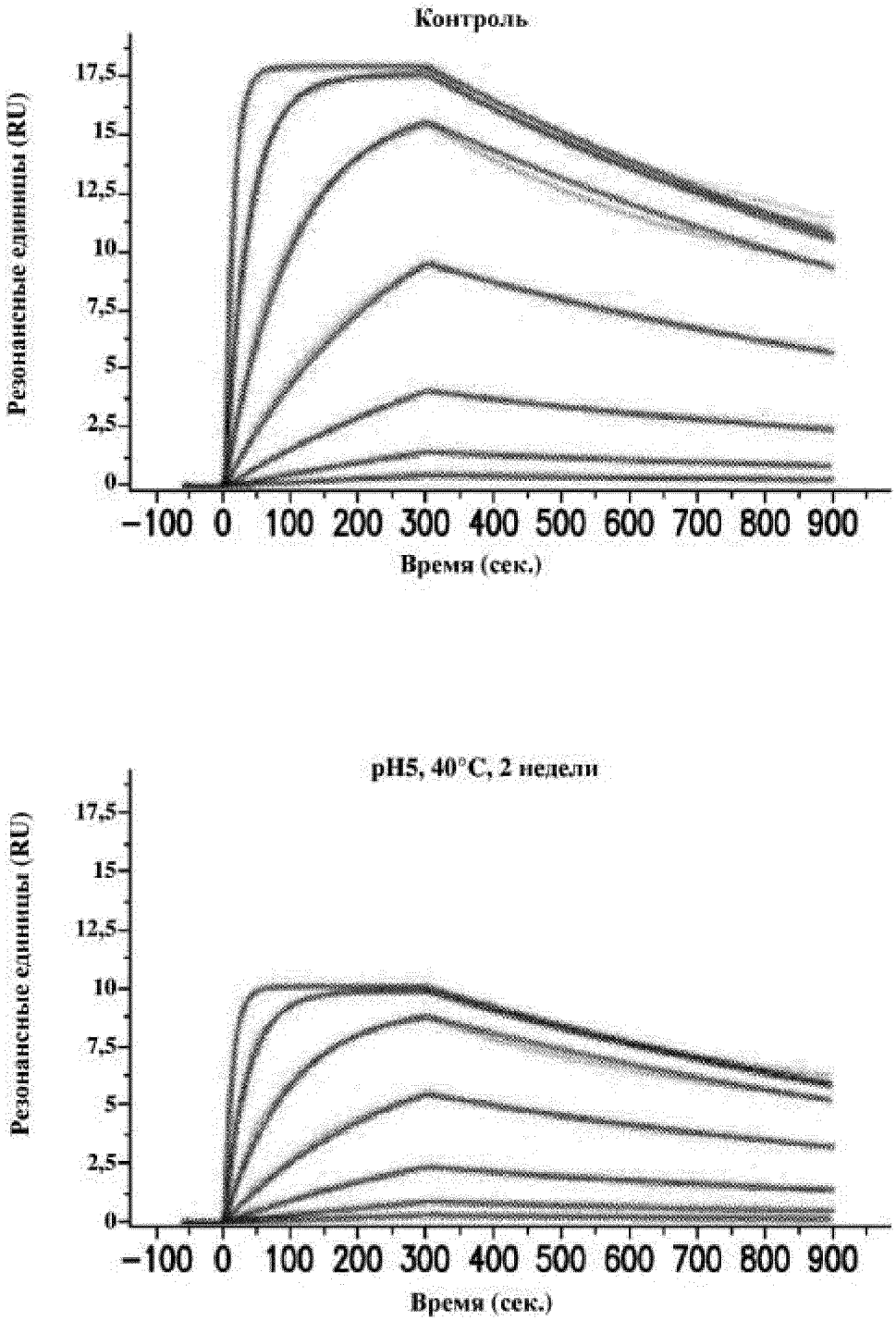

PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
-20
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
Контроль 40С
40С, 1 неделя
40С, 2 недели
40С, 3 недели
40С, 4 недели


Маркер pI
Маркер pI
Контроль
Подвергнутое стрессовому условию
Флуоресценция
25000
20000
15000
10000
5000
4
5
6
8
9
10
pI

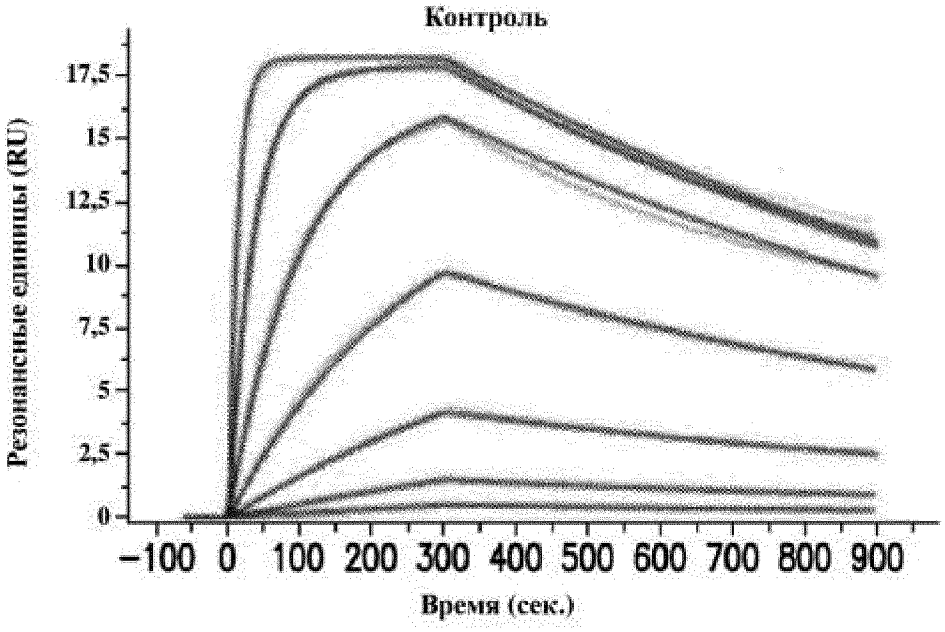
ФИГ. 85

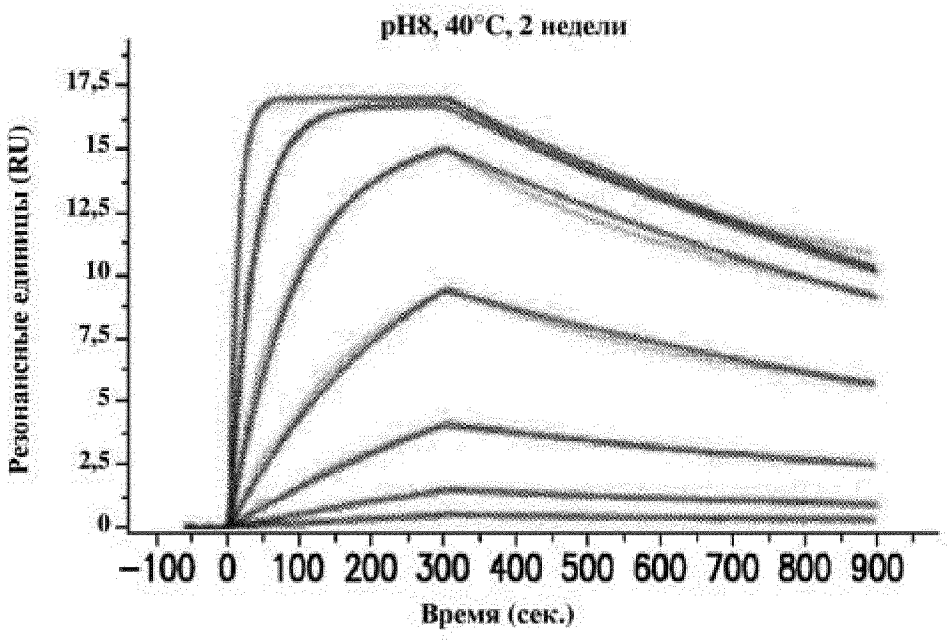

Маркер pI
Маркер pI
Контроль
Подвергнутое стрессовому условию
Флуоресценция
25000
20000
15000
10000
5000
4
5
6
7
8
9
10
pI

ФИГ. 86


Контроль
Резонансные единицы (RU)
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
−100 0 100 200 300 400 500 600 700 800 900
Время (сек.)
pH5, 40°C, 2 недели
Резонансные единицы (RU)
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
−100 0 100 200 300 400 500 600 700 800 900
Время (сек.)

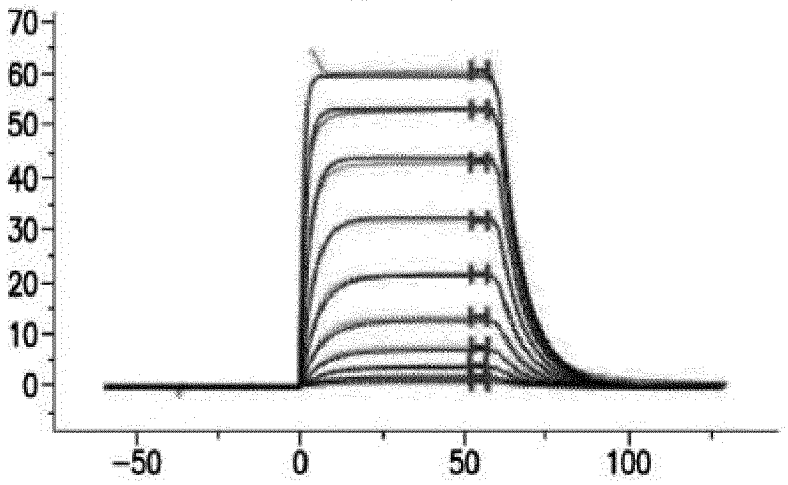
ФИГ. 87


Контроль
Резонансные единицы (RU)
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
−100 0 100 200 300 400 500 600 700 800 900
Время (сек.)


pH8, 40°C, 2 недели
Резонансные единицы (RU)
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
−100 0 100 200 300 400 500 600 700 800 900
Время (сек.)

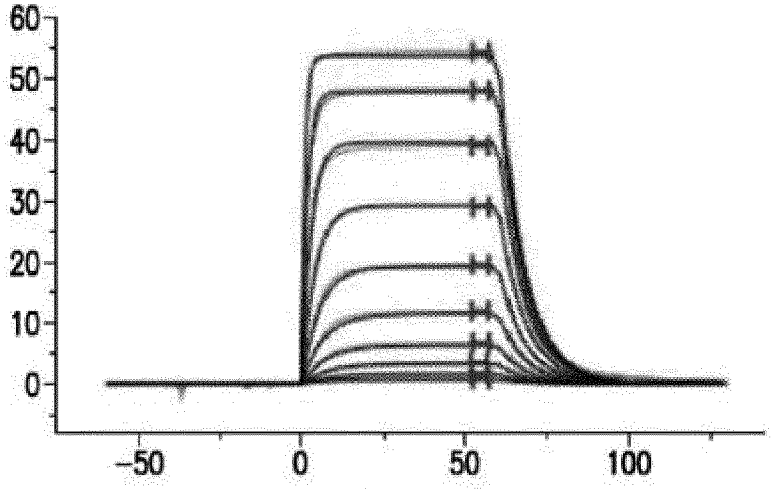
ФИГ. 88

Контроль




Группа 14
1602, pH 5, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

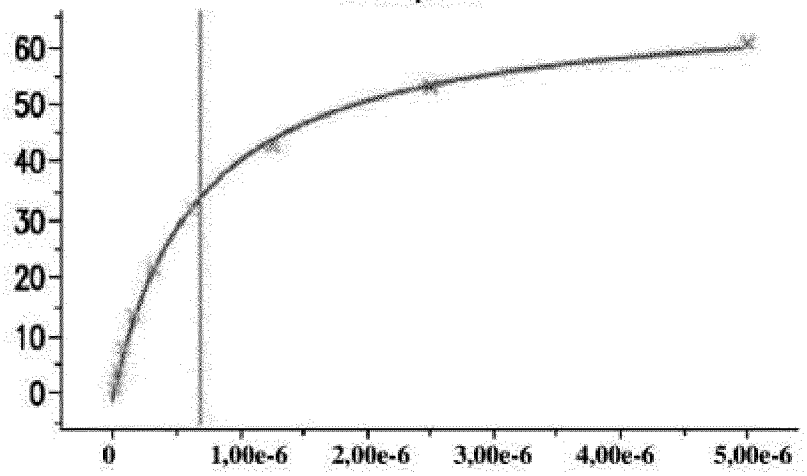
pH5, 40°C, 2 недели




Группа 13
1602, pH 5, 2 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

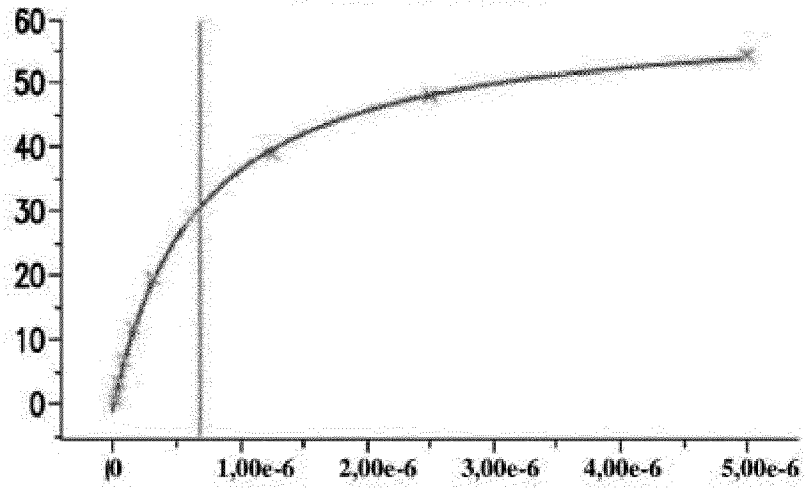
ФИГ. 89

Контроль



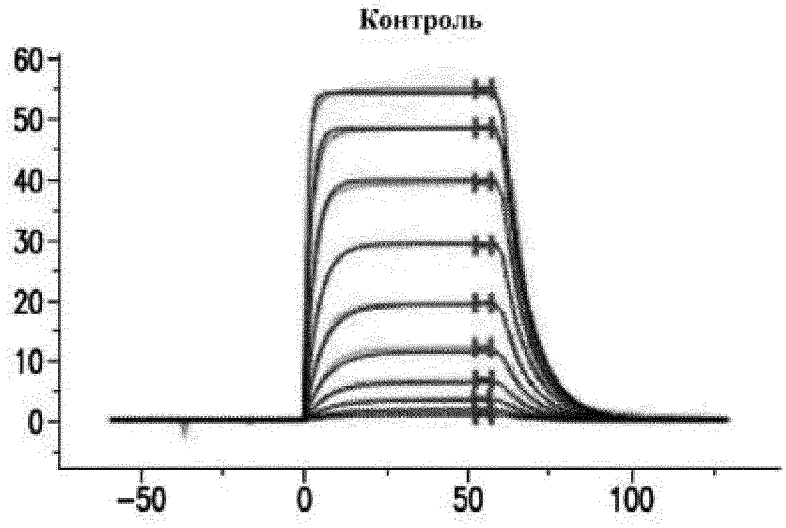

Группа 14
1602, pH 5, контроль; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

pH5, 40°C, 2 недели

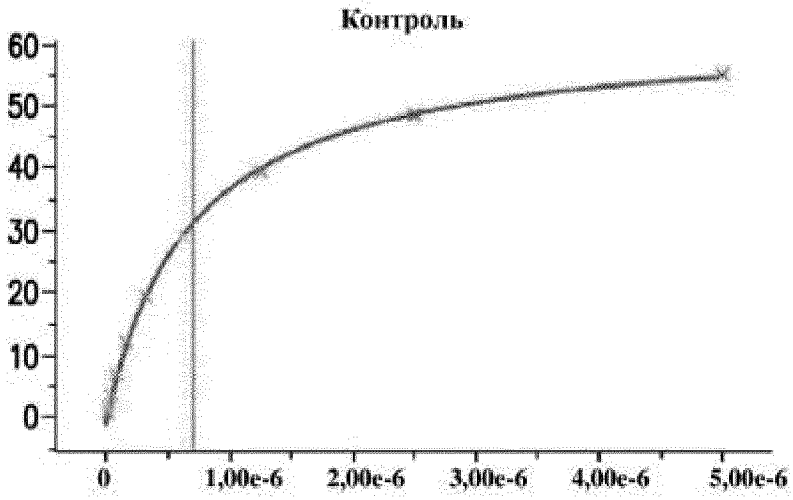



Группа 13
1602, pH 5, 2 недели; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

ФИГ. 89 продолжение



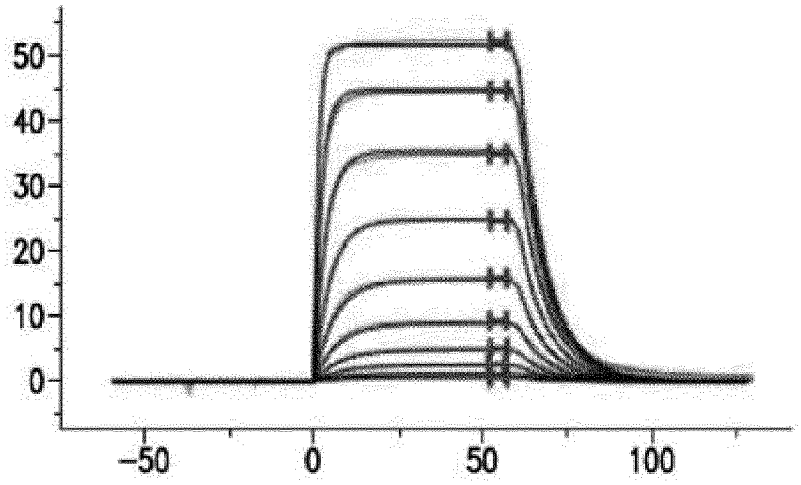

Группа 16
1602, pH 8, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1




Группа 16
1602, pH 8, контроль; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

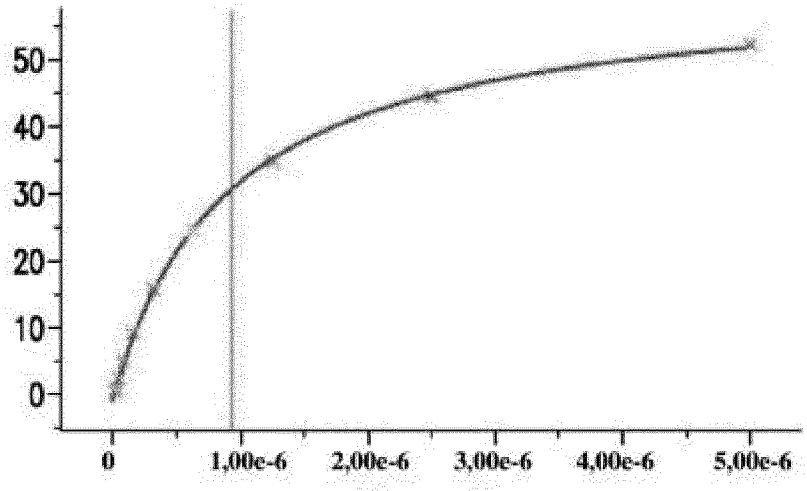
ФИГ. 90

pH8, 40°C, 2 недели




Группа 15
1602, pH 8, 2 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

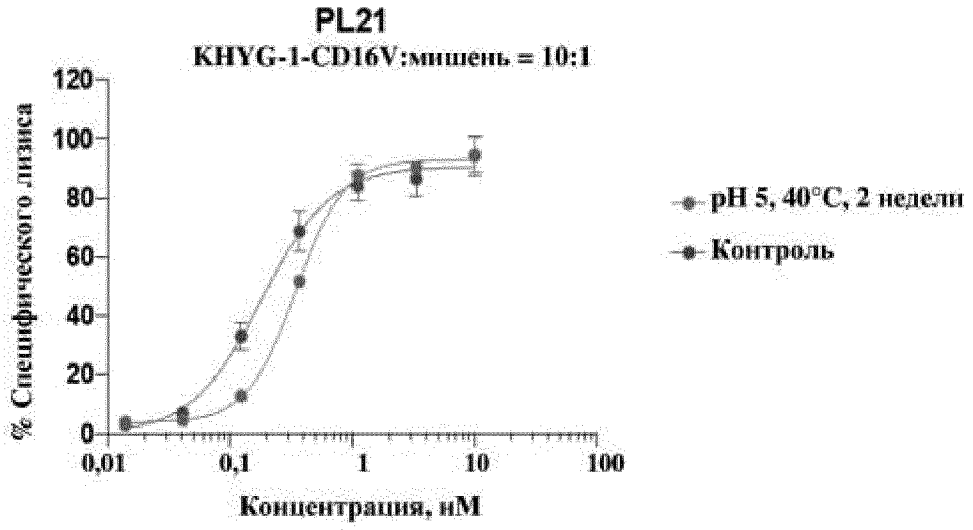
pH8, 40°C, 2 недели



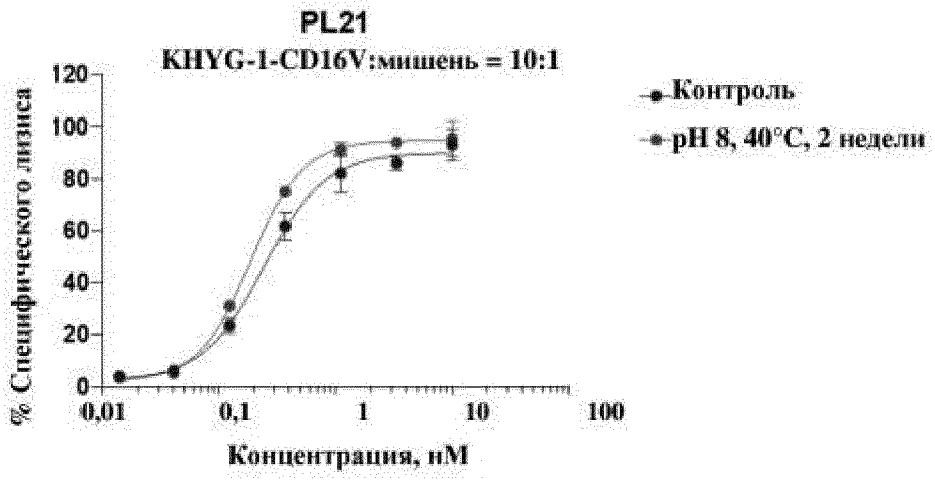

Группа 15
1602, pH 8, 2 недели; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

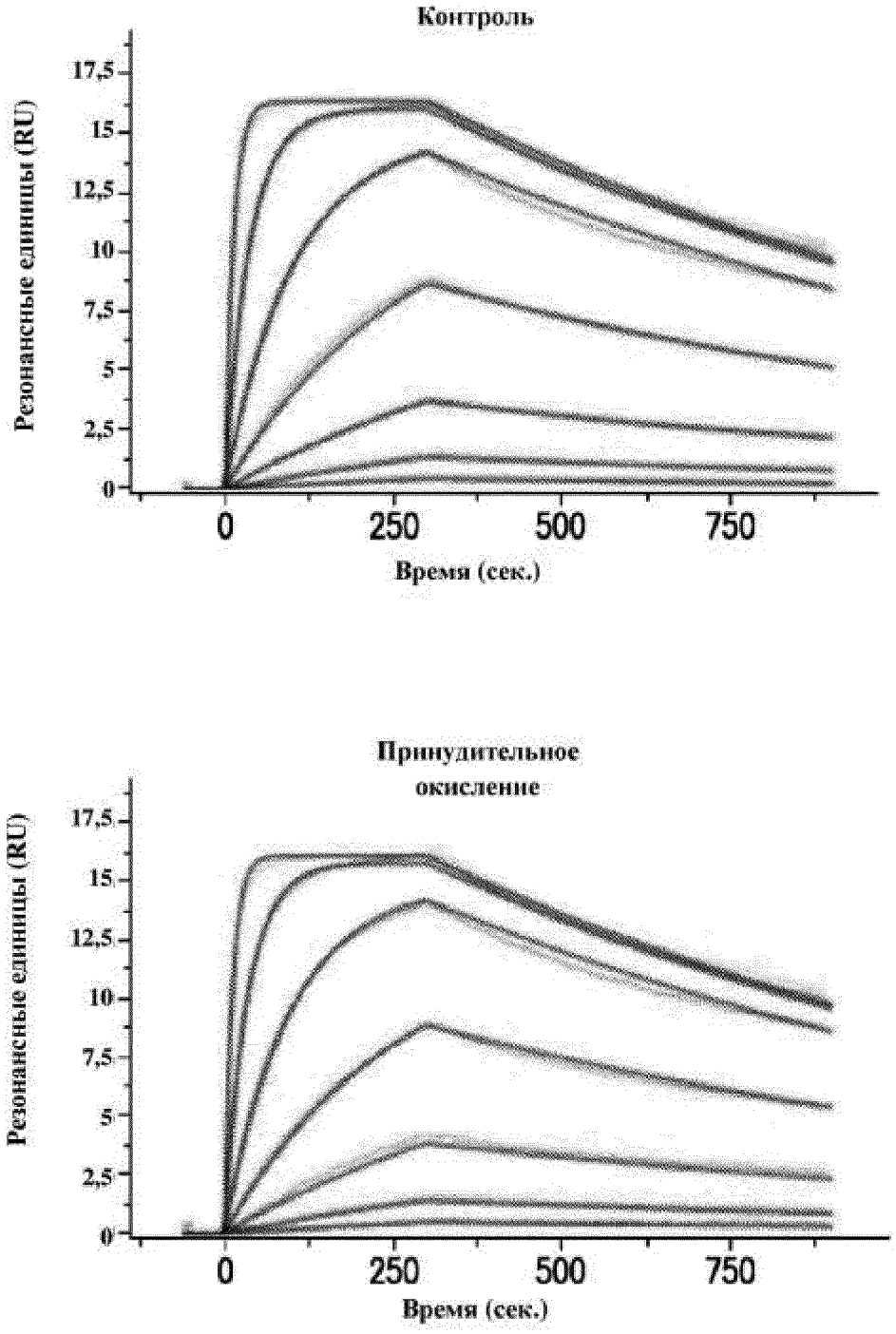
ФИГ. 90 продолжение

ФИГ. 91


PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
120
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
pH 5, 40°C, 2 недели
Контроль

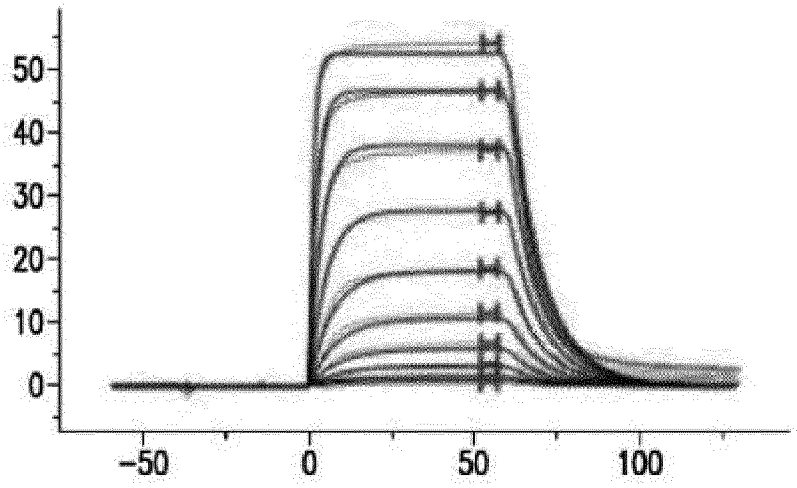
ФИГ. 92


PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
120
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
Контроль
pH 8, 40°C, 2 недели


Контроль
Резонансные единицы (RU)
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
0
250
500
750
Время (сек.)
Принудительное окисление
Резонансные единицы (RU)
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
0
250
500
750
Время (сек.)

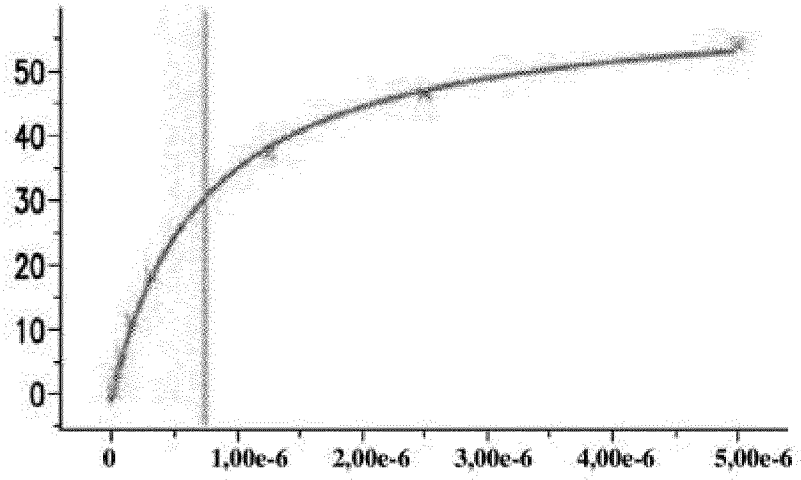
ФИГ. 93

Контроль



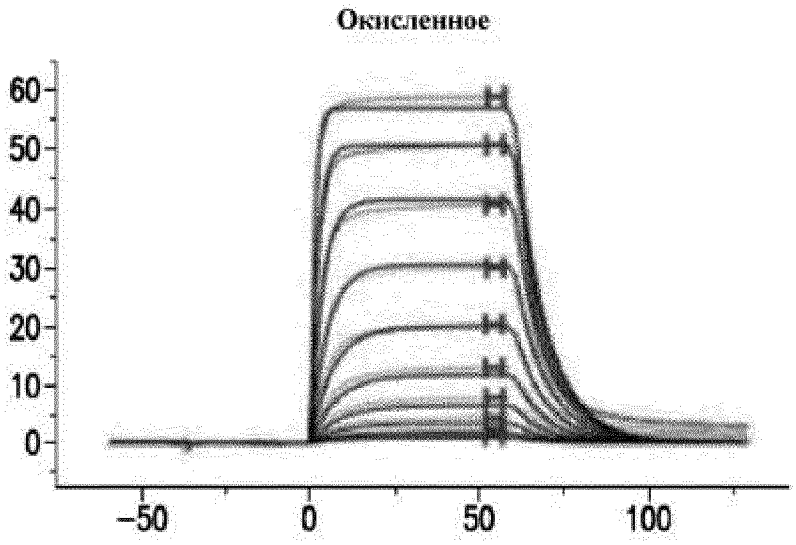

Группа 4
Окисление, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

Контроль

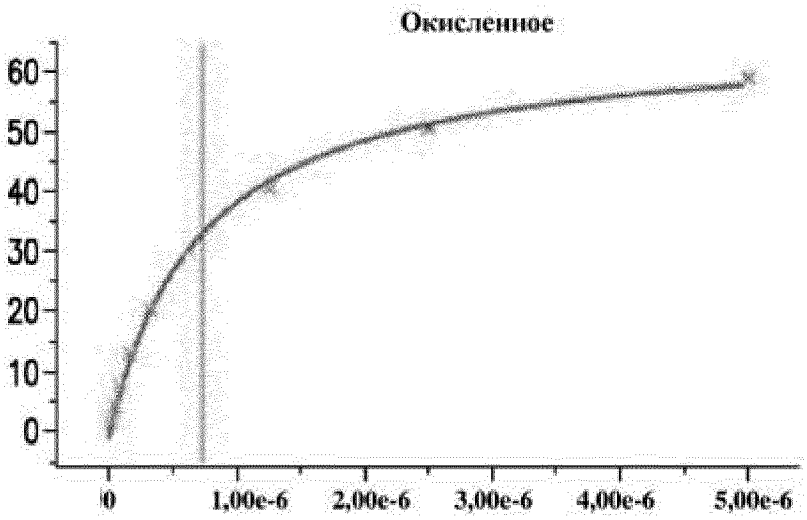



Группа 4
Окисление, контроль; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

ФИГ. 94



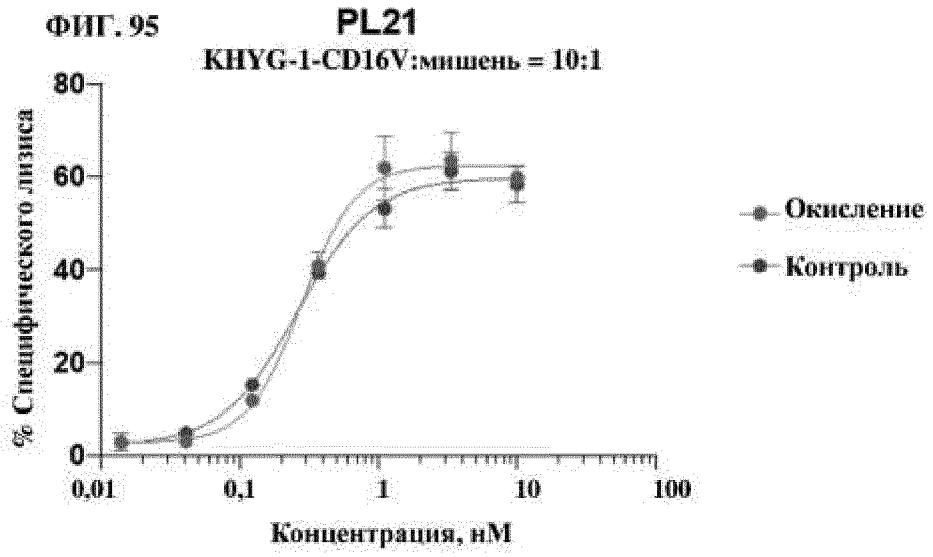

Группа 1
Принудительное окисление; mFc-hNKG2D; связывание 1:1



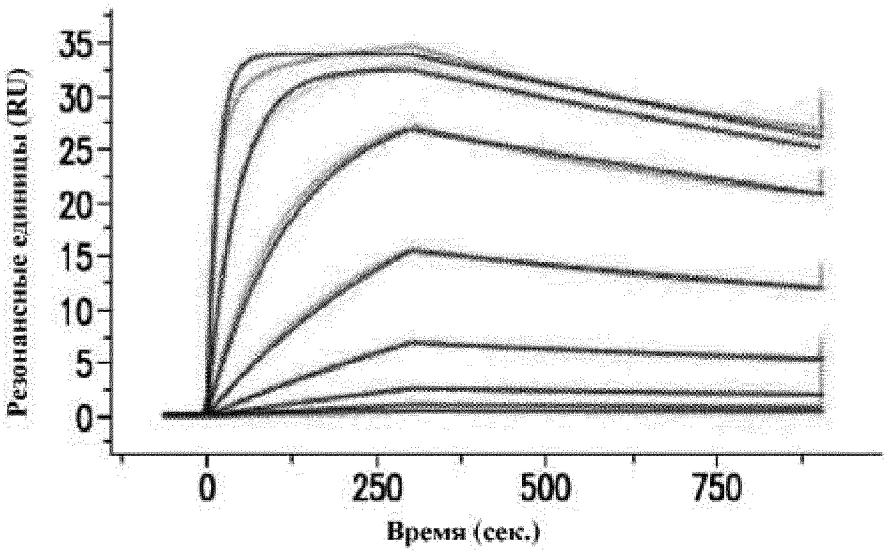

Группа 1
Принудительное окисление; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

ФИГ. 94 продолжение

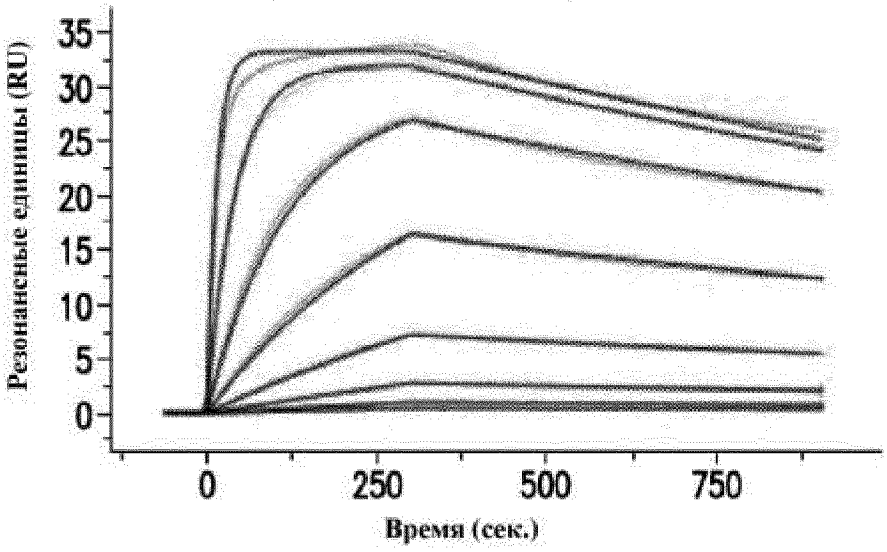
ФИГ. 95


PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
Окисление
Контроль

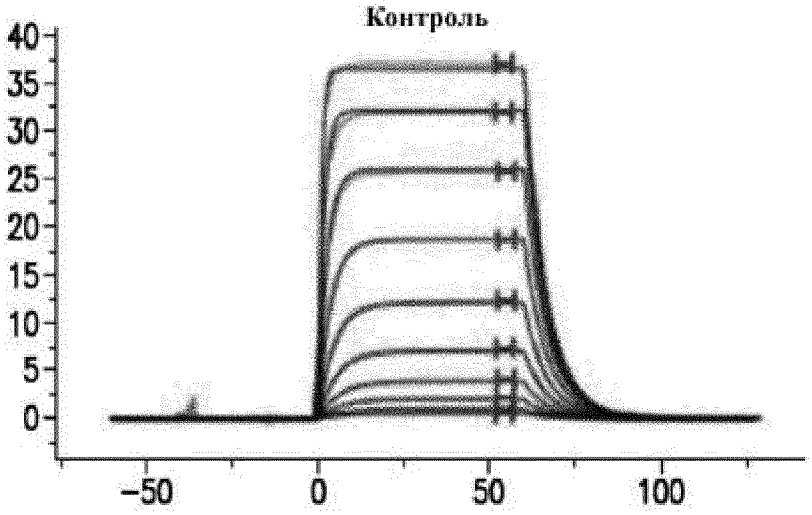
Контроль



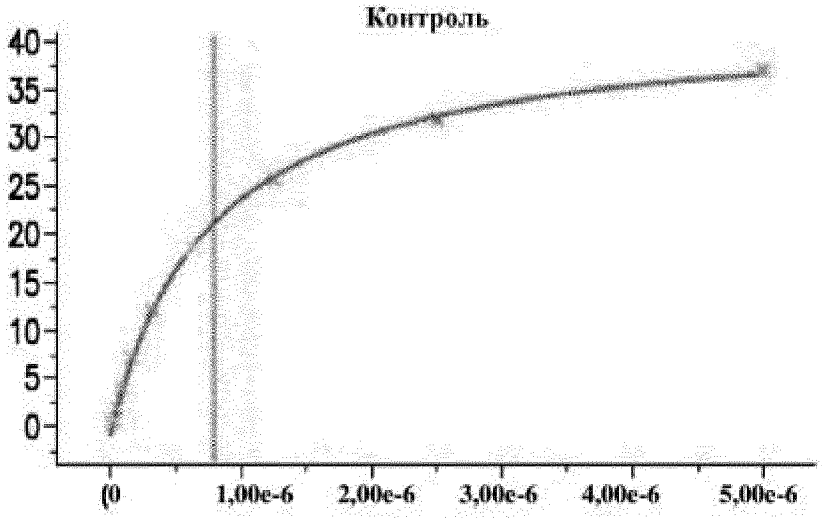

Выдерживание при низком уровне pH




ФИГ. 96



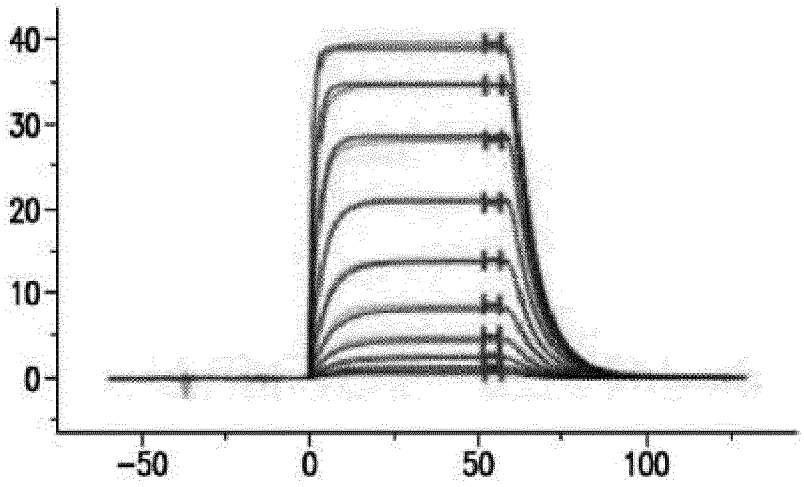

**Группа 11**
**Выдерживание при низком уровне pH, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1**




**Группа 11**
**Выдерживание при низком уровне pH, контроль; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии**

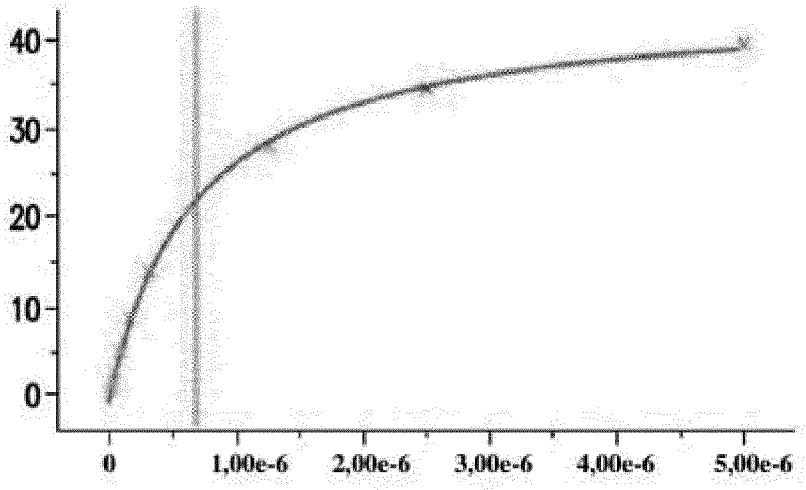
**ФИГ. 97**

Выдерживание при низком уровне pH



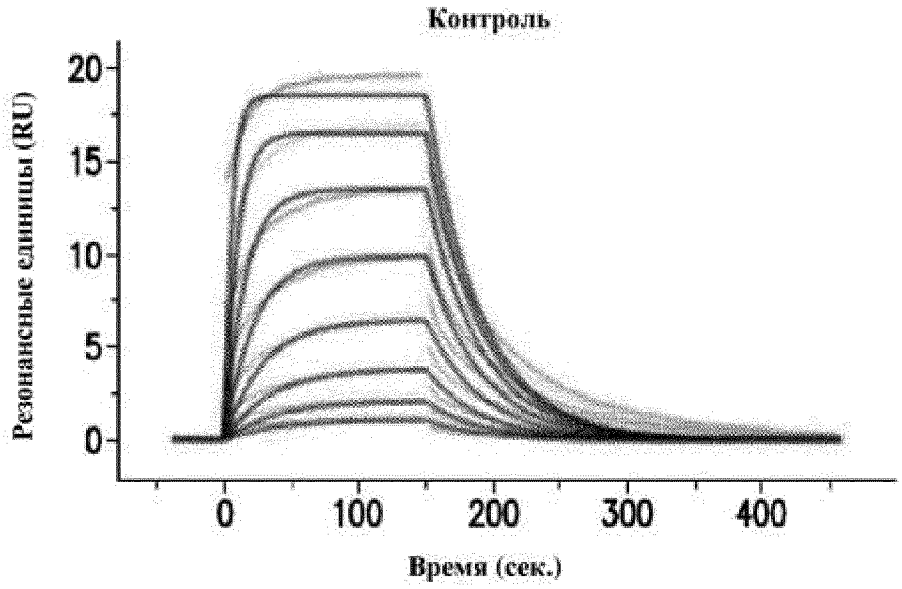

Группа 8
Выдерживание при низком уровне pH; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

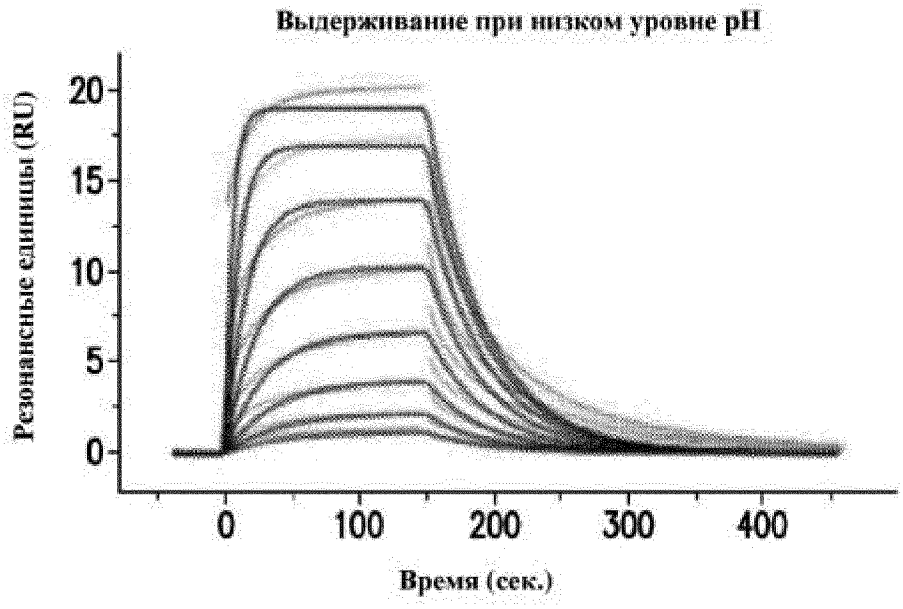
Выдерживание при низком уровне pH




Группа 8
Выдерживание при низком уровне pH; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

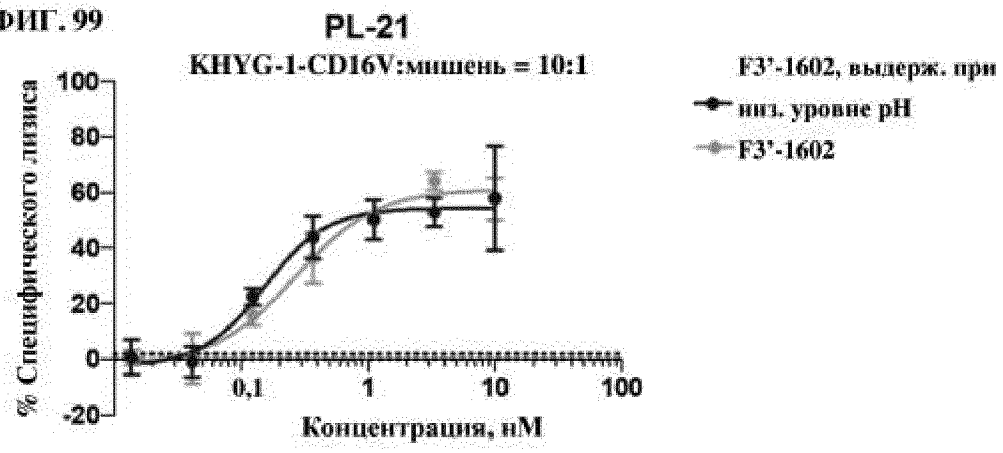
ФИГ. 97 продолжение


Контроль
Резонансные единицы (RU)
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
Время (сек.)

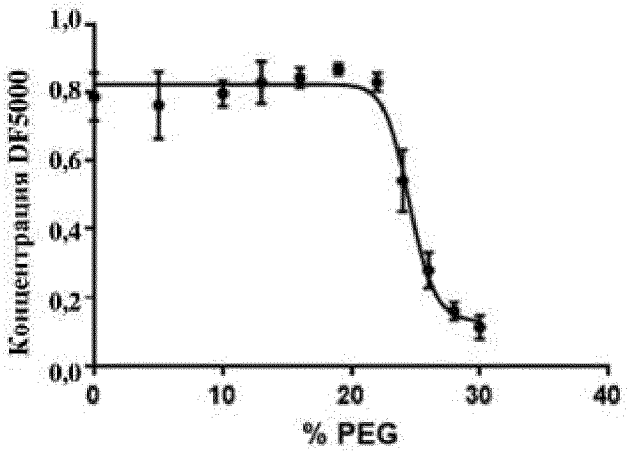

Выдерживание при низком уровне pH
Резонансные единицы (RU)
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
Время (сек.)

ФИГ. 98

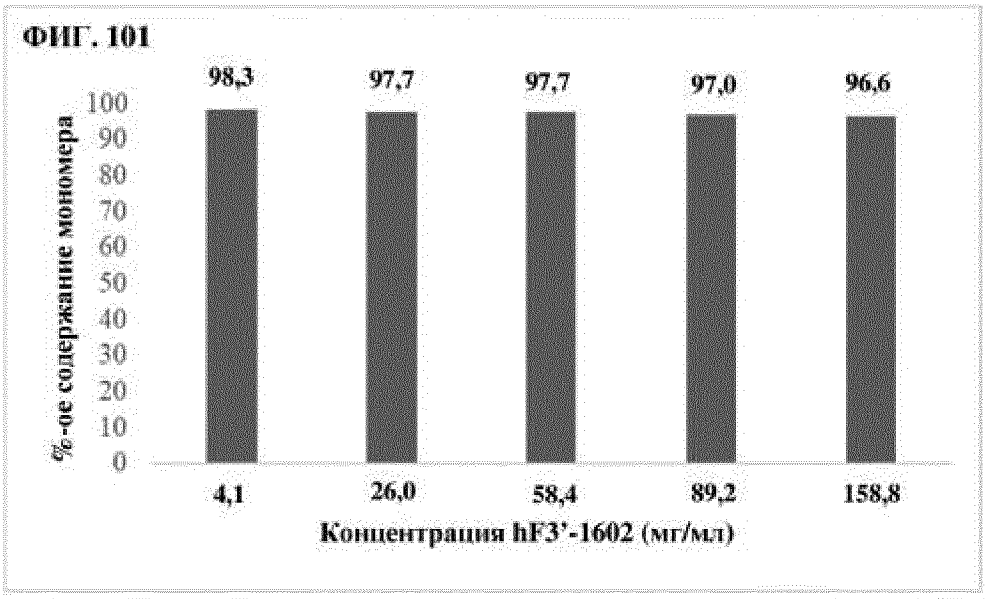
ФИГ. 99



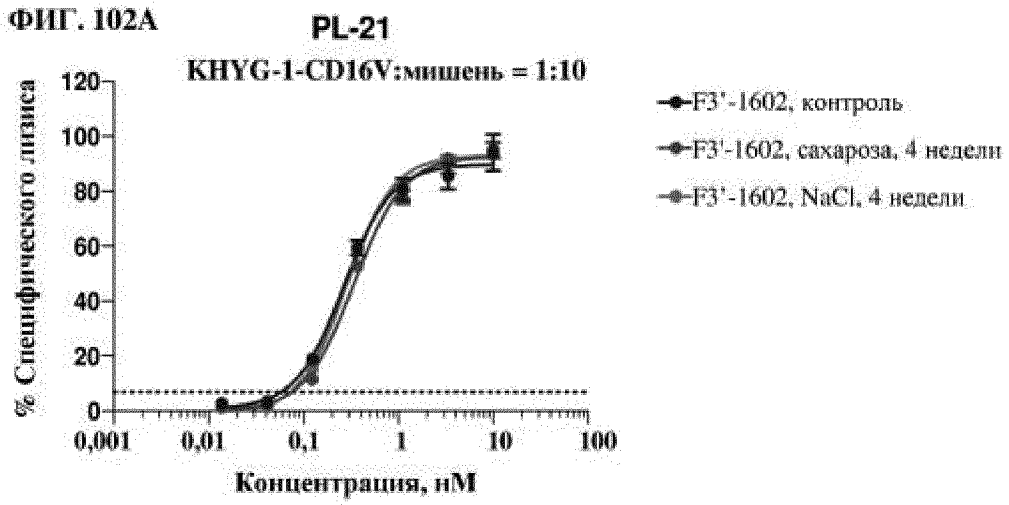

ФИГ. 100



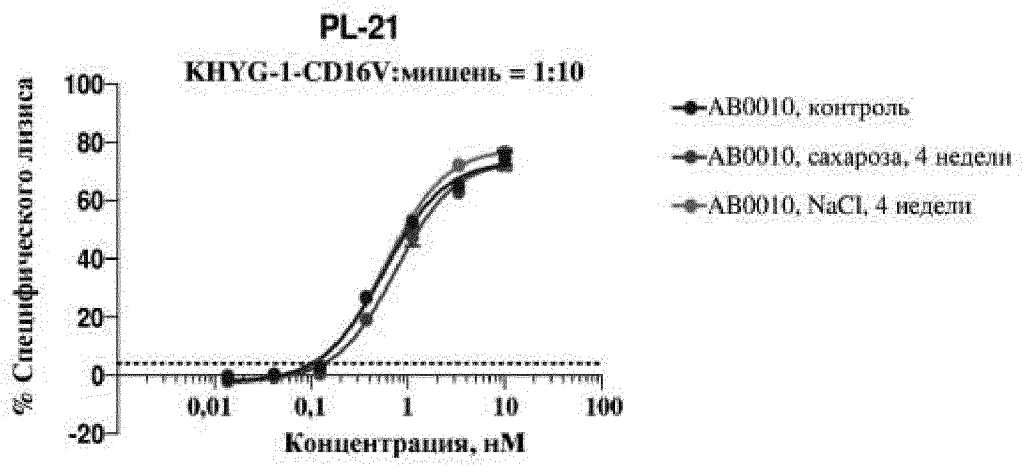
ФИГ. 101


98,3
97,7
97,7
97,0
96,6
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%-ое содержание мономера
4,1
26,0
58,4
89,2
158,8
Концентрация hF3'-1602 (мг/мл)

ФИГ. 102A



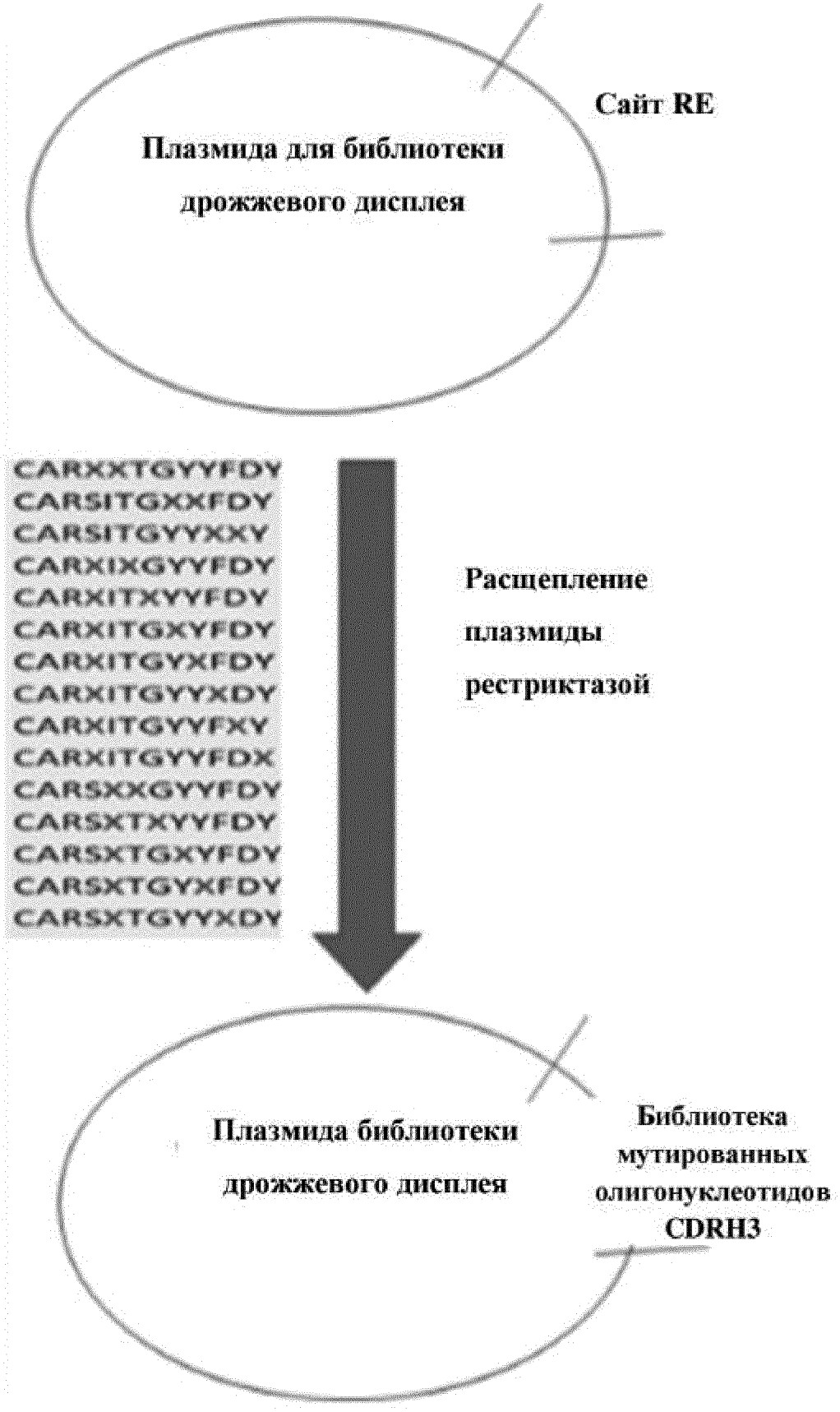

ФИГ. 102B

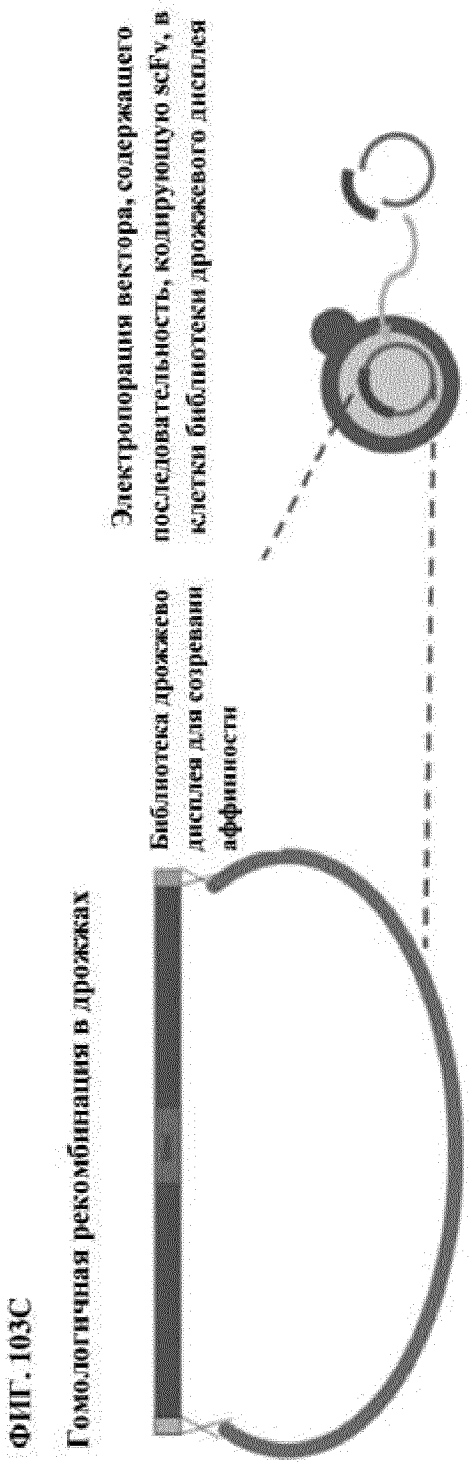


ФИГ. 103A

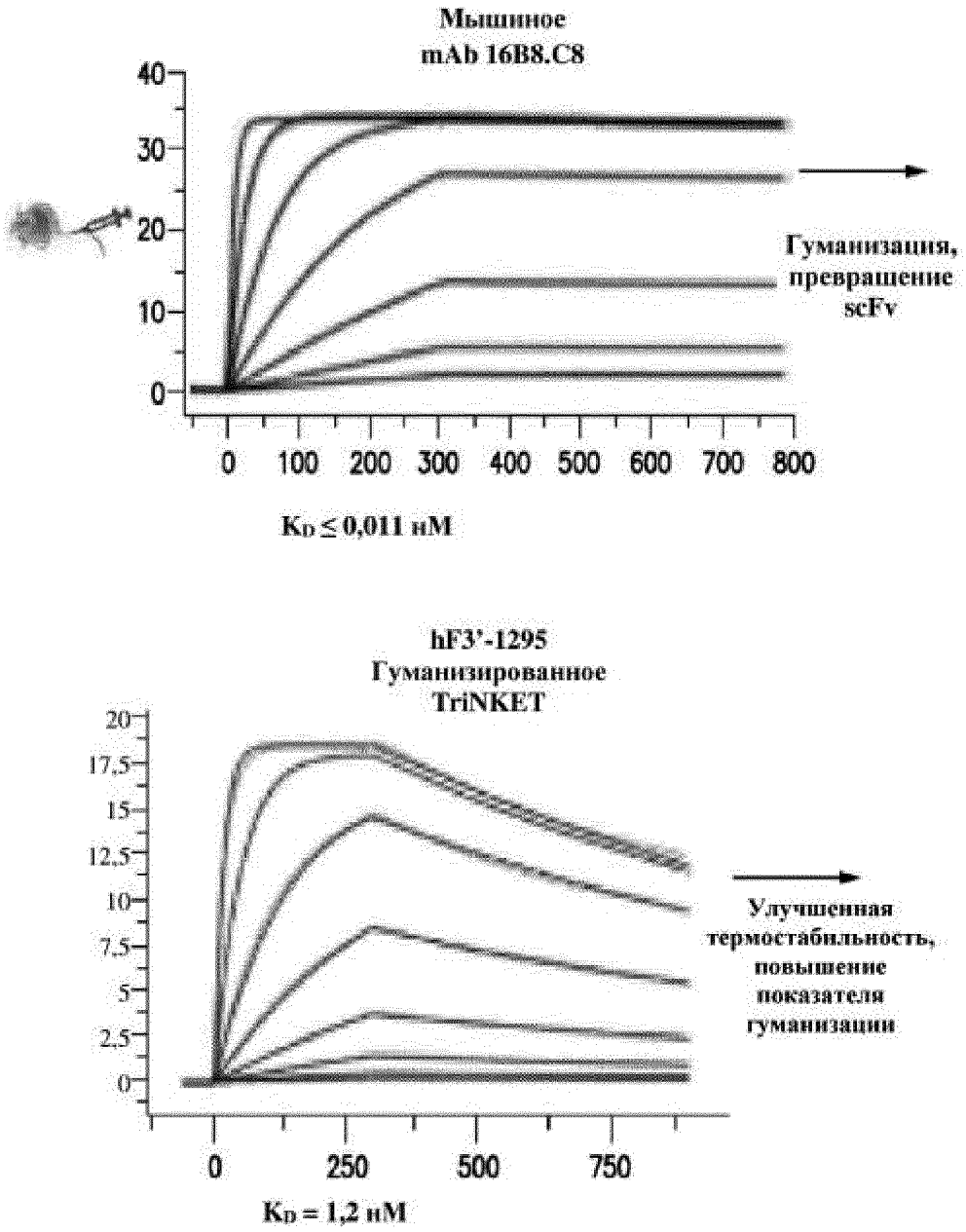

CDRH3
scFv
Вставка сайта рестрикции
scFv
Уникальные сайты для рестриктаз (RE)
Клонирование scFv в плазмиду библиотеки дрожжевого дисплея
Сайт RE
Плазмида для библиотеки дрожжевого дисплея
Подтверждение последовательности

ФИГ. 103B

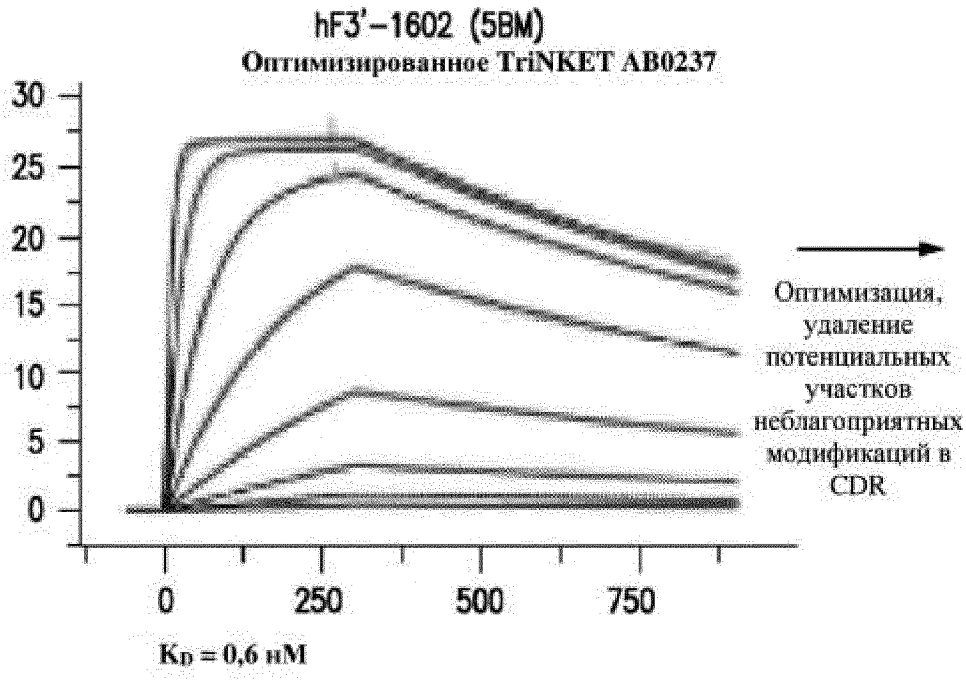

Сайт RE
Плазмида для библиотеки дрожжевого дисплея
CARXXTGYYFDY
CARSITGXXFDY
CARSITGYYXXY
CARXIXGYYFDY
CARXITXYYFDY
CARXITGXYFDY
CARXITGYXFDY
CARXITGYYXDY
CARXITGYYFXY
CARXITGYYFDX
CARSXXGYYFDY
CARSXTXYYFDY
CARSXTGXYFDY
CARSXTGYXFDY
CARSXTGYYXDY
Расщепление плазмиды рестриктазой
Плазмида библиотеки дрожжевого дисплея
Библиотека мутированных олигонуклеотидов CDRH3

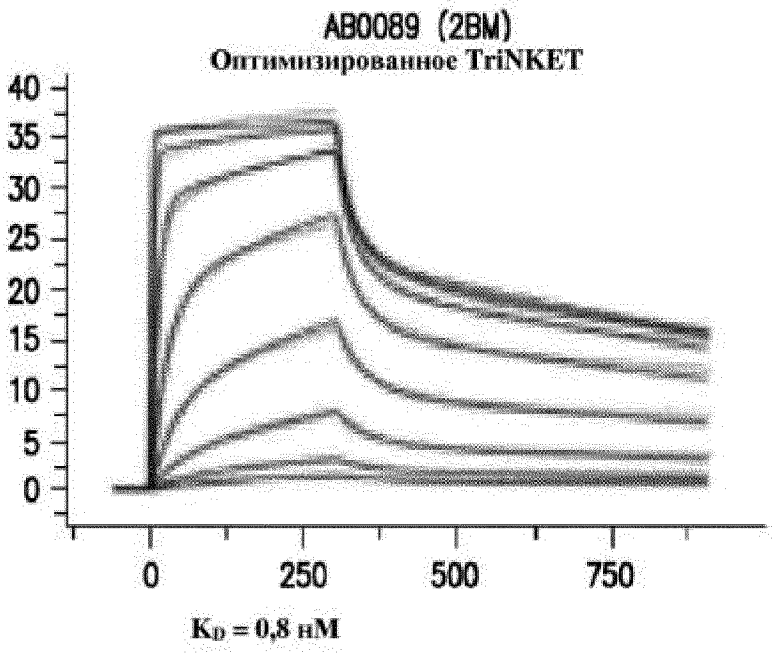

Электропорация вектора, содержащего последовательность, кодирующую scFv, в клетки библиотеки дрожжевого дисплея
Библиотека дрожжево дисплея для созревани аффинности
Гомологичная рекомбинация в дрожжах

ФИГ. 103С

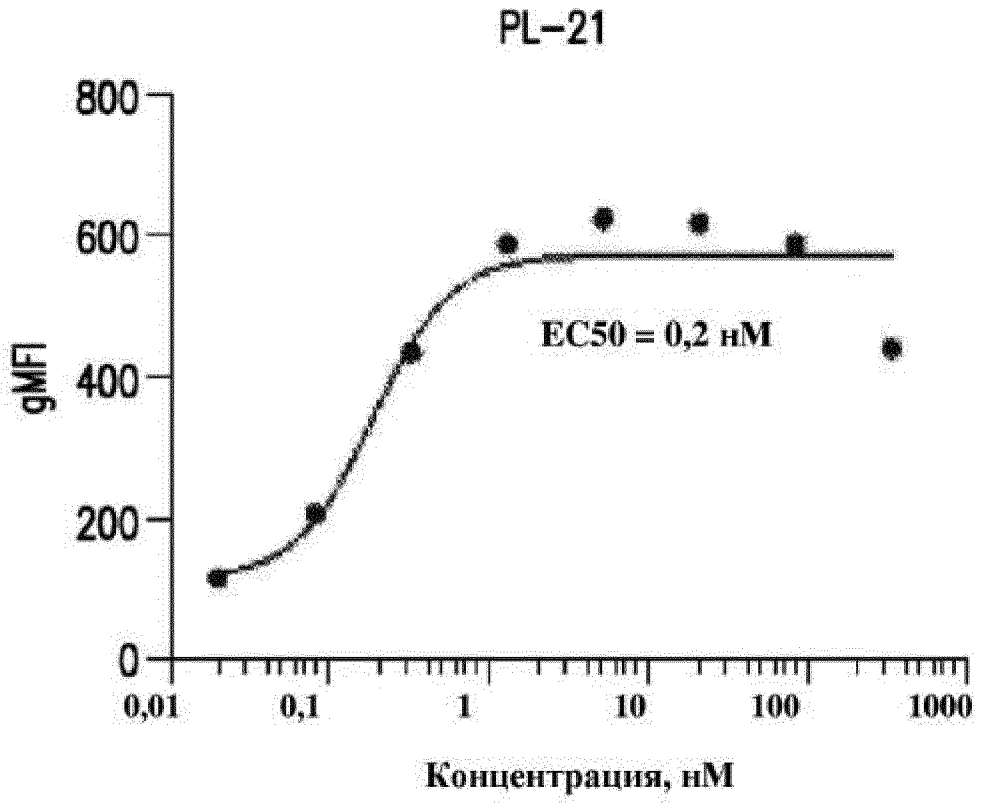

Мышиное
mAb 16B8.C8
40
30
20
10
0
0 100 200 300 400 500 600 700 800
Гуманизация,
превращение
scFv
KD ≤ 0,011 нМ
hF3'-1295
Гуманизированное
TriNKET
20
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
0 250 500 750
Улучшенная
термостабильность,
повышение
показателя
гуманизации
KD = 1,2 нМ

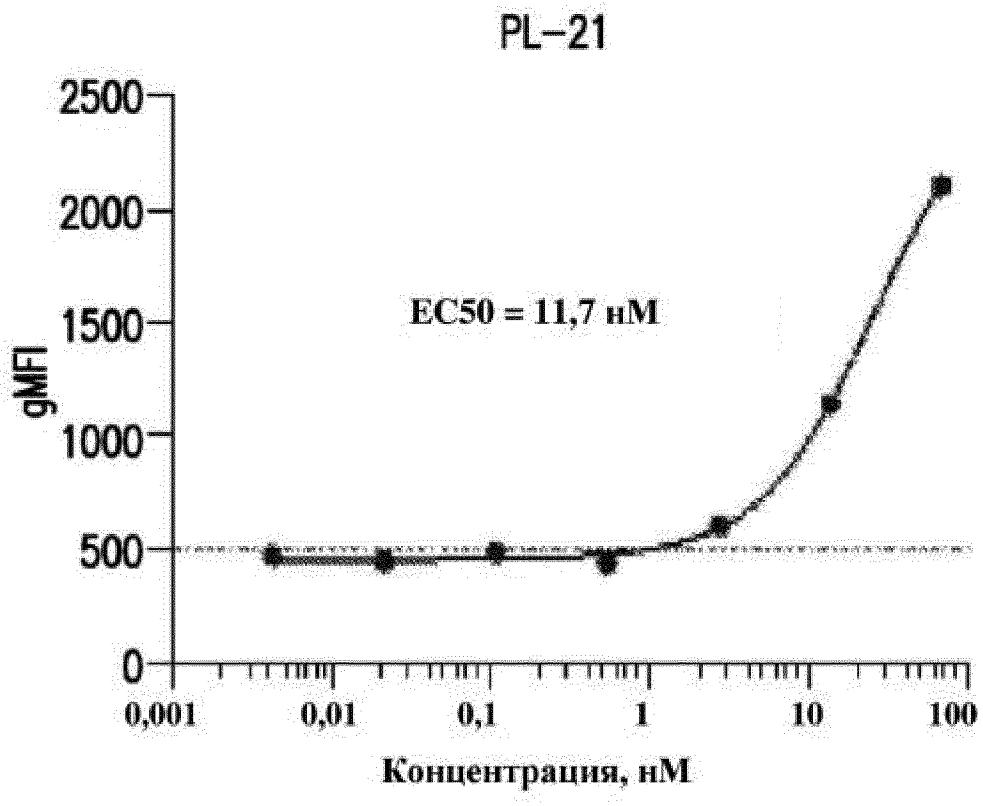
ФИГ. 104



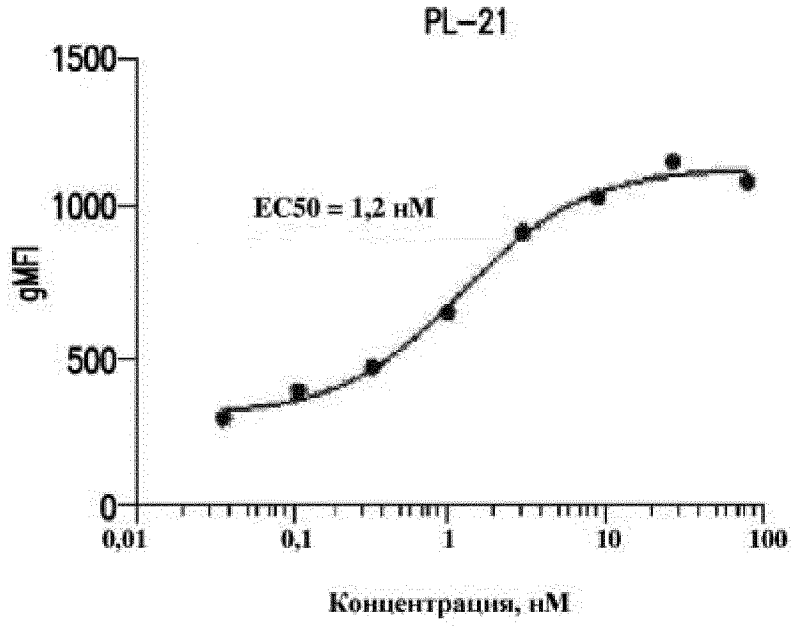



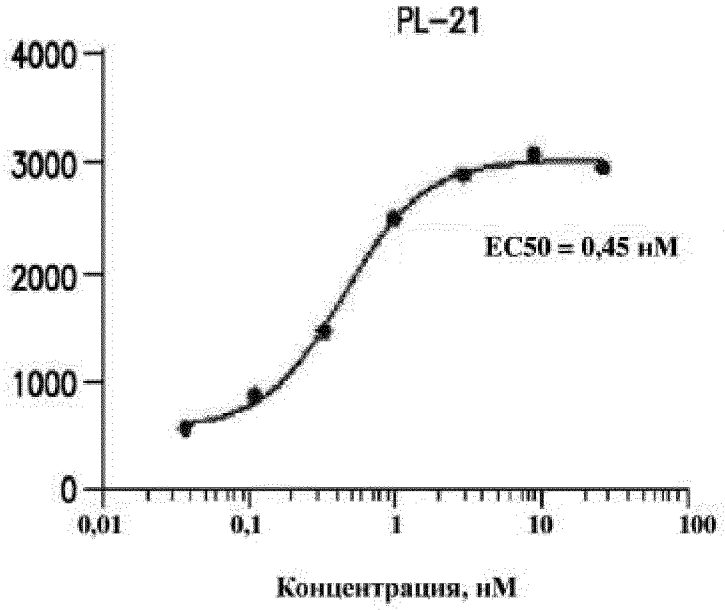

ФИГ. 104 продолжение



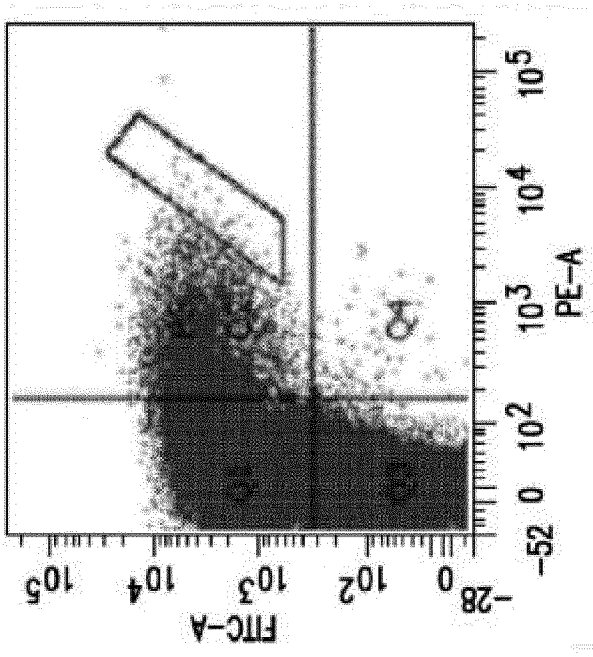




**ФИГ. 104 продолжение**

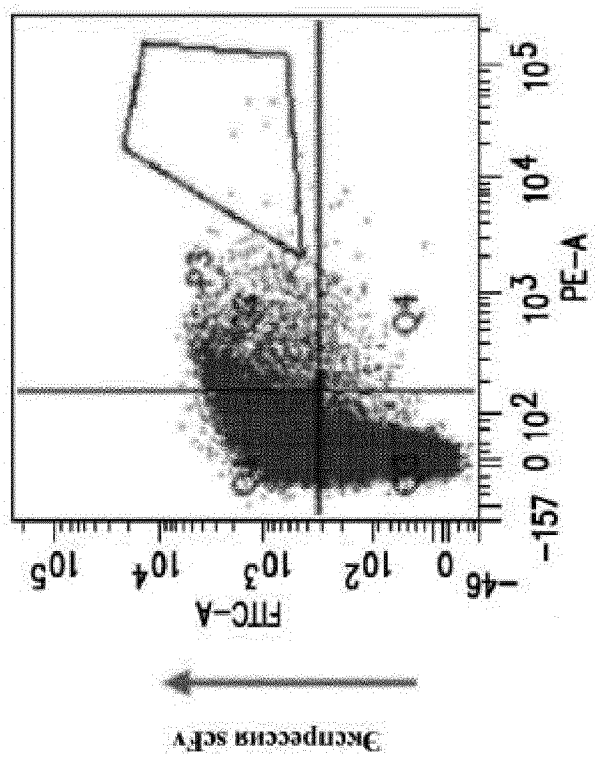


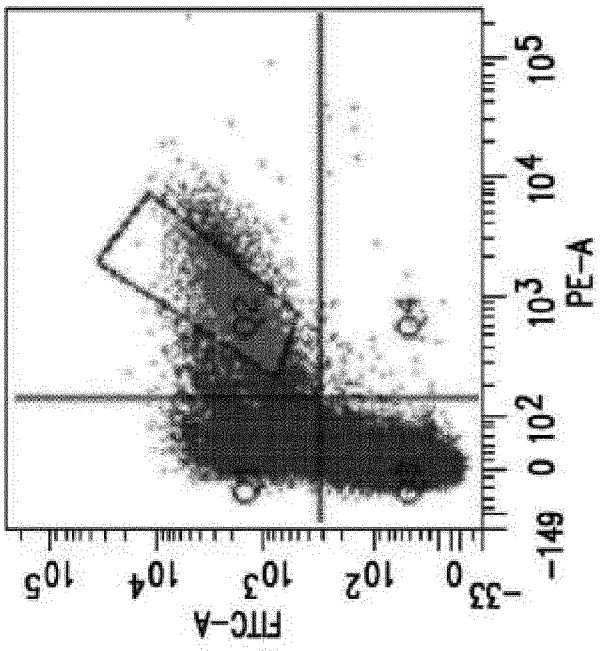

ФИГ. 104 продолжение



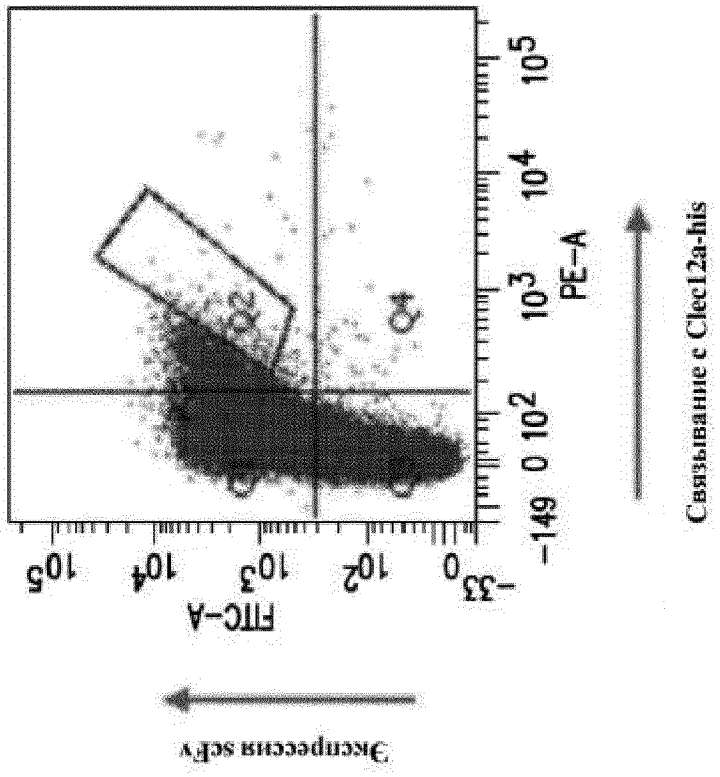

ФИГ. 105B



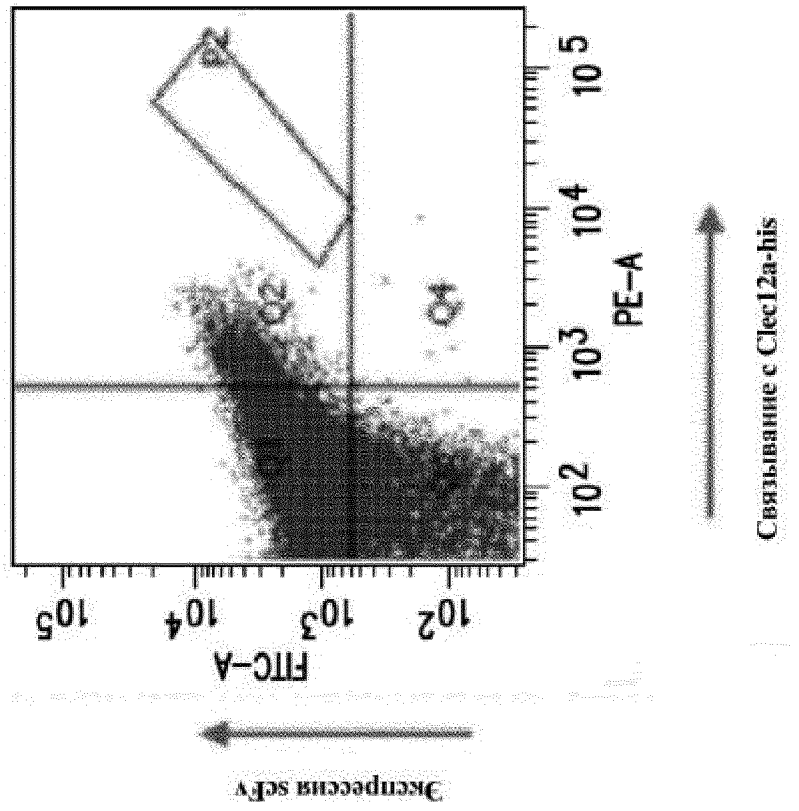

ФИГ. 105A



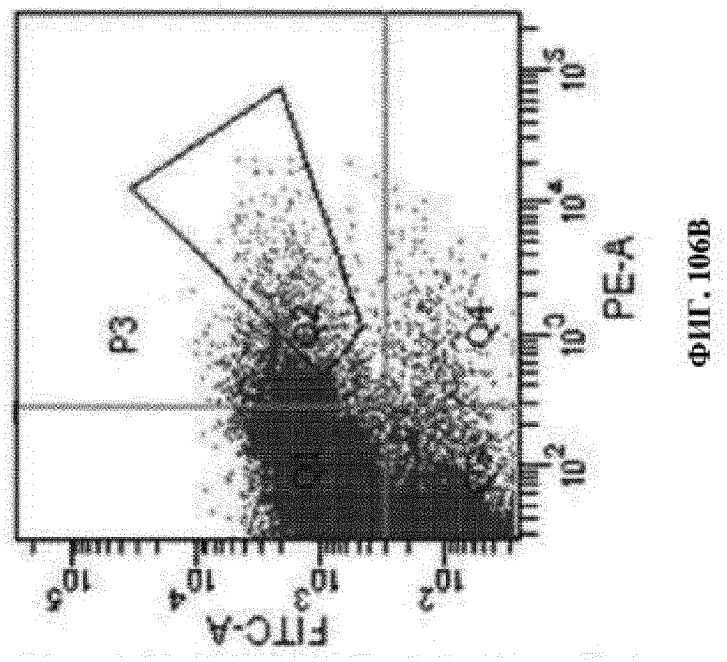

ФИГ. 105D



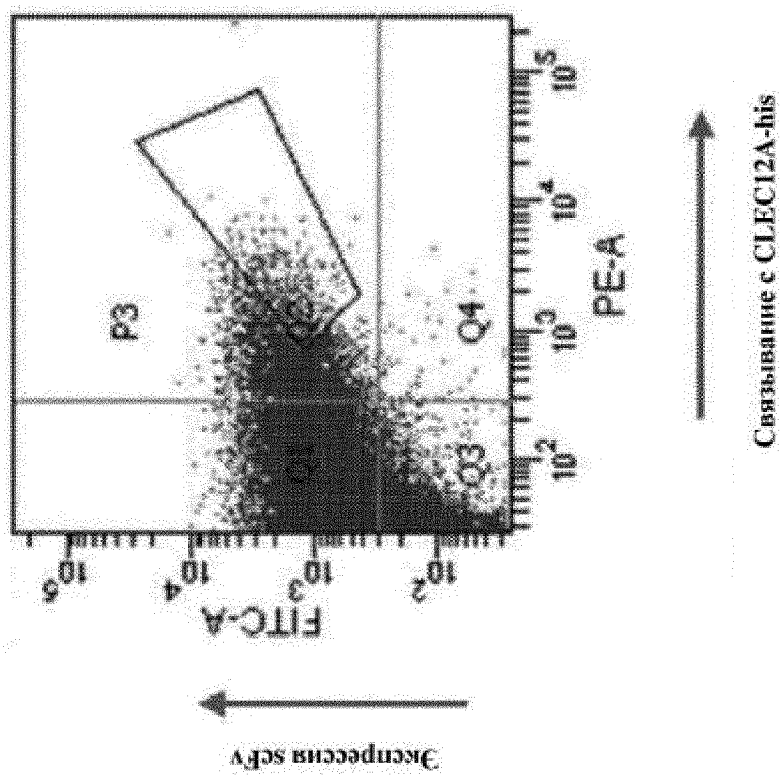

ФИГ. 105C


Q2
Q4
$10^2$
$10^3$
$10^4$
$10^5$
PE–A
FITC–A
Экспрессия scFv
Связывание с Clec12a-his

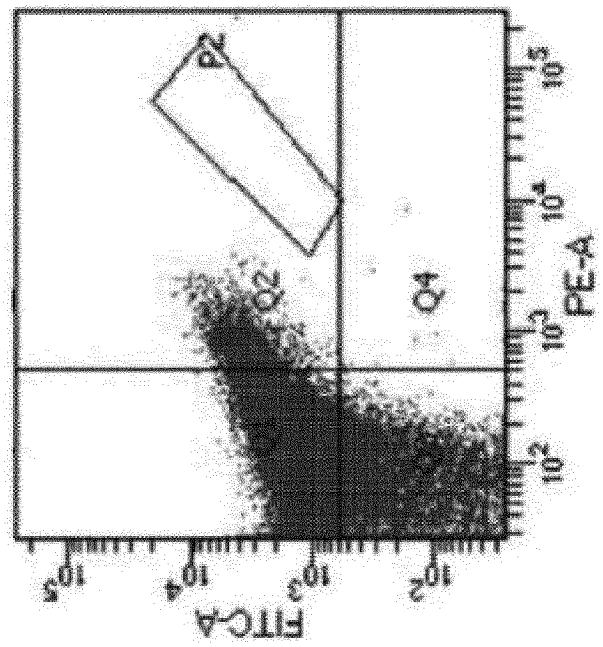
ФИГ. 105E



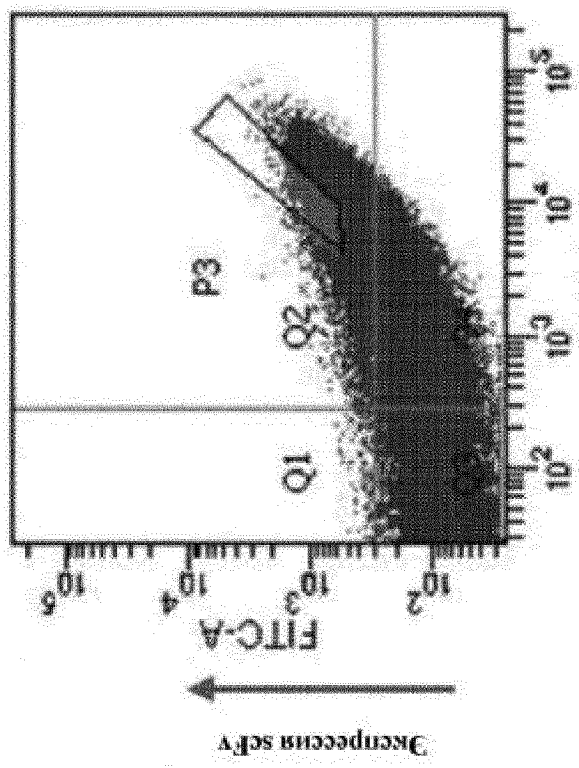

ФИГ. 106B



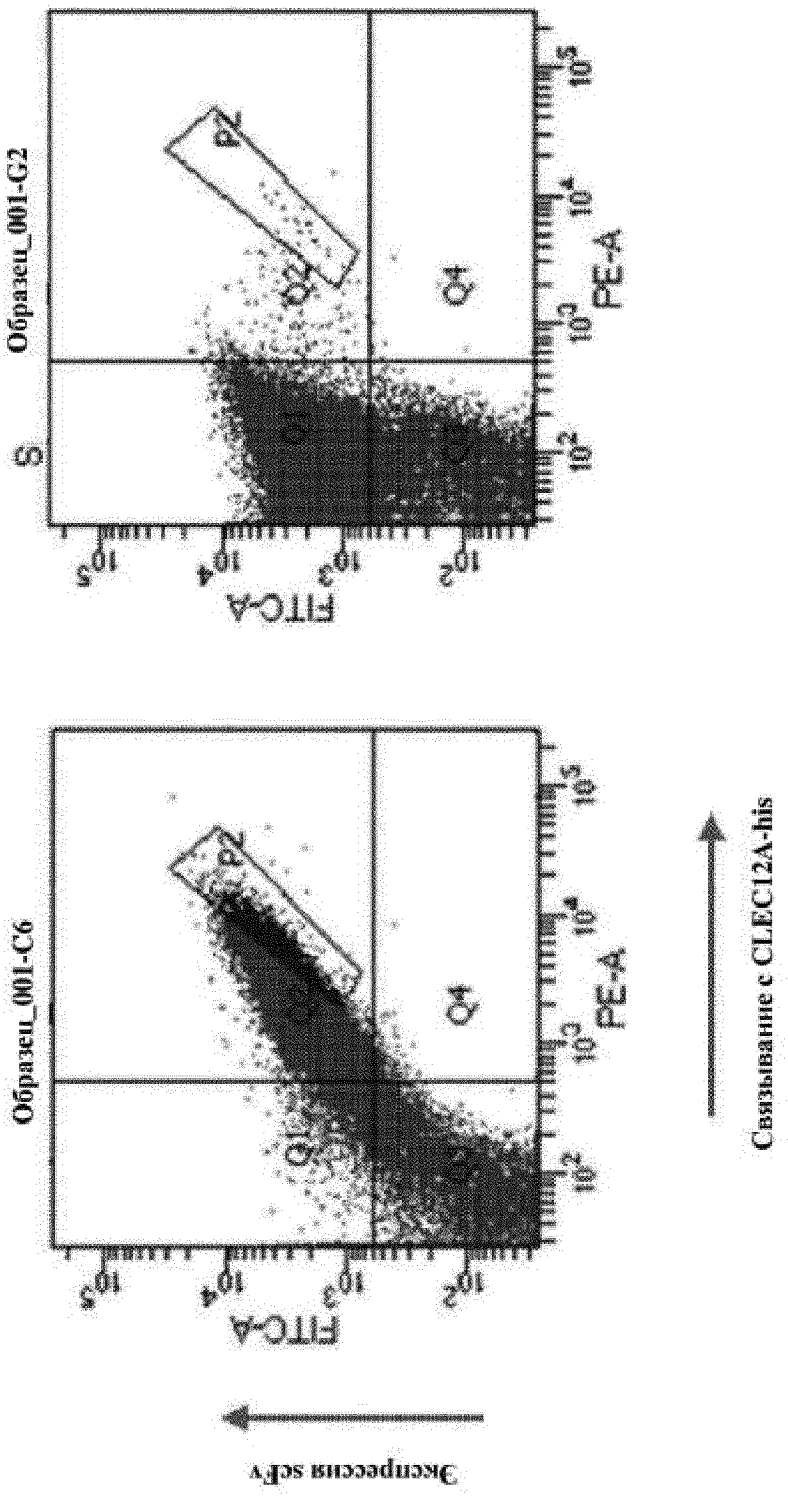

ФИГ. 106A



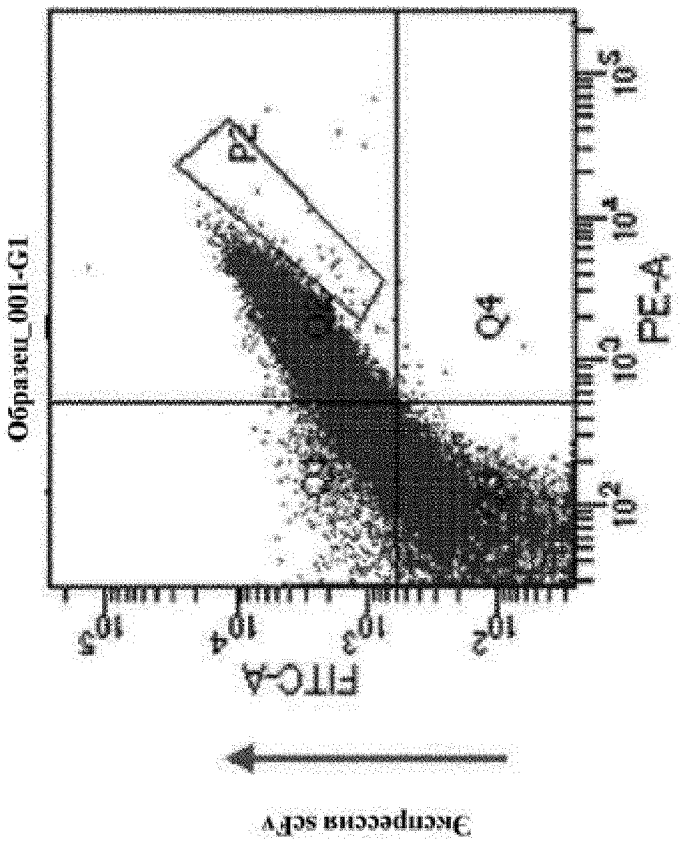

ФИГ. 106D




ФИГ. 106C


Образец_001-G2
Образец_001-C6
FITC-A
PE-A
P2
Q1
Q2
Q3
Q4
Связывание с CLEC12A-his
Экспрессия scFv

ФИГ. 107



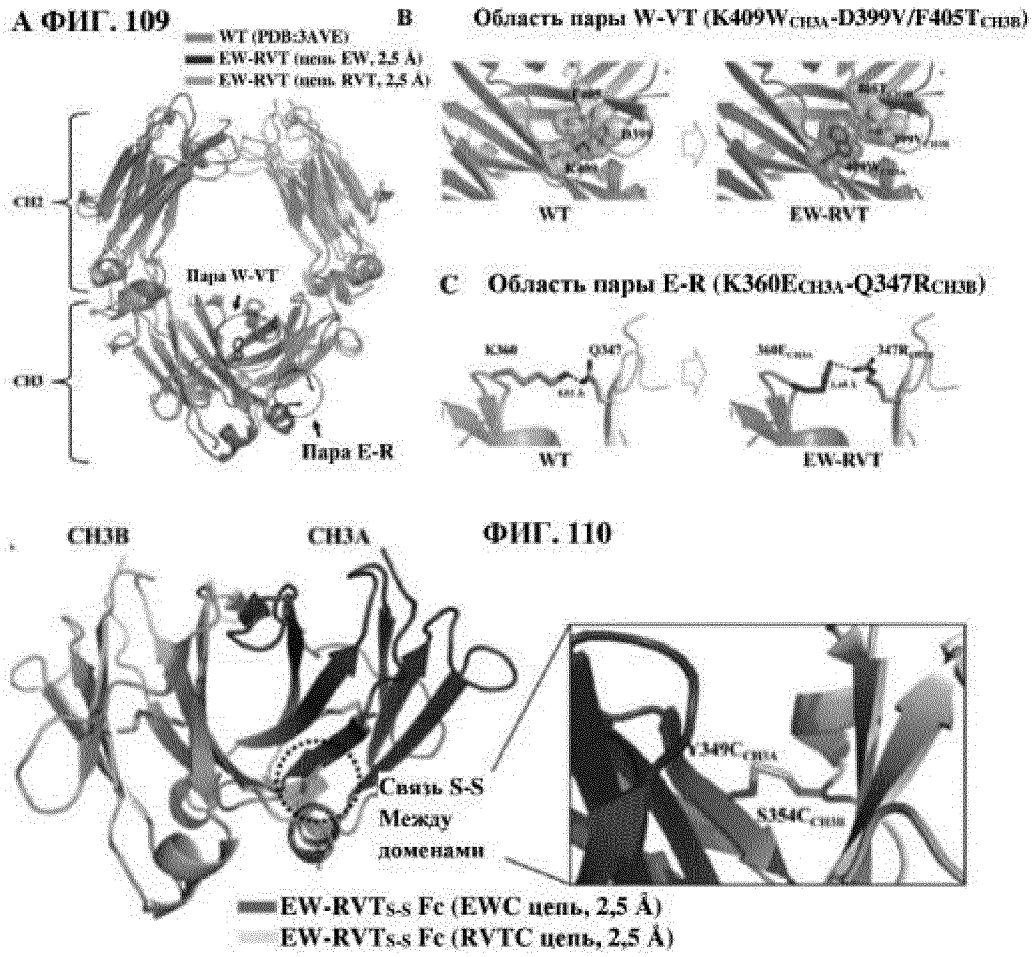

ФИГ. 107 продолжение

| | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
|---|---|---|---|
| pET1596 | GFSLTNY | WSGGK | YDYDDSLDY |
| Клон с улучшенной аффинностью | GFSLTNY | WVGGA | GDYGDSLDY |
| AB0237 | GFSLTNY | WSGGK | YDYDDSLDY |

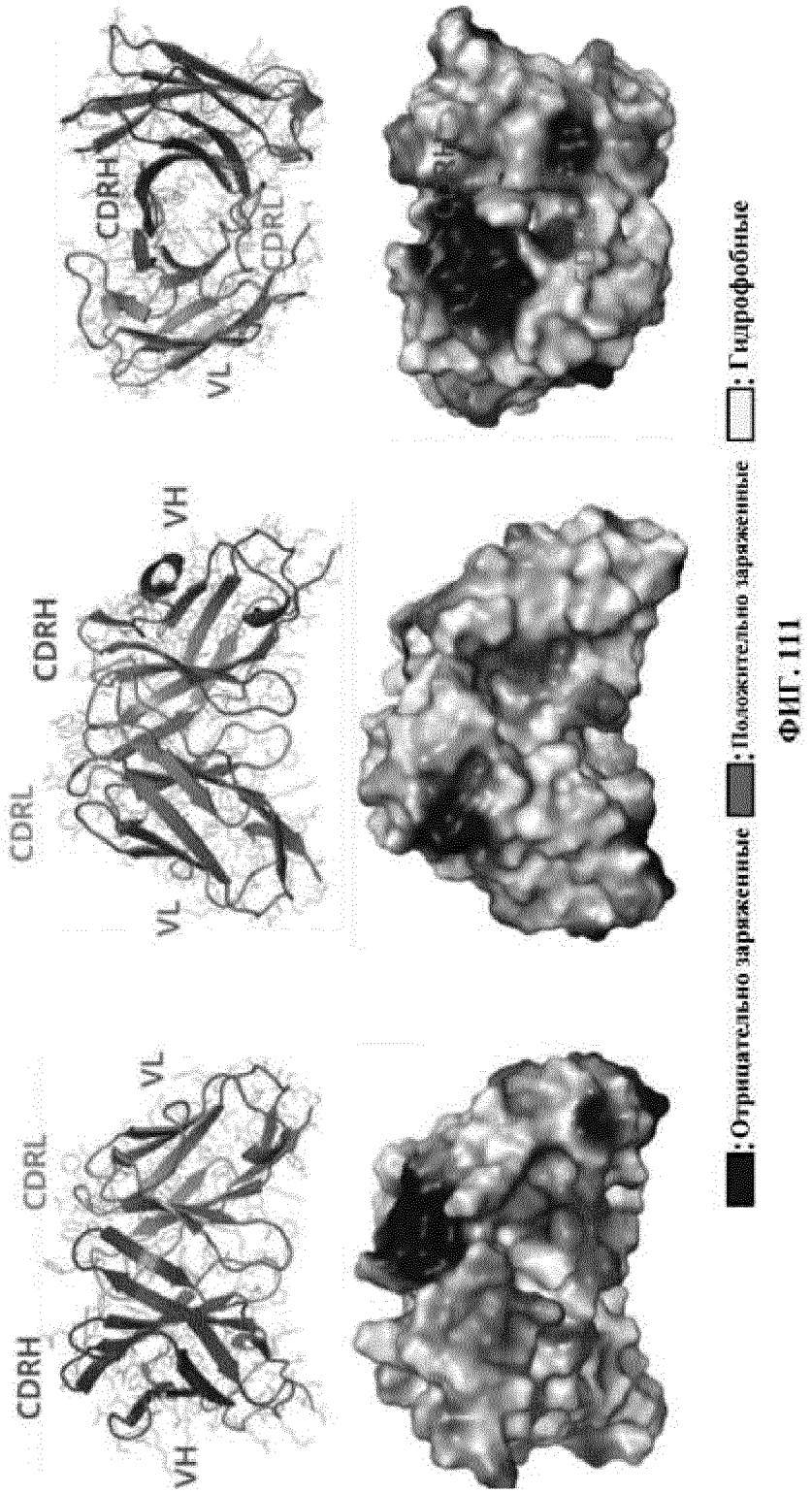
ФИГ. 107 продолжение

**ФИГ. 108**

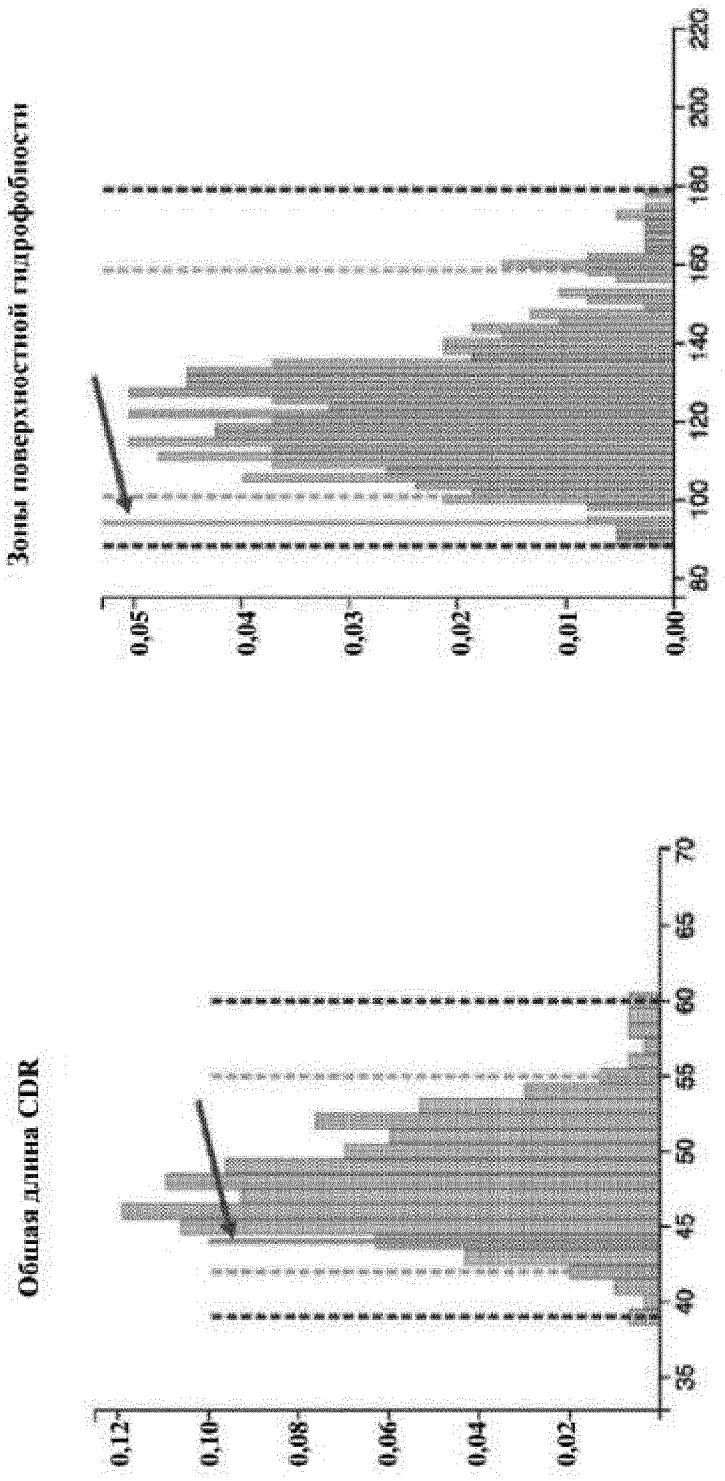

FAB A49(M/L), нацеливающегося на NKG2D
Нацеливающийся на CLEC12A, стабилизированный посредством S-S, гуманизированный и оптимизированный scFv на основе клона 16B8.C8
(H44)C-(L100)C
Y349C обеспечивает образование межцепочечного мостика S-S
S354C обеспечивает образование межцепочечного мостика S-S
Гетеродимеризация Мутации в цепи A: K360E, K409W
Гетеродимеризация Мутации в цепи B: Q347R, D399V, F405T


А ФИГ. 109
WT (PDB:3AVE)
EW-RVT (цепь EW, 2,5 Å)
EW-RVT (цепь RVT, 2,5 Å)
CH2
CH3
Пара W-VT
Пара E-R
B
Область пары W-VT (K409W$_{CH3A}$-D399V/F405T$_{CH3B}$)
WT
EW-RVT
C
Область пары E-R (K360E$_{CH3A}$-Q347R$_{CH3B}$)
K360
Q347
WT
EW-RVT

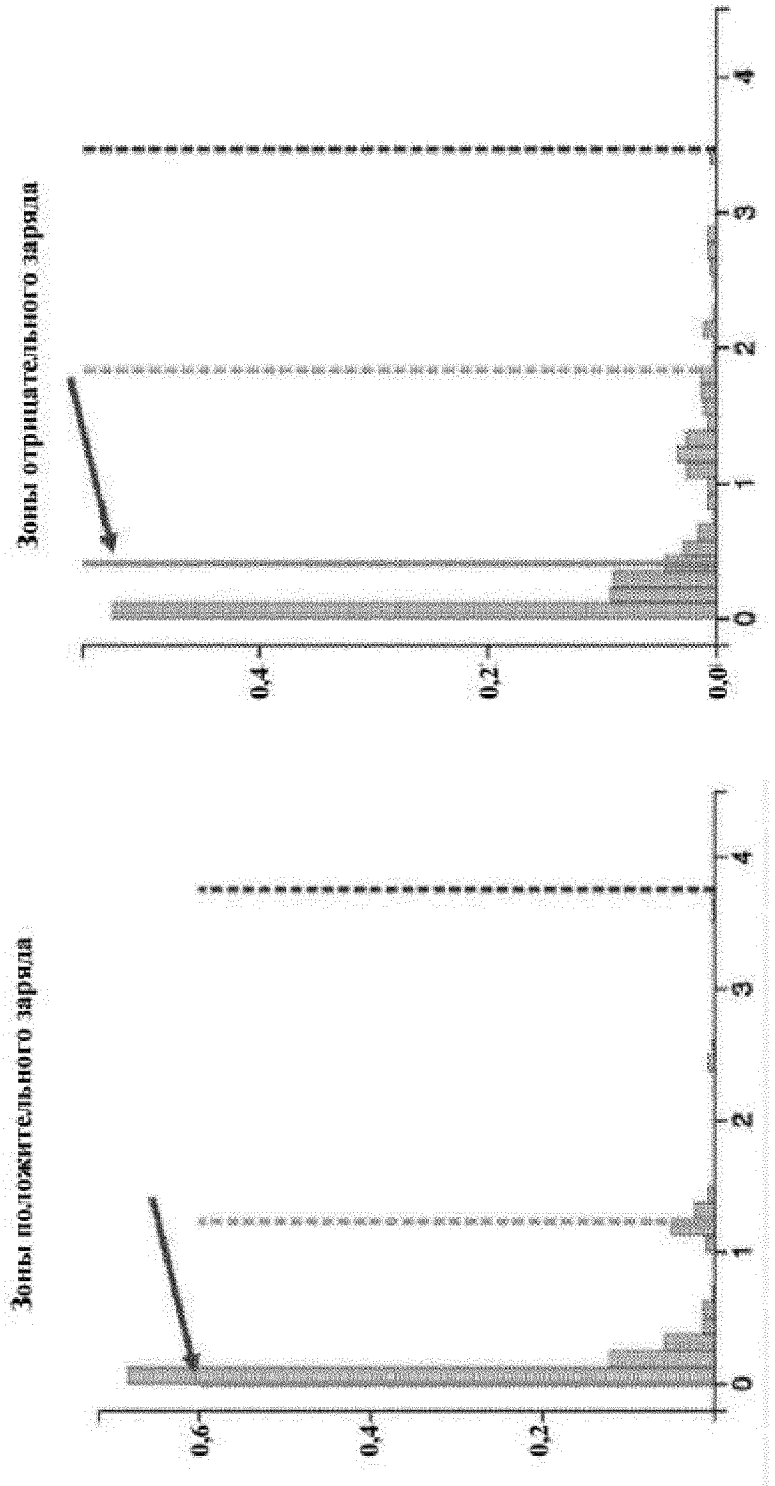

CH3B
CH3A
ФИГ. 110
Связь S-S
Между
доменами
Y349C$_{CH3A}$
S354C$_{CH3B}$
EW-RVTs-s Fc (EWC цепь, 2,5 Å)
EW-RVTs-s Fc (RVTC цепь, 2,5 Å)


CDRH
CDRL
VL
VH
CDRL
CDRH
VH
VL
CDRL
CDRH
VL
VH
: Отрицательно заряженные
: Положительно заряженные
: Гидрофобные

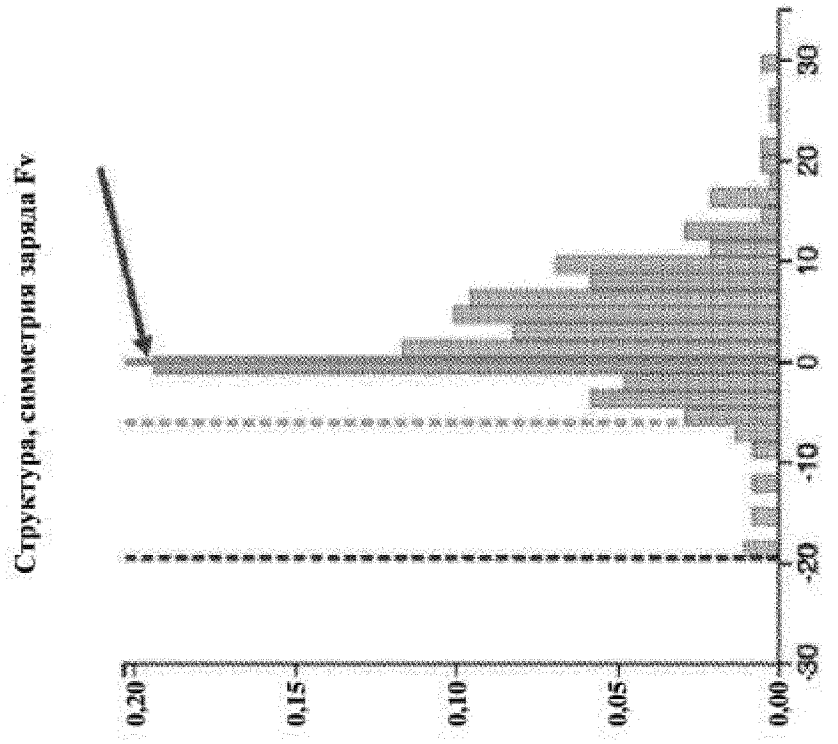
ФИГ. 111


Зоны поверхностной гидрофобности
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
80
100
120
140
160
180
200
220
Общая длина CDR
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
35
40
45
50
55
60
65
70

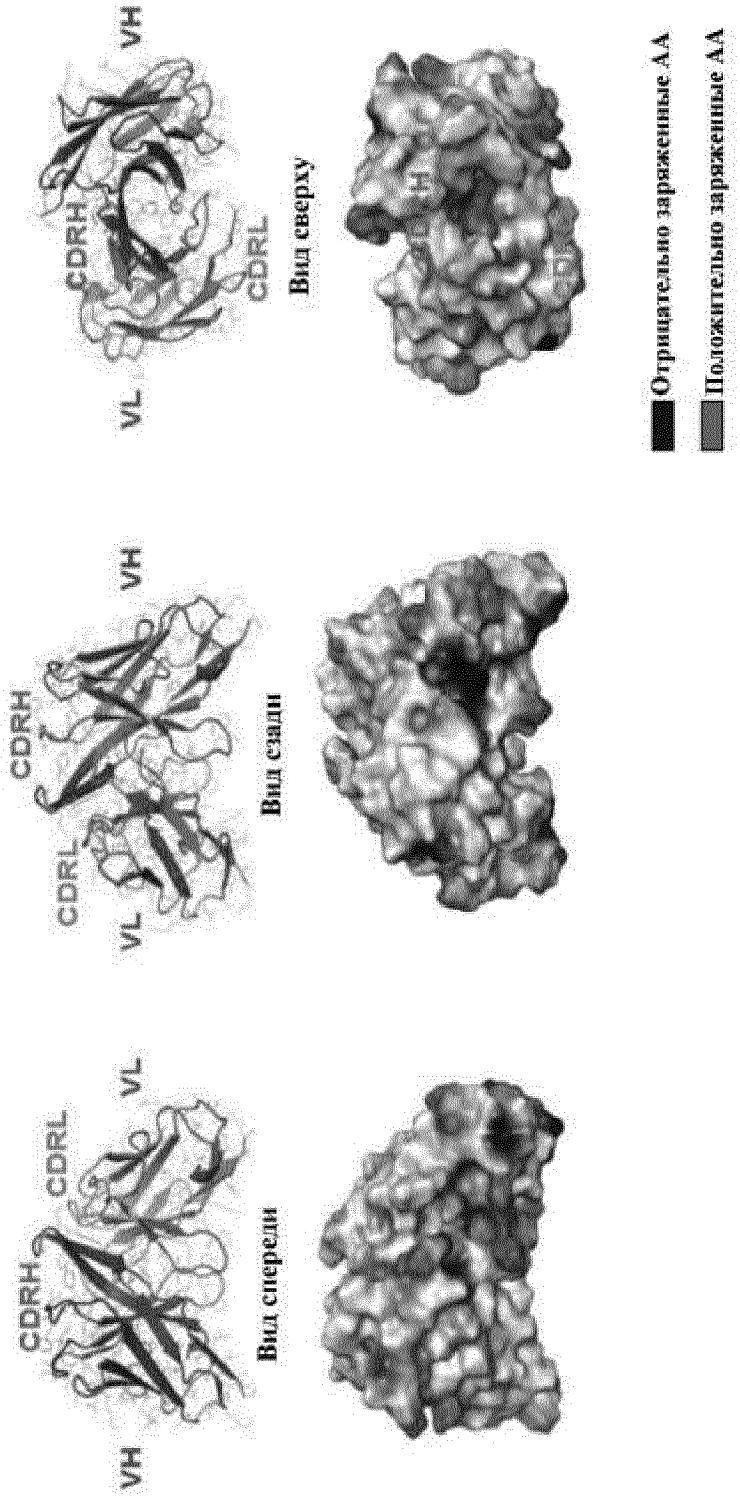
ФИГ. 112


Зоны отрицательного заряда
0,0
0,2
0,4
0
1
2
3
4
Зоны положительного заряда
0,2
0,4
0,6
0
1
2
3
4

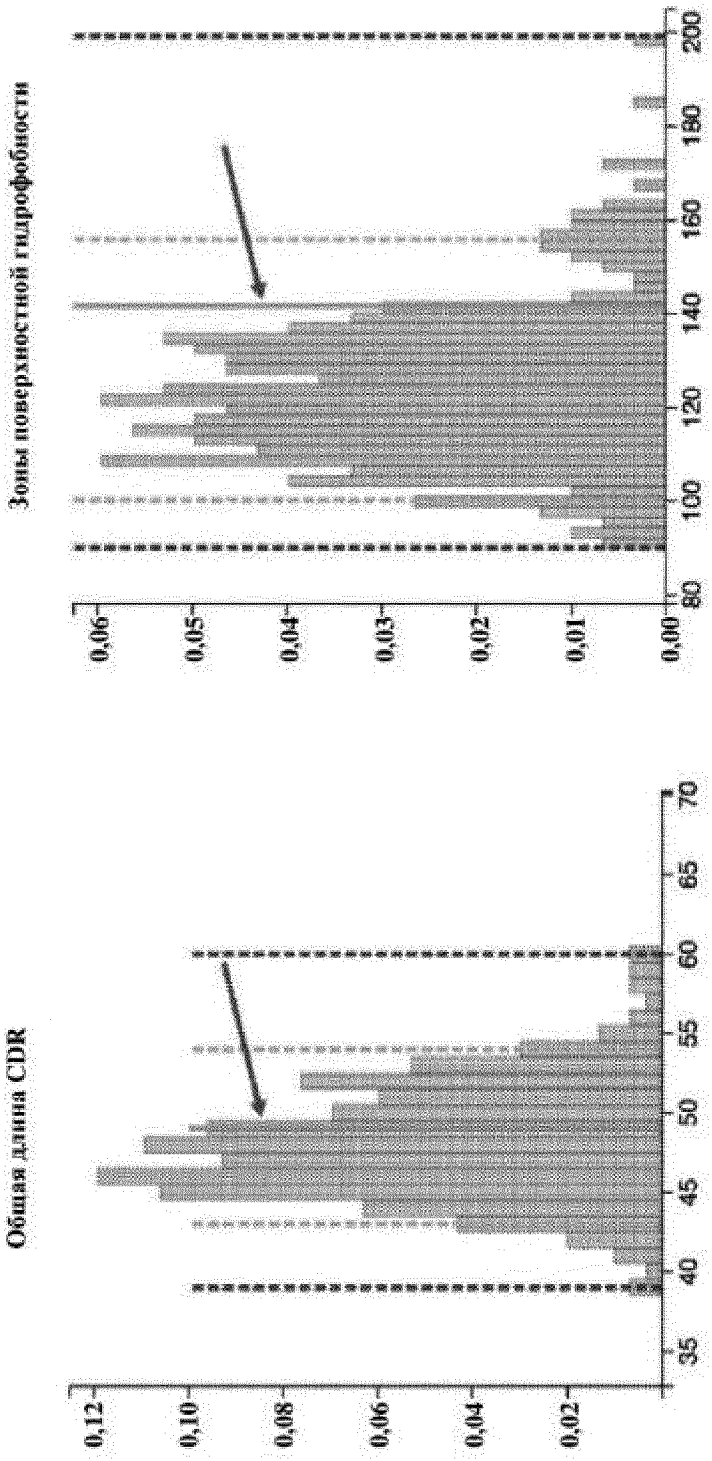
ФИГ. 113



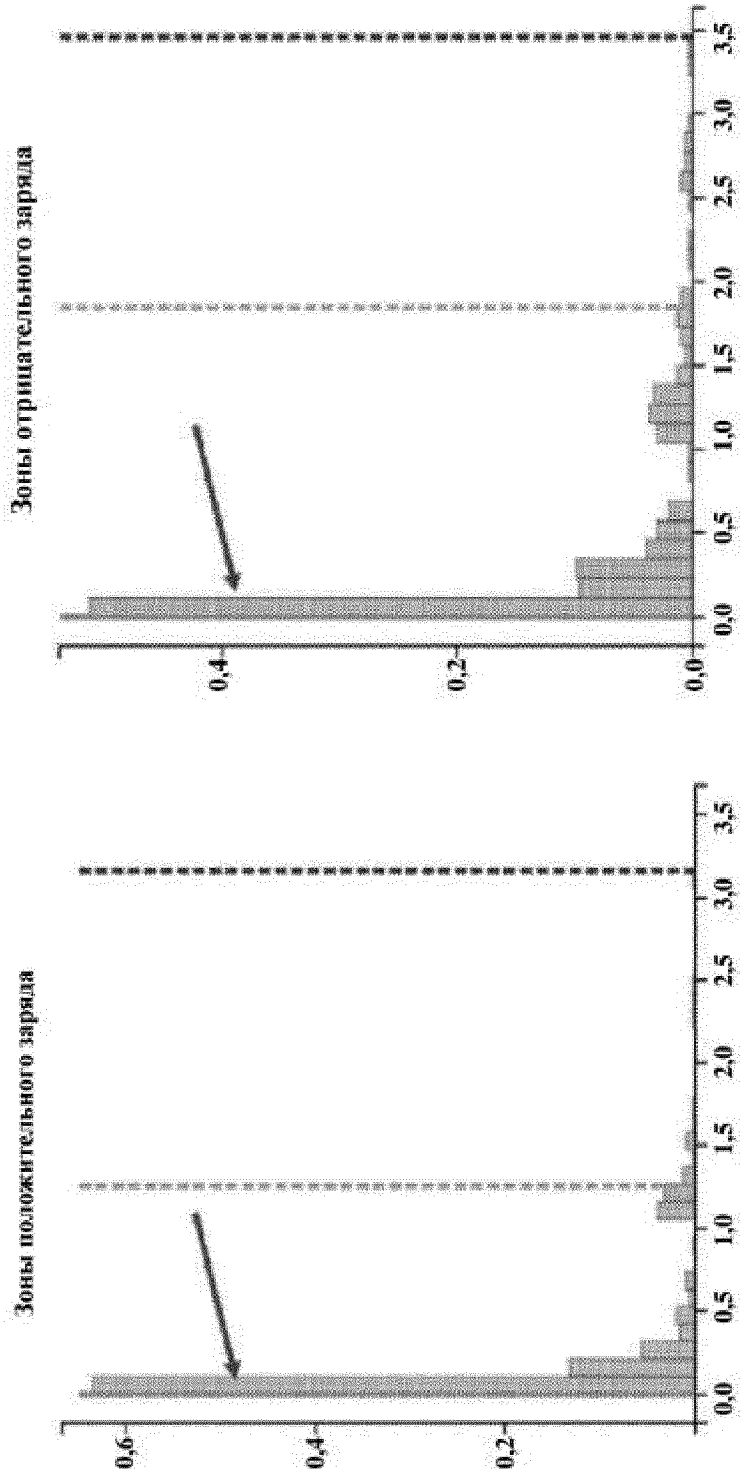

ФИГ. 113 продолжение


VH
CDRH
CDRL
VL
Вид сверху
Вид сзади
Вид спереди
Отрицательно заряженные АА
Положительно заряженные АА

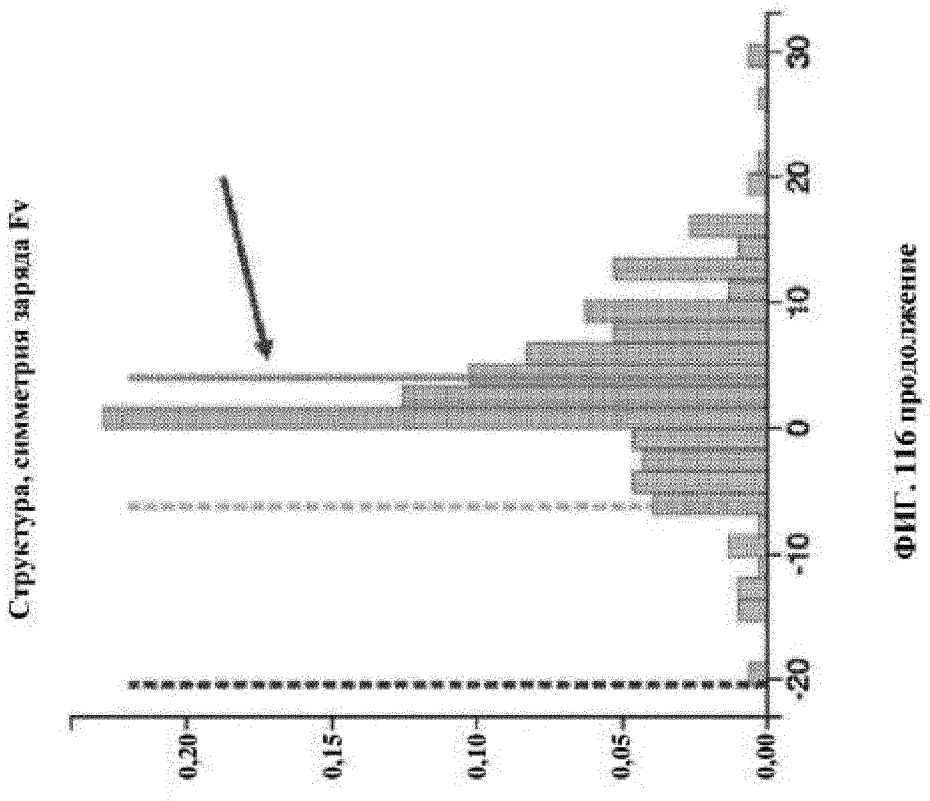
ФИГ. 114


Зоны поверхностной гидрофобности
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
80
100
120
140
160
180
200
Общая длина CDR
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
35
40
45
50
55
60
65
70

ФИГ. 115

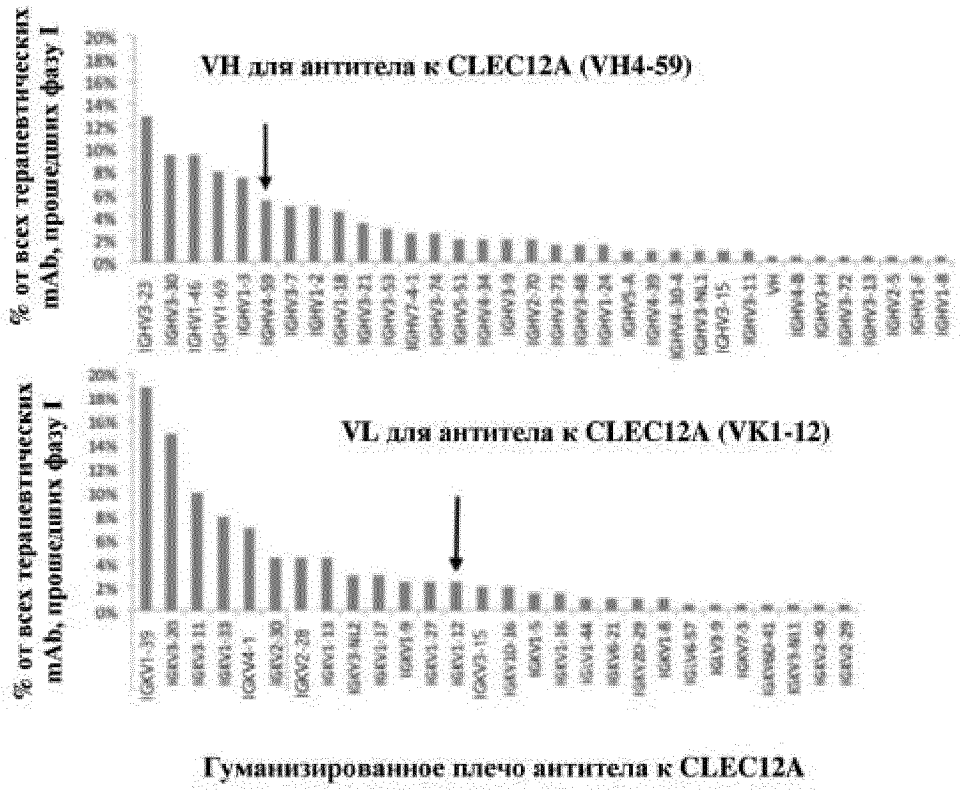

Зоны отрицательного заряда
0,0
0,2
0,4
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
Зоны положительного заряда
0,0
0,2
0,4
0,6
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5

ФИГ. 116



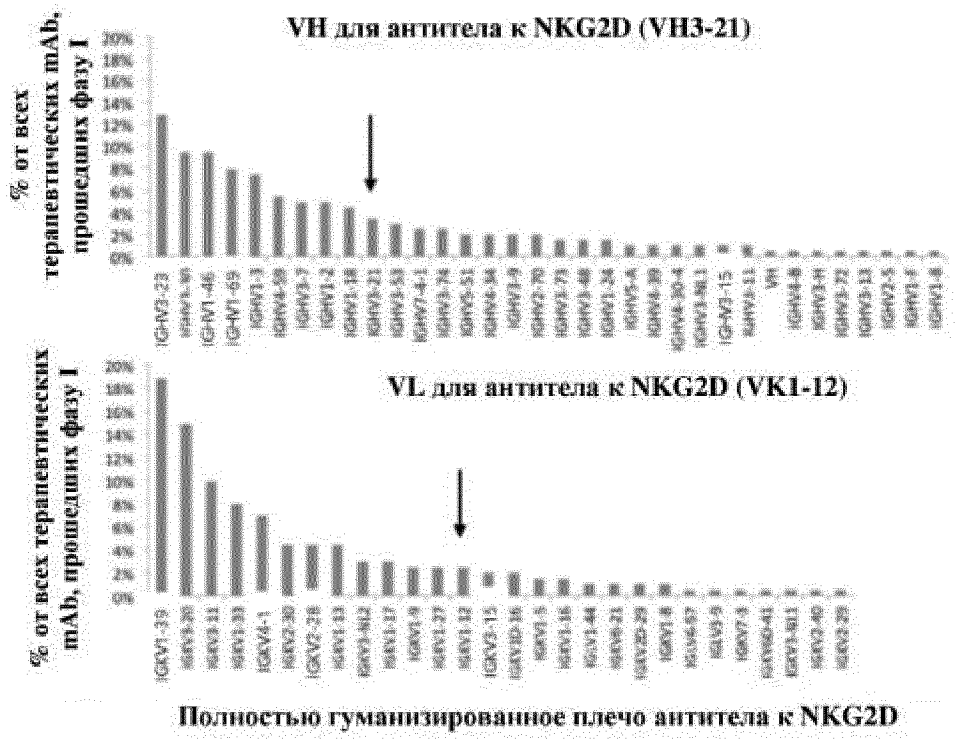

ФИГ. 116 продолжение

ФИГ. 117

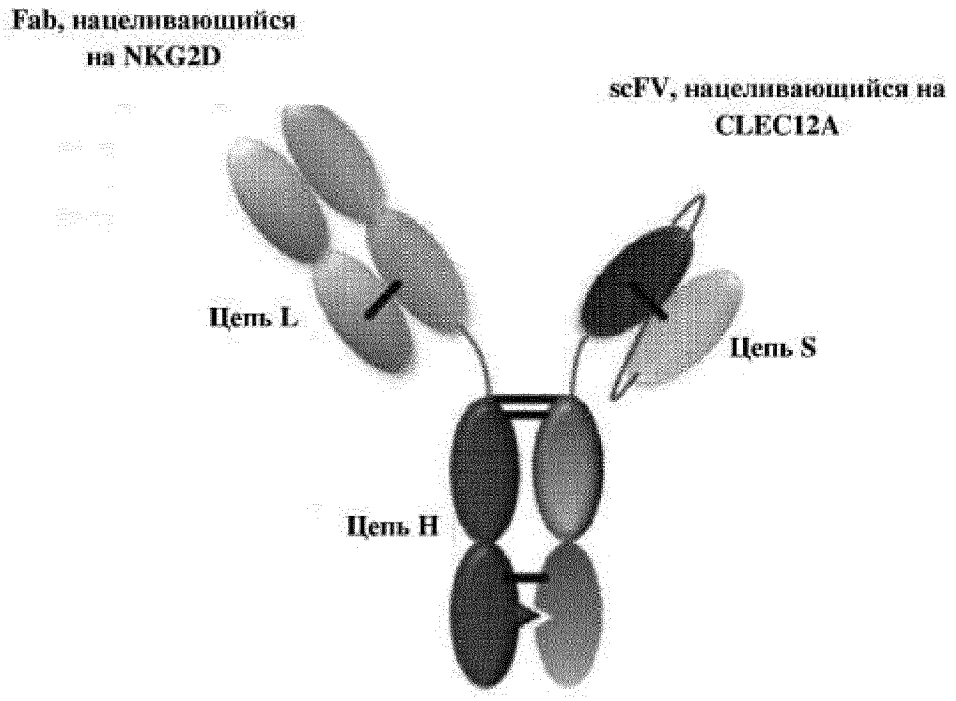



Гуманизированное плечо антитела к CLEC12A

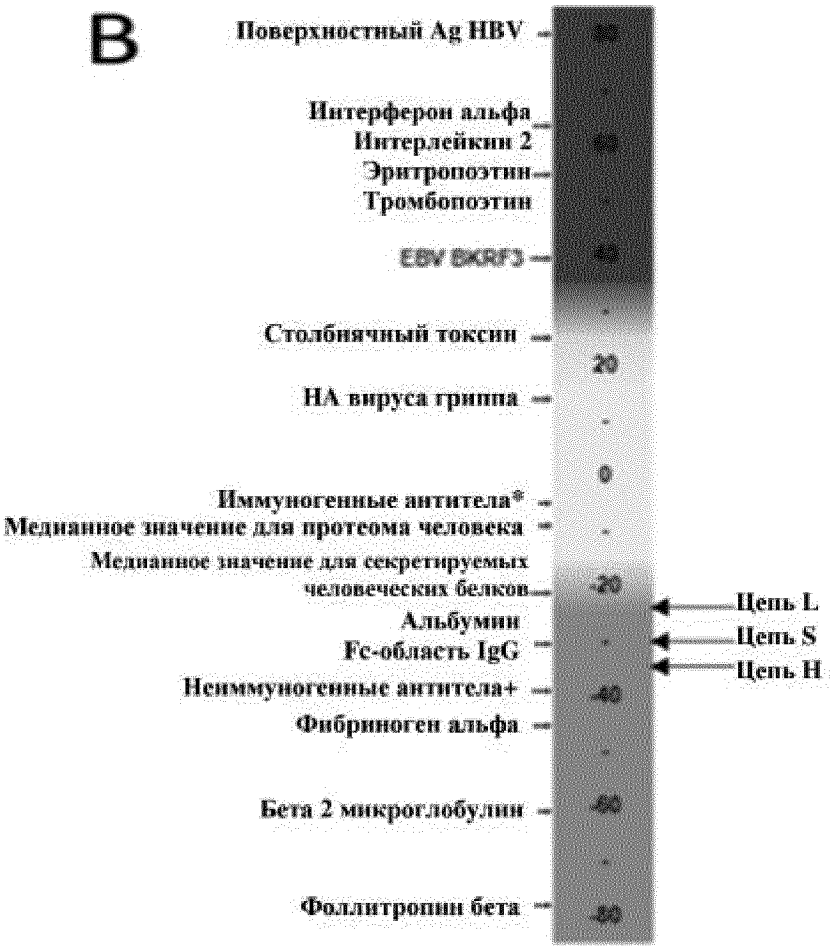
**ФИГ. 117 продолжение**



A

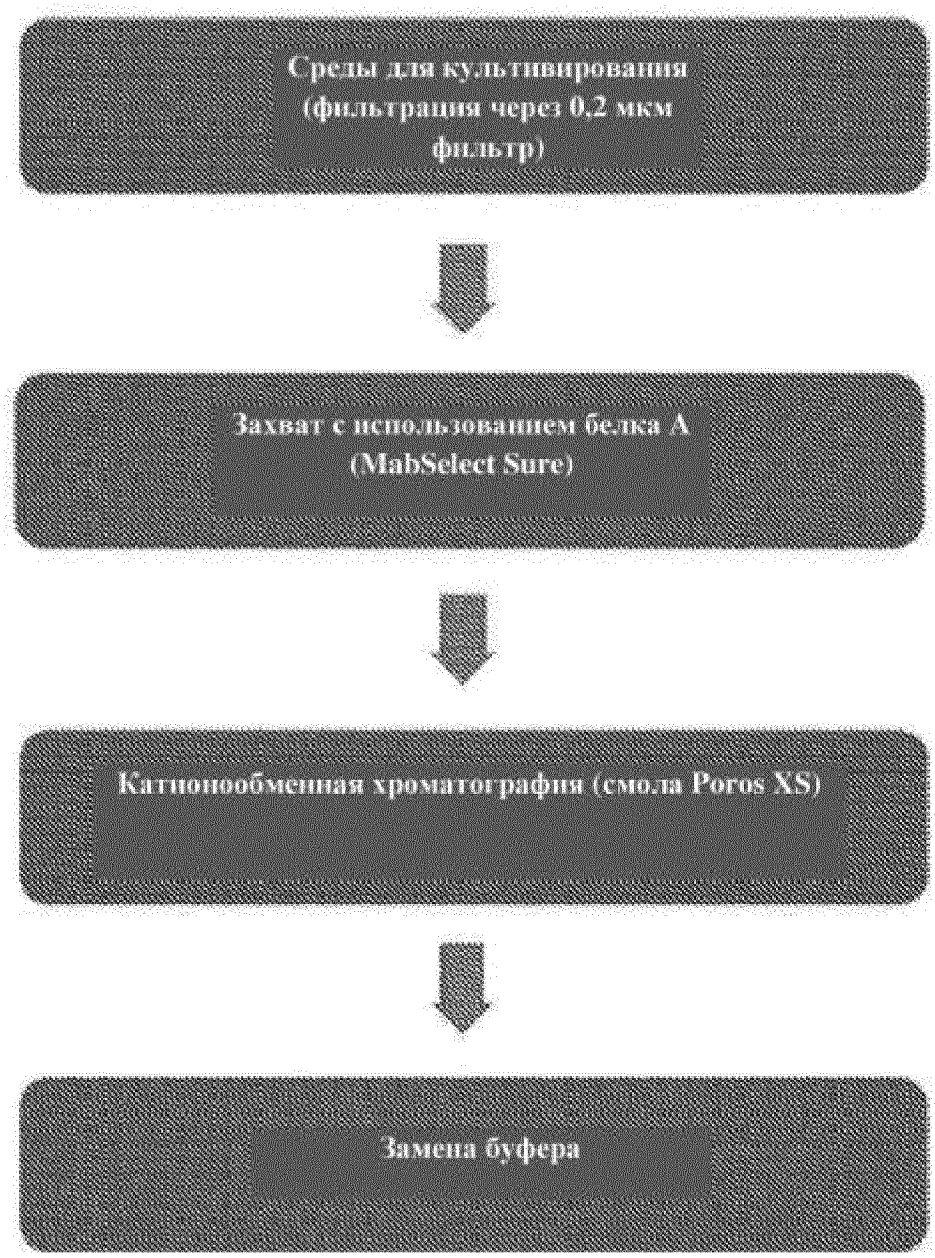

Fab, нацеливающийся на NKG2D
scFV, нацеливающийся на CLEC12A
Цепь L
Цепь S
Цепь H

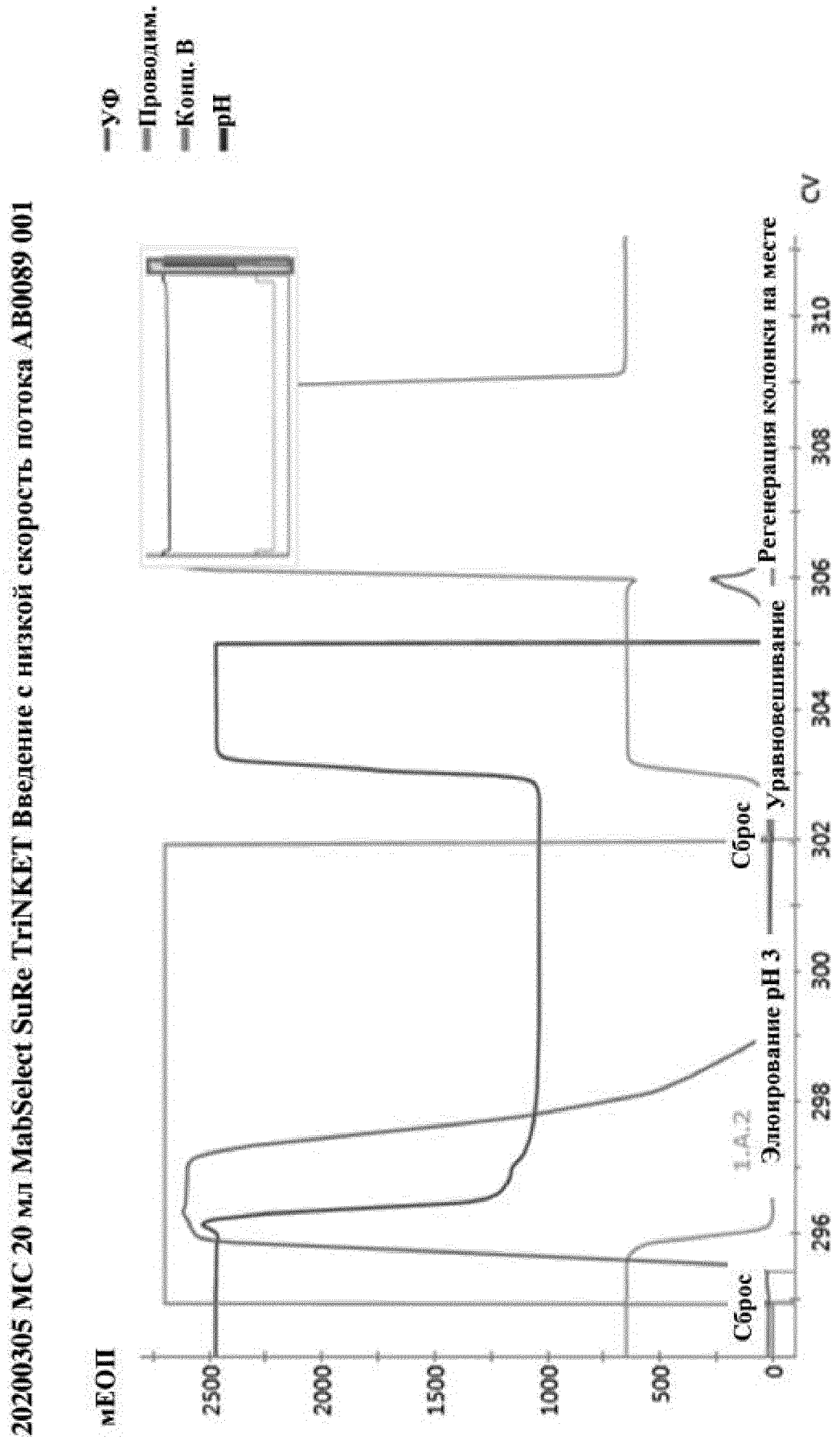
ФИГ. 118A


B
Поверхностный Ag HBV
Интерферон альфа
Интерлейкин 2
Эритропоэтин
Тромбопоэтин
EBV BKRF3
Столбнячный токсин
HA вируса гриппа
Иммуногенные антитела*
Медианное значение для протеома человека
Медианное значение для секретируемых человеческих белков
Альбумин
Fc-область IgG
Неиммуногенные антитела+
Фибриноген альфа
Бета 2 микроглобулин
Фоллитропин бета
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
Цепь L
Цепь S
Цепь H

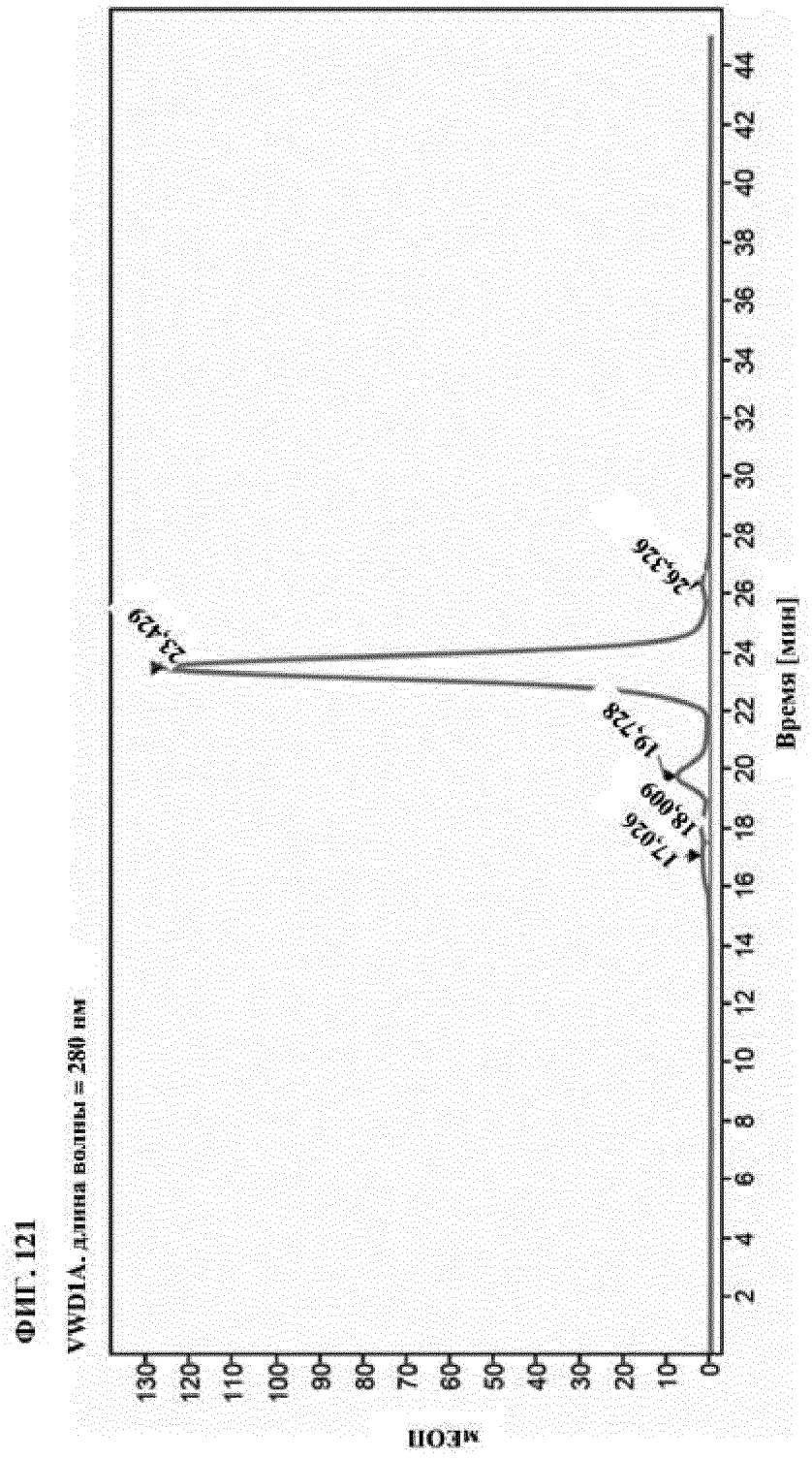
ФИГ. 118B

ФИГ. 119


Среды для культивирования (фильтрация через 0,2 мкм фильтр)
Захват с использованием белка A (MabSelect Sure)
Катионообменная хроматография (смола Poros XS)
Замена буфера

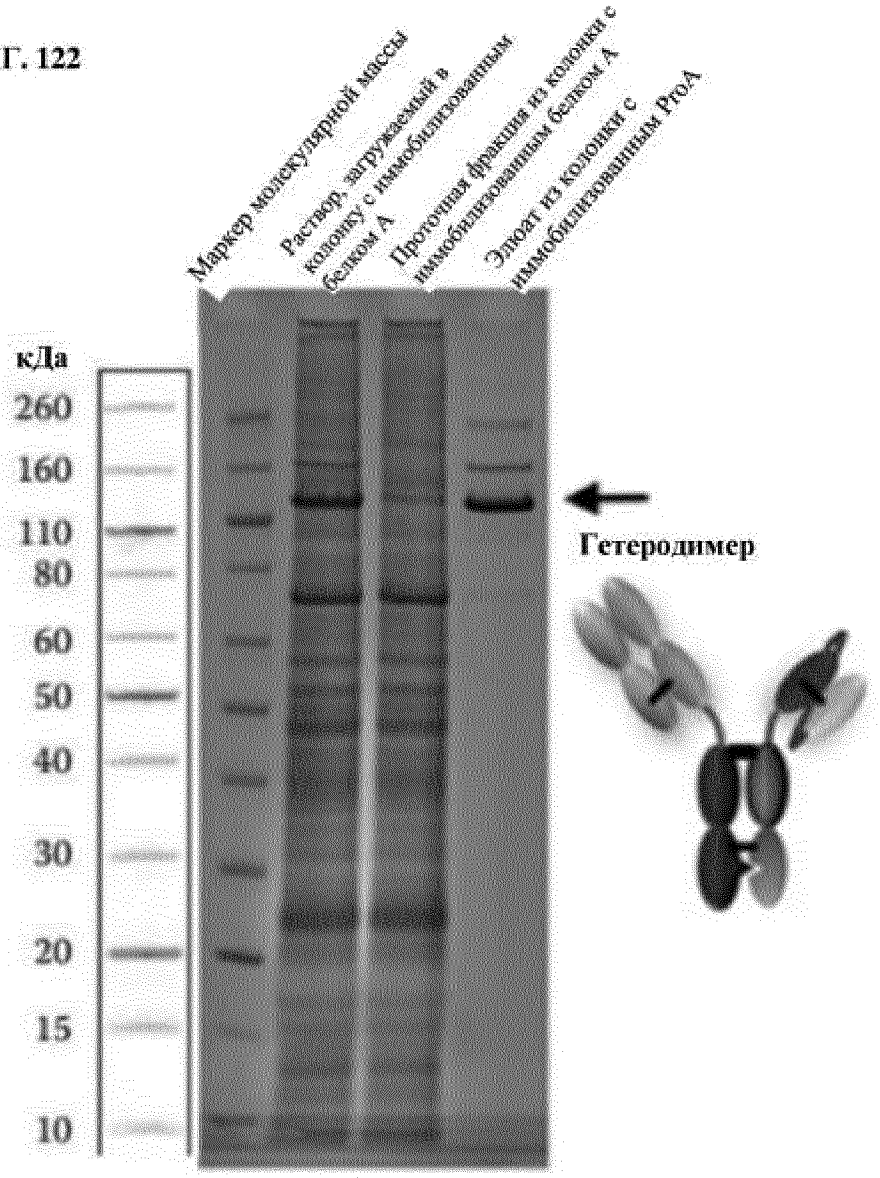

20200305 MC 20 мл MabSelect SuRe TriNKET Введение с низкой скорость потока AB0089 001
мЕОП
2500
2000
1500
1000
500
0
УФ
Проводим.
Конц. B
pH
Сброс
1.A2
Элюирование pH 3
Сброс
Уравновешивание
Регенерация колонки на месте
296
298
300
302
304
306
308
310
CV

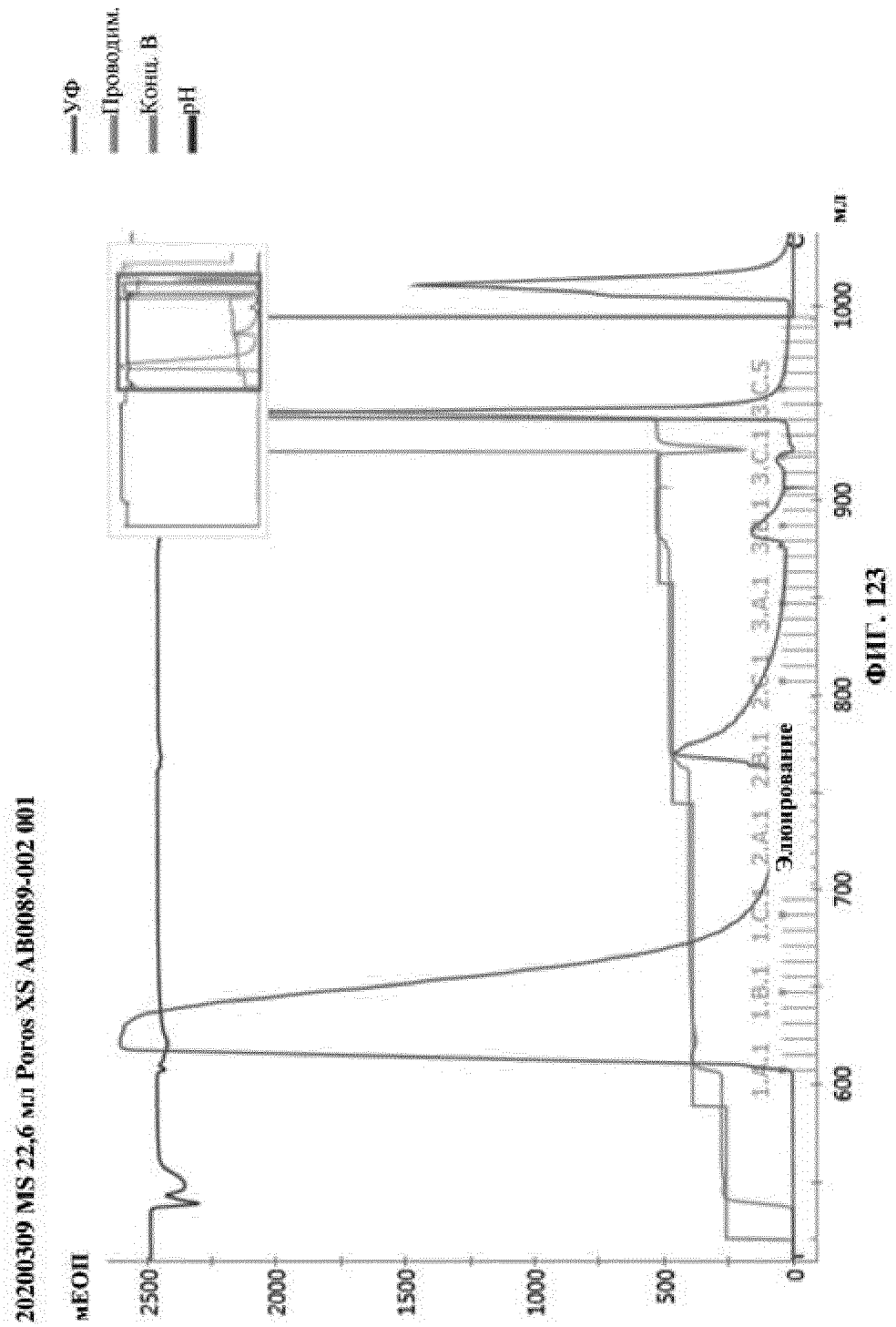
ФИГ. 120


VWD1A, длина волны = 280 нм
мЕОП
Время [мин]
23,429
26,326
19,728
18,009
17,026

ФИГ. 121

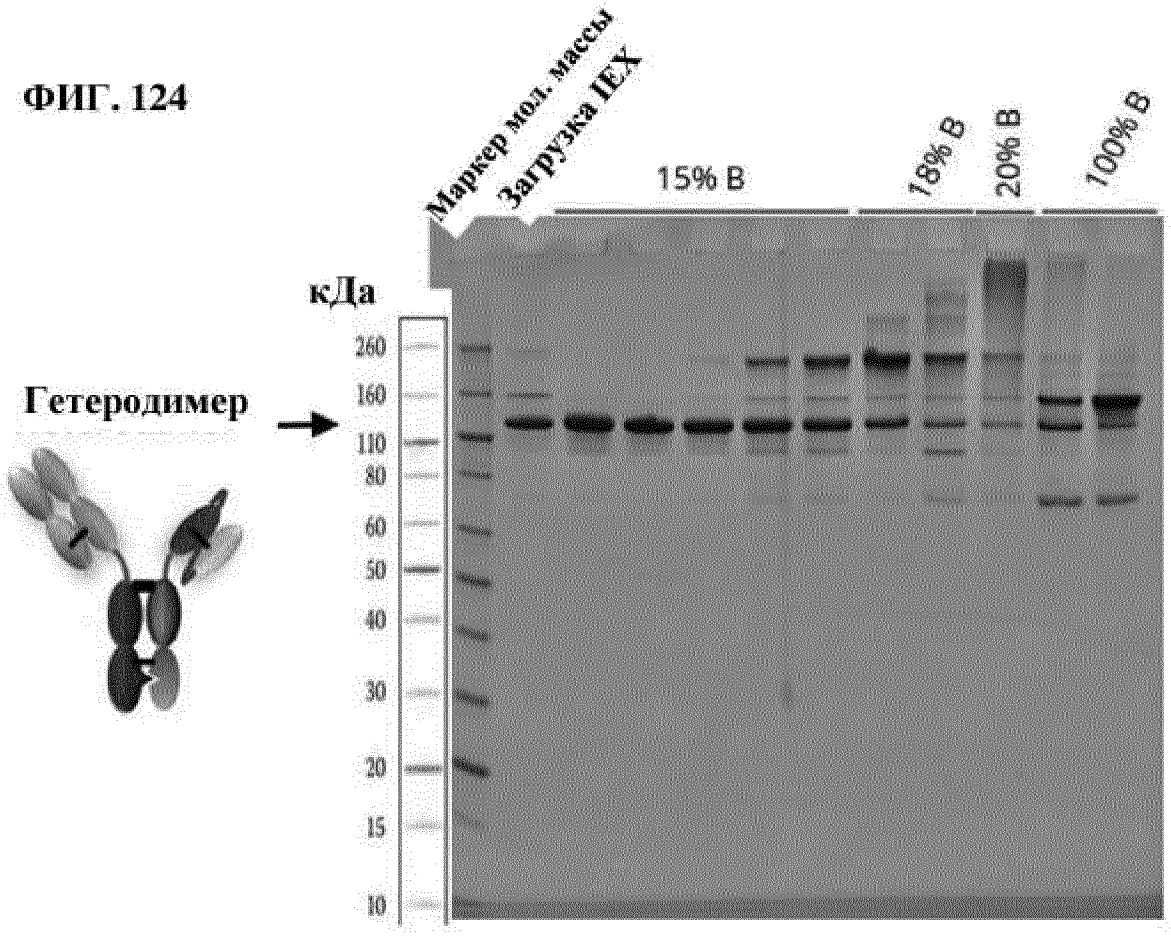
ФИГ. 122


Маркер молекулярной массы
Раствор, загружаемый в колонку с иммобилизованным белком А
Проточная фракция из колонки с иммобилизованным белком А
Элюат из колонки с иммобилизованным ProA
кДа
260
160
110
80
60
50
40
30
20
15
10
Гетеродимер

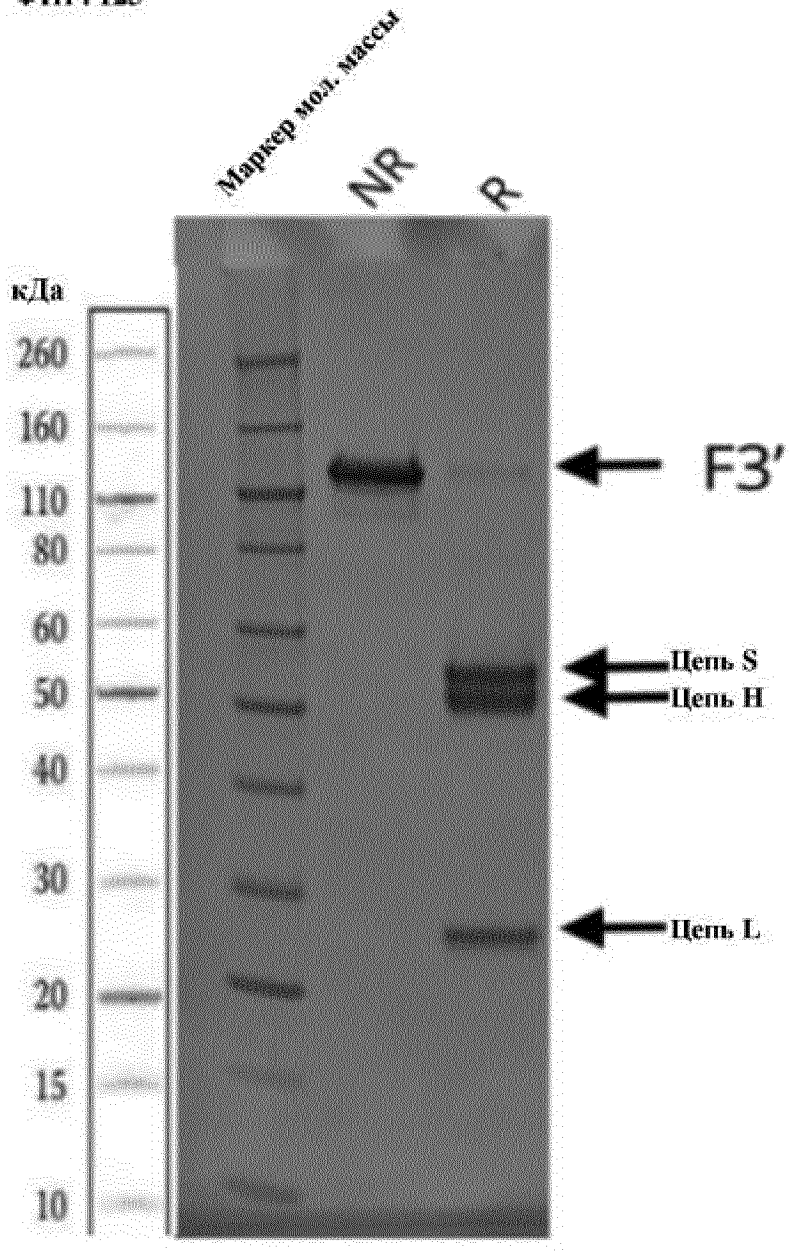

20200309 MS 22,6 мл Poros XS AB0089-002 001
мЕОП
2500
2000
1500
1000
500
0
Уф
Проводим.
Конц. В
pH
Элюирование
1.A.1
1.B.1
1.C.1
2.A.1
2.B.1
2.C.1
3.A.1
3.B.1
3.C.1
3.C.5
600
700
800
900
1000
мл

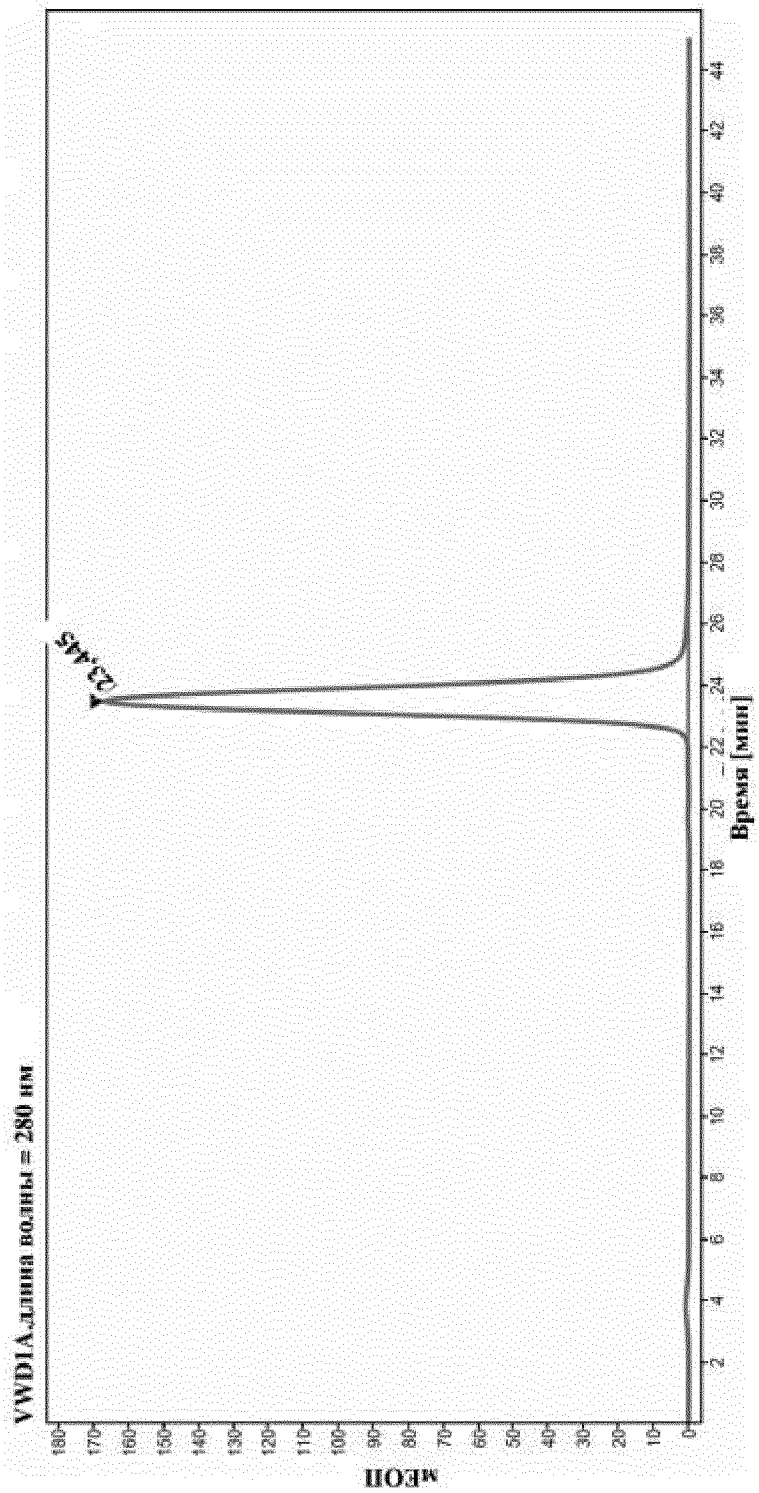
ФИГ. 123

ФИГ. 124


Маркер мол. массы
Загрузка IEX
15% B
18% B
20% B
100% B
кДа
260
160
110
80
60
50
40
30
20
15
10
Гетеродимер

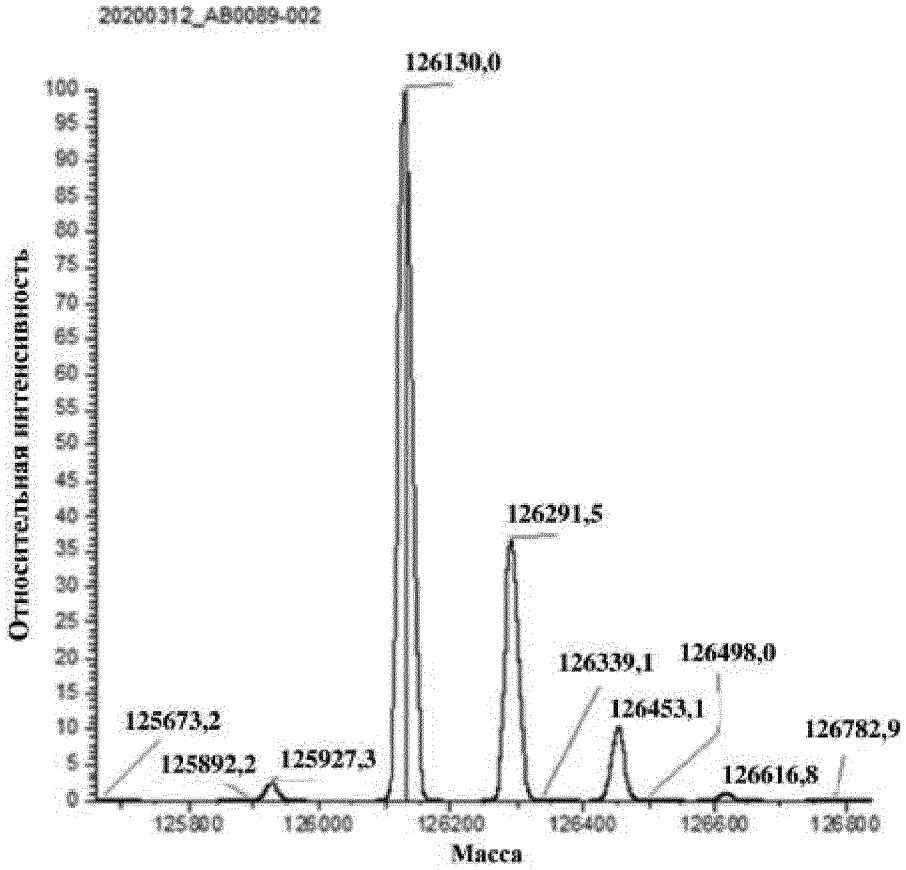
ФИГ. 125


Маркер мол. массы
NR
R
кДа
260
160
110
80
60
50
40
30
20
15
10
F3'
Цепь S
Цепь H
Цепь L

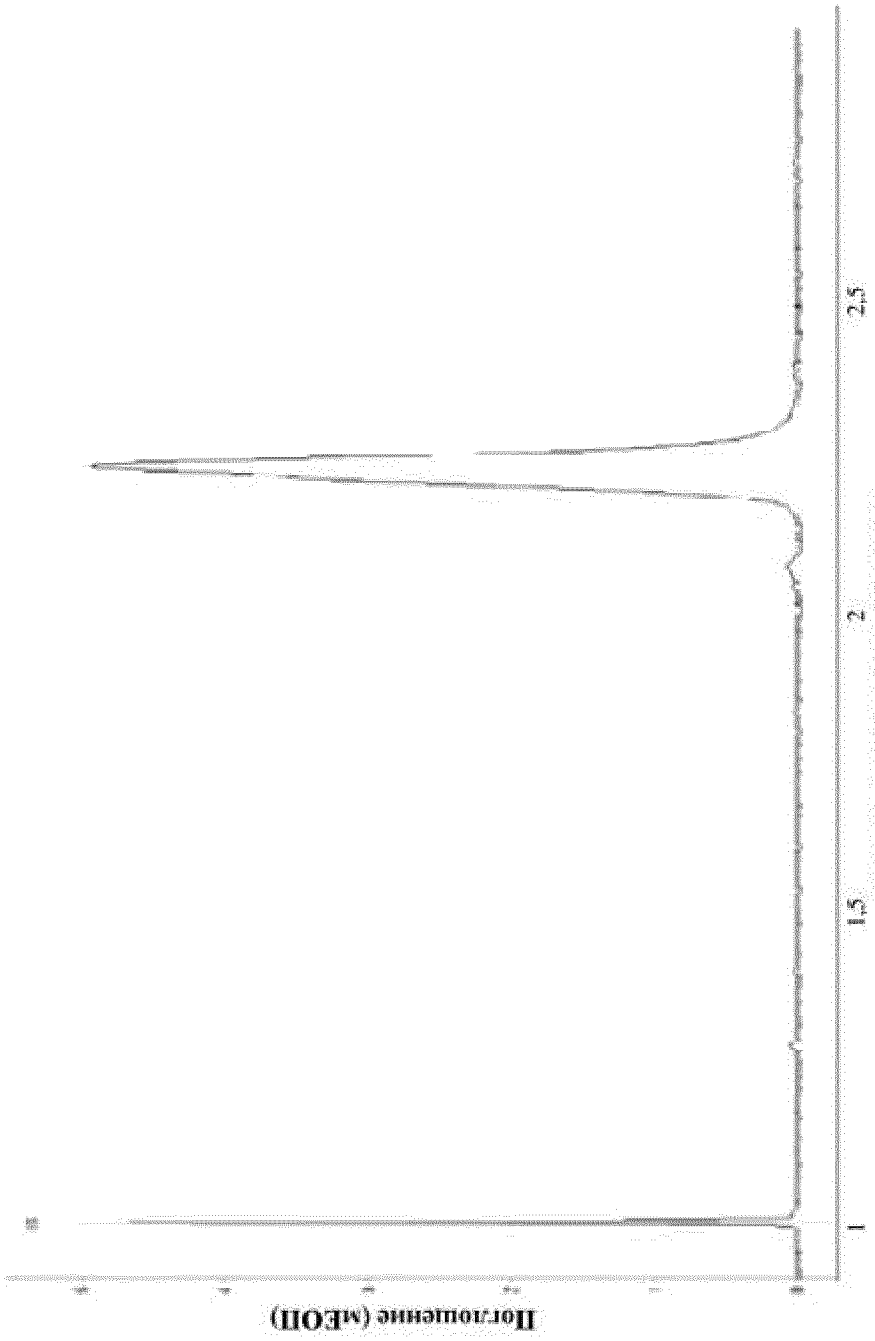



ФИГ. 126

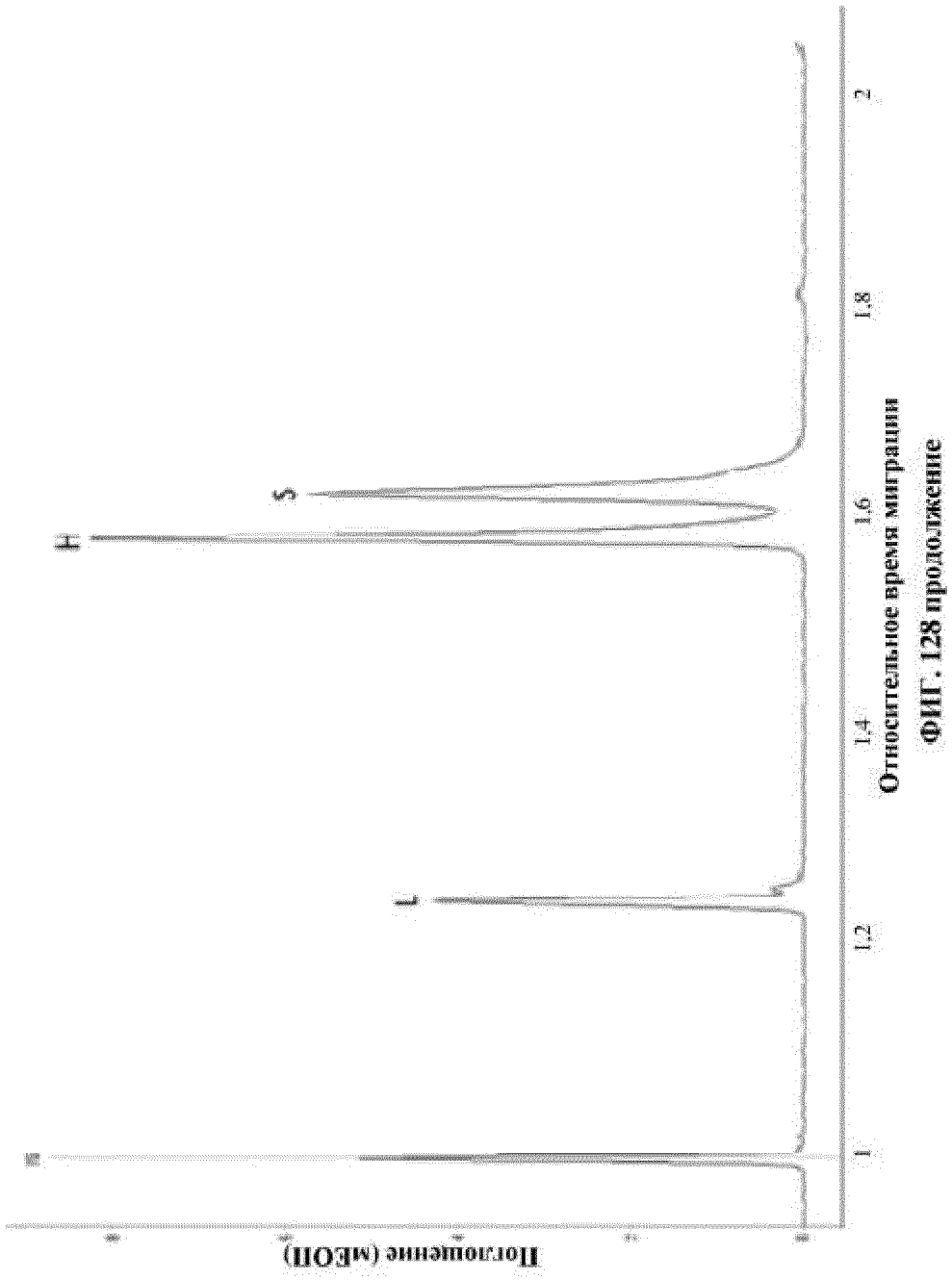
ФИГ. 127



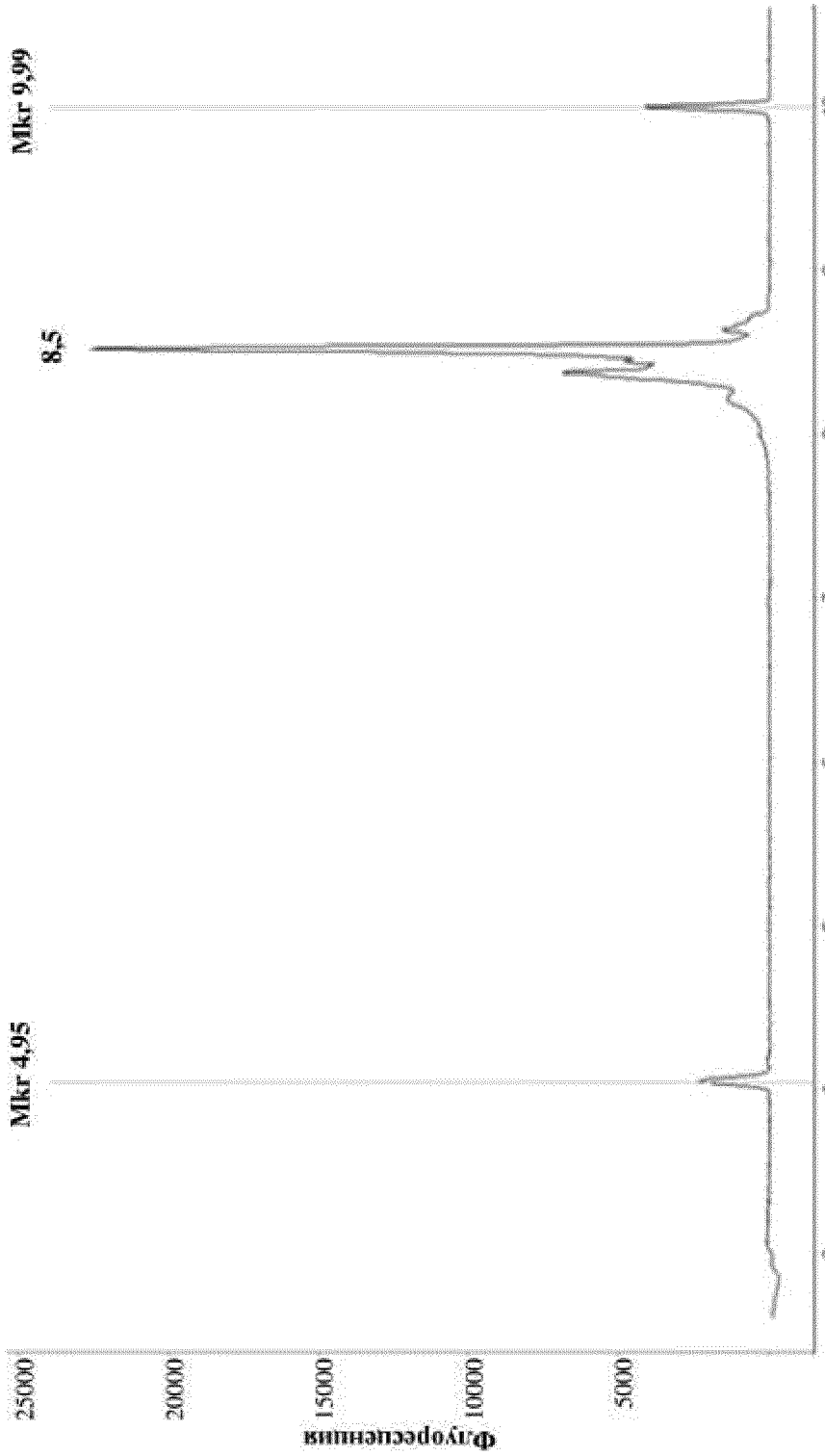

| | |
|---|---|
| Масса интактного антитела (теоретическая) | 126129,1 Да |
| Масса интактного антитела (экспериментальная) | 126130,0 Да |



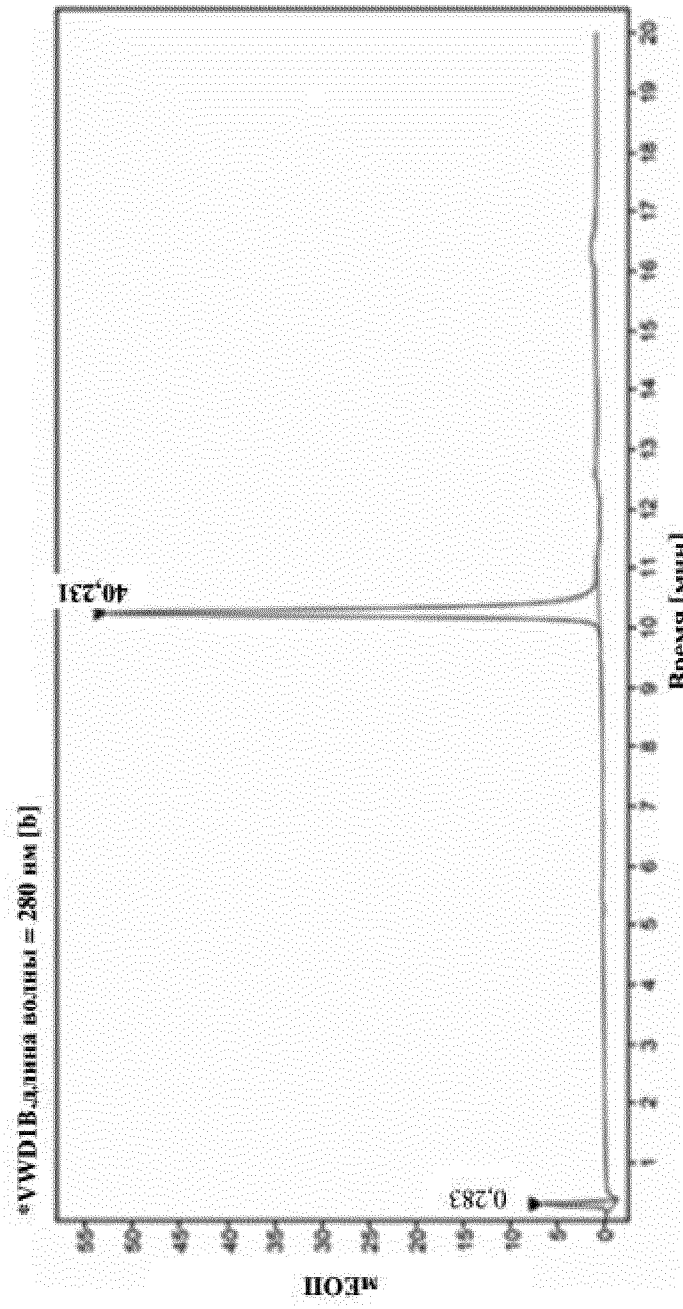

ФИГ. 128



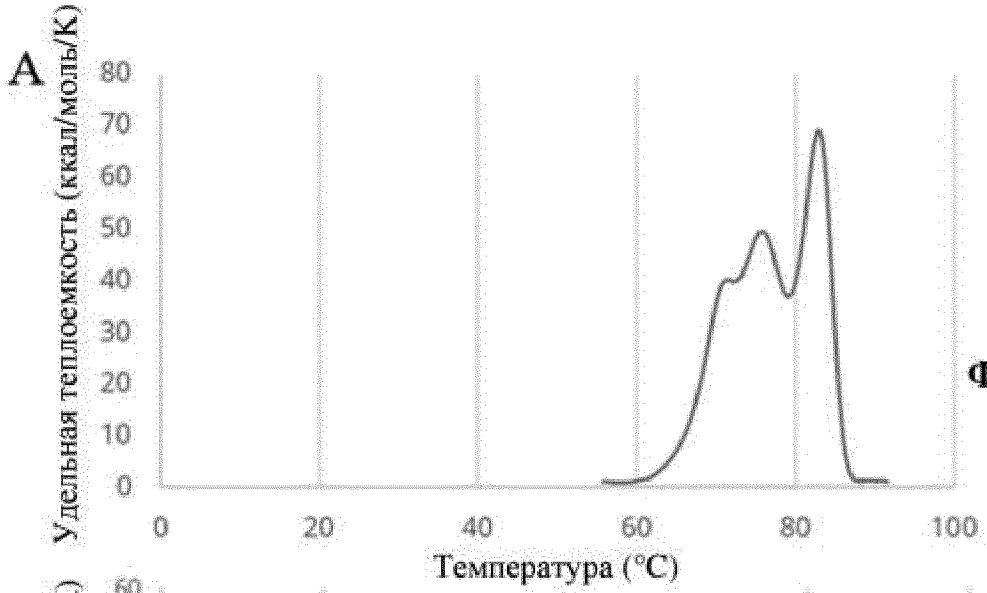

ФИГ. 128 продолжение


Mkr 9,99
8,5
Mkr 4,95
25000
20000
15000
10000
5000
Флуоресценция
3
4
5
6
7
8
9
10
pI

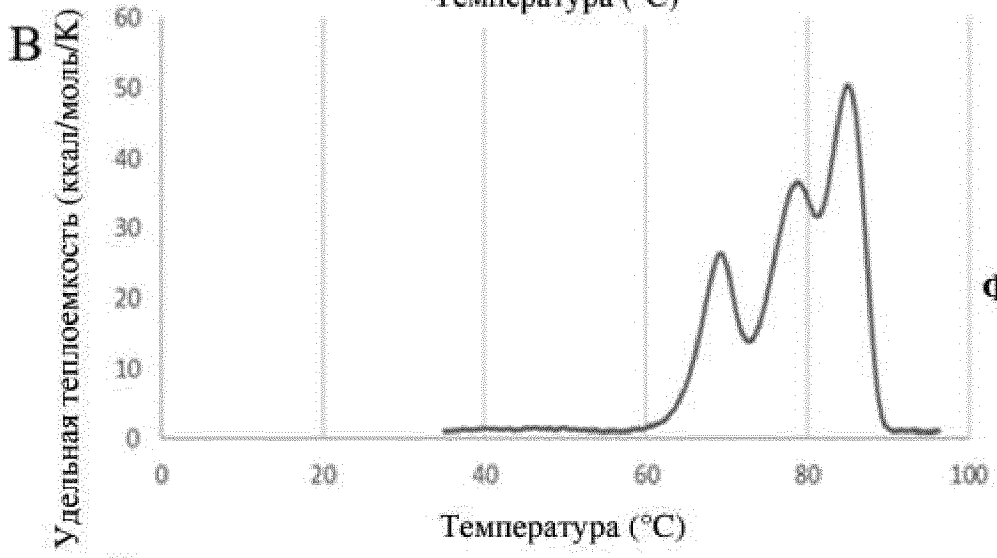
ФИГ. 129



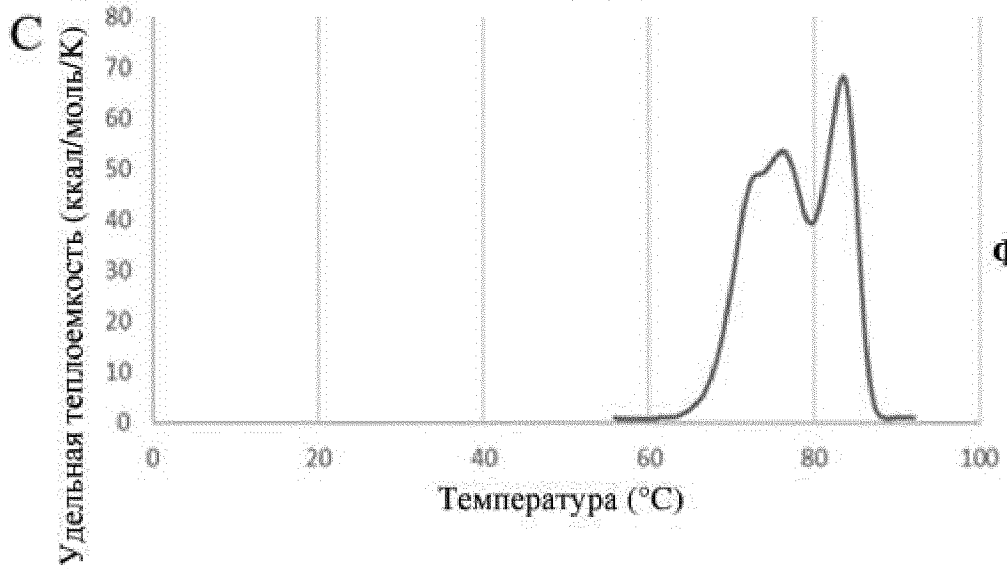

ФИГ. 130




ФИГ. 131A

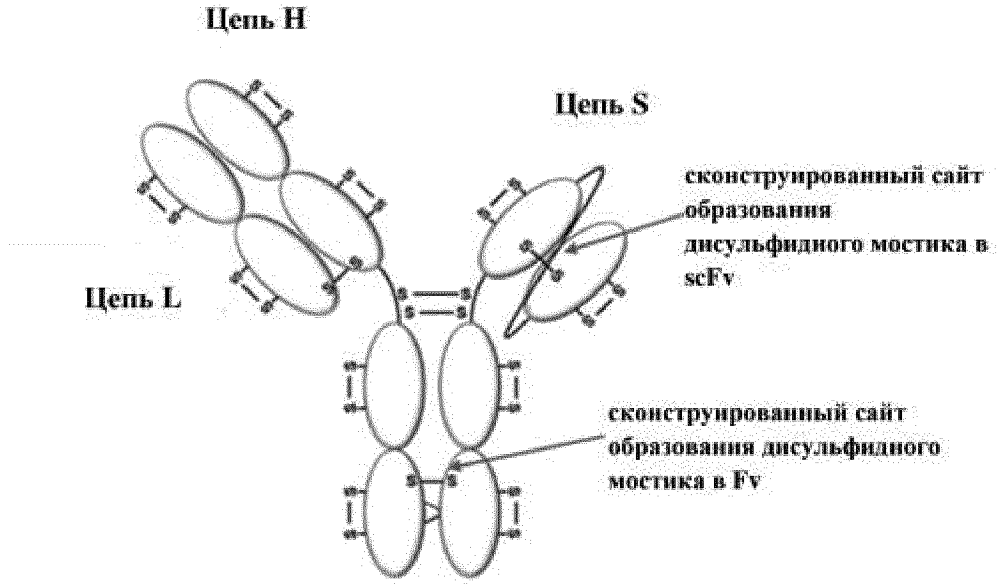


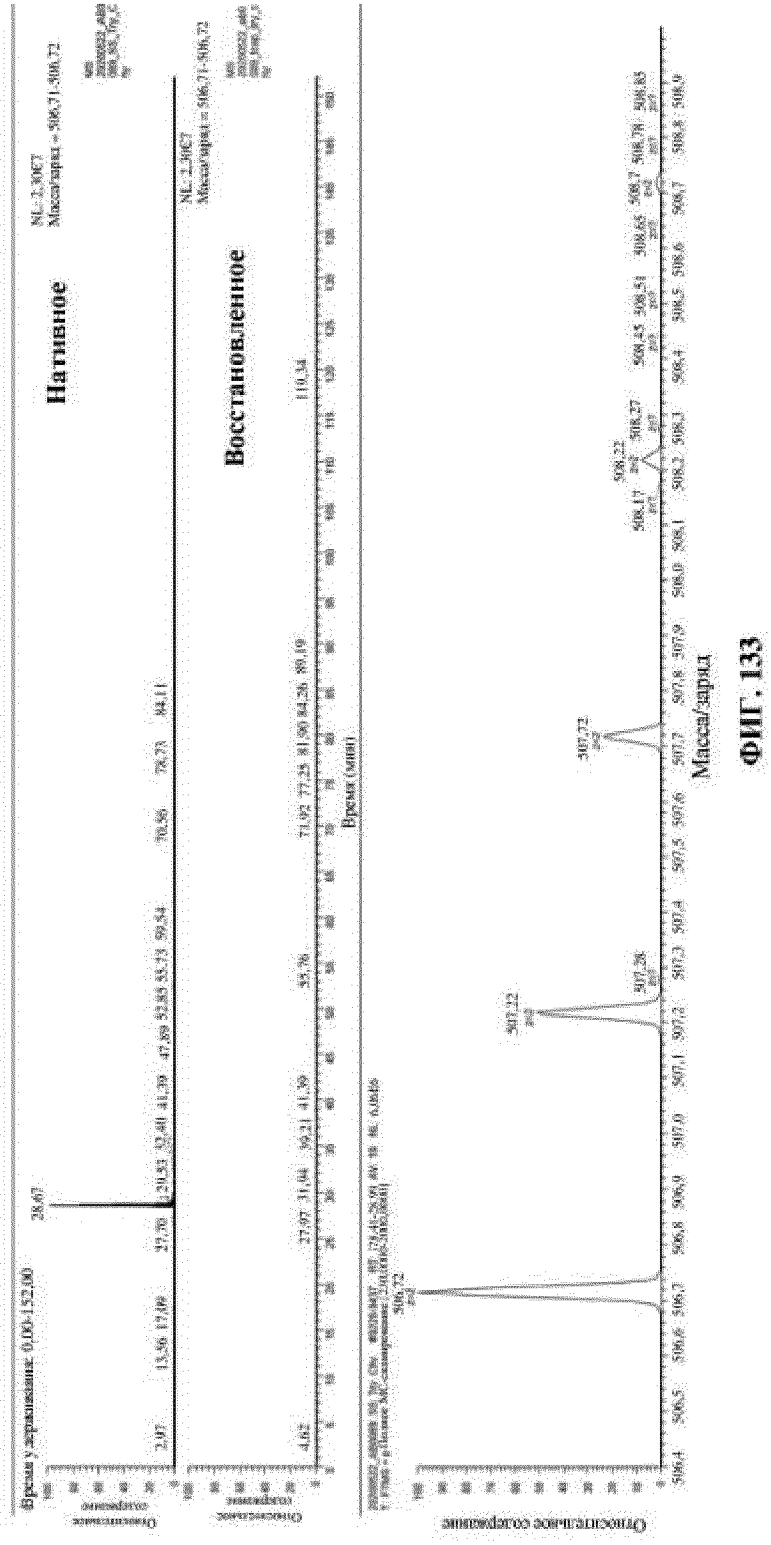

ФИГ. 131B



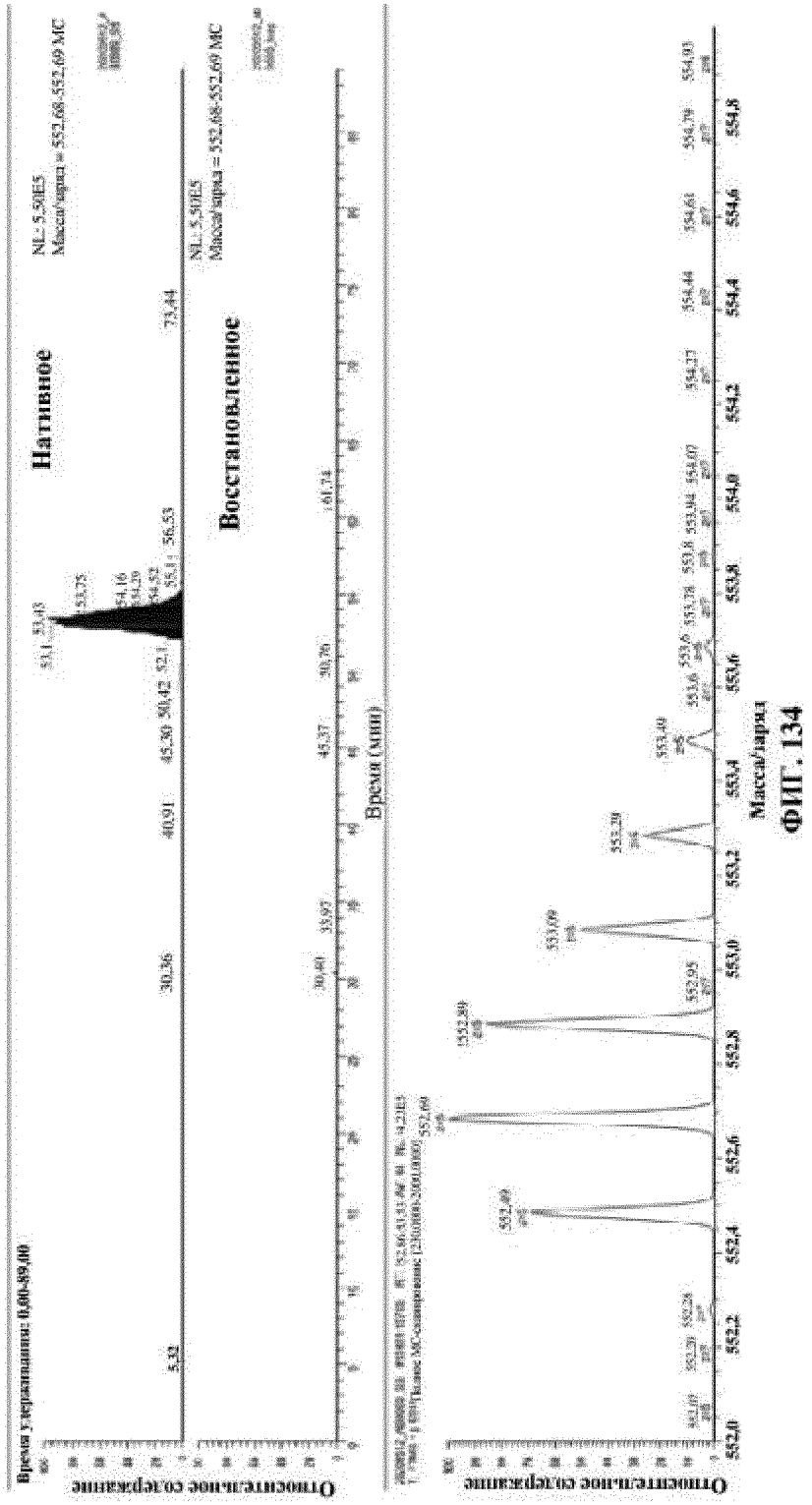

ФИГ. 131C

ФИГ. 132

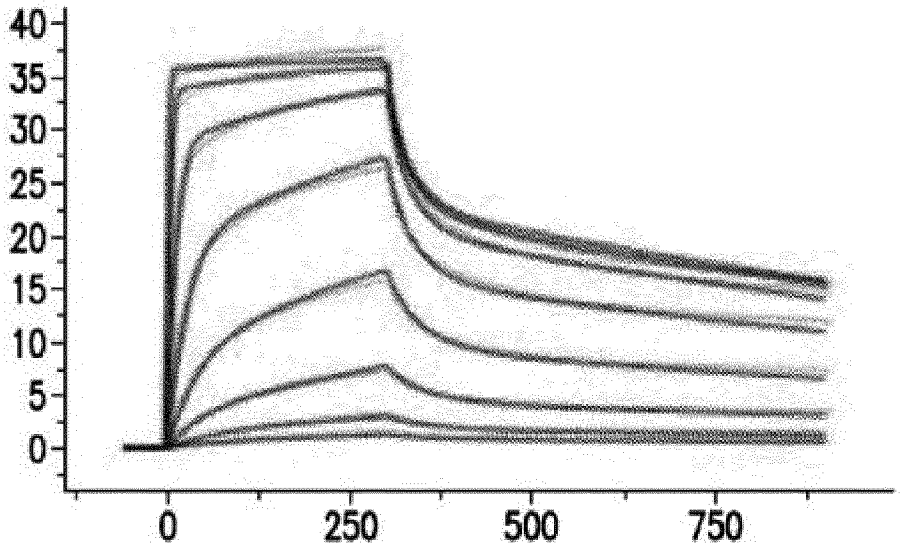

Цепь H
Цепь S
сконструированный сайт образования дисульфидного мостика в scFv
Цепь L
сконструированный сайт образования дисульфидного мостика в Fv



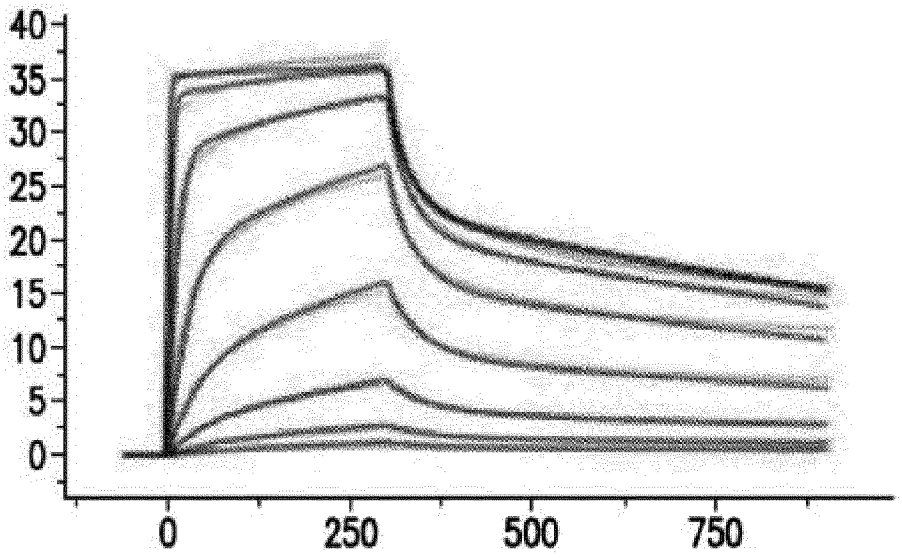

ФИГ. 133


Нативное
Восстановленное
Время (мин)
Относительное содержание
Масса/заряд

ФИГ. 134

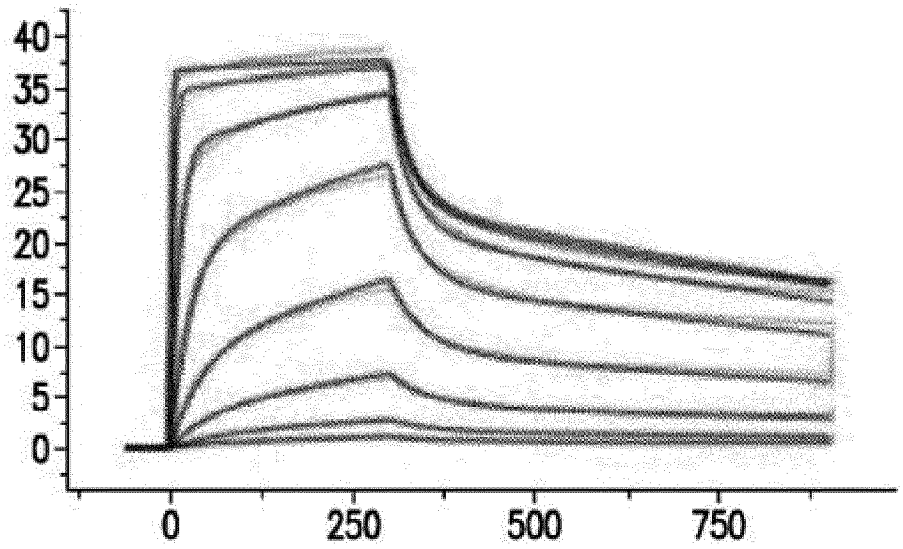



Группа 1
hCLEC12-His; AB0089-002; модель с двумя состояниями

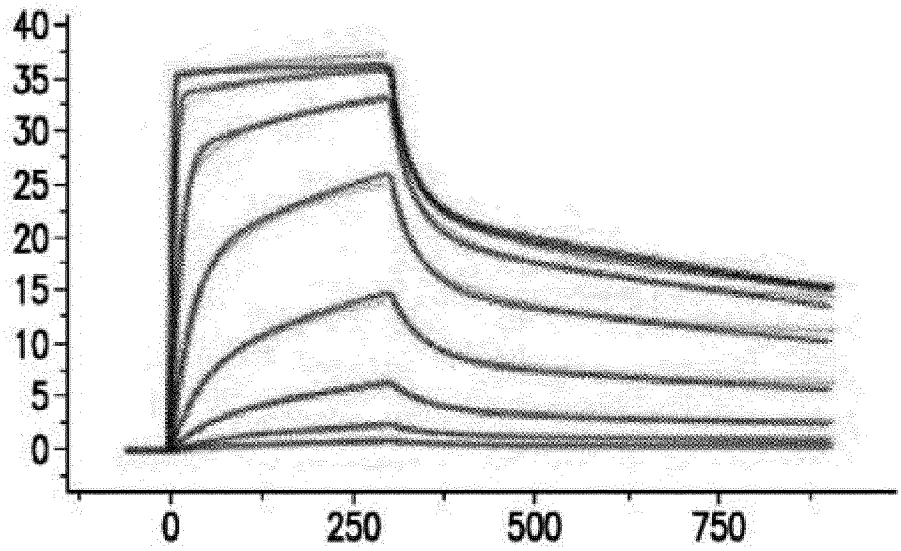



Группа 2
hCLEC12-His; AB0089-002; модель с двумя состояниями

ФИГ. 135

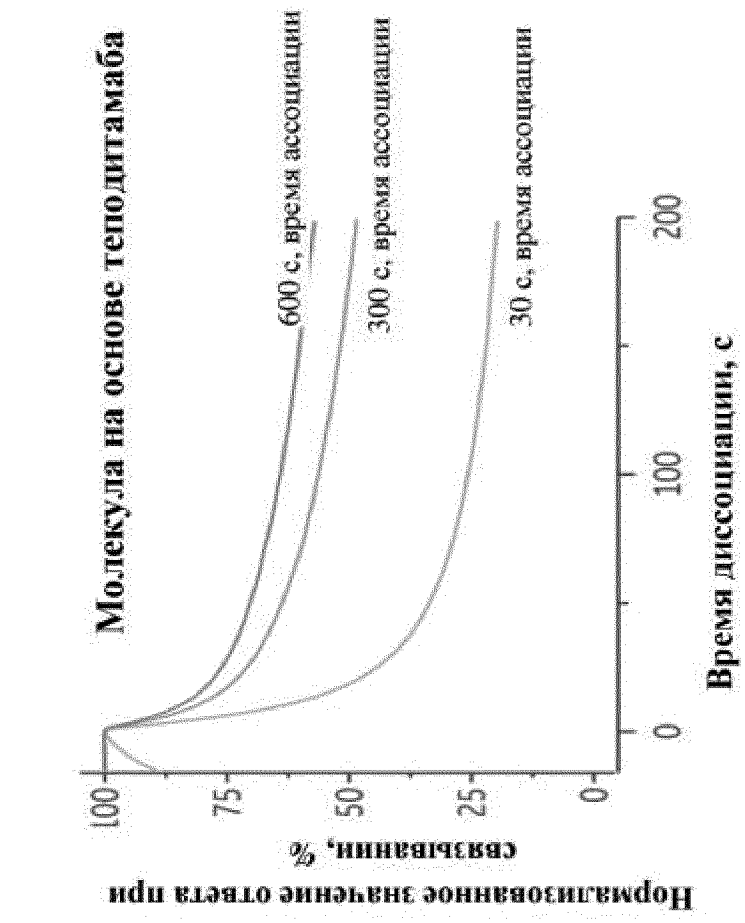


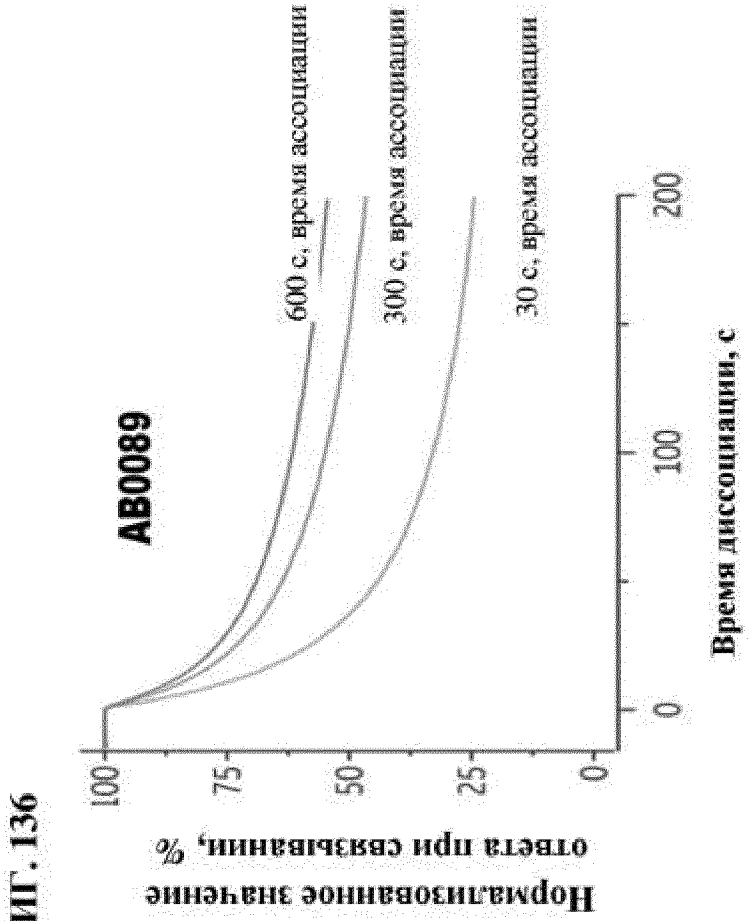

Группа 3
hCLEC12-His; AB0089-002; модель с двумя состояниями




Группа 4
hCLEC12-His; AB0089-002; модель с двумя состояниями

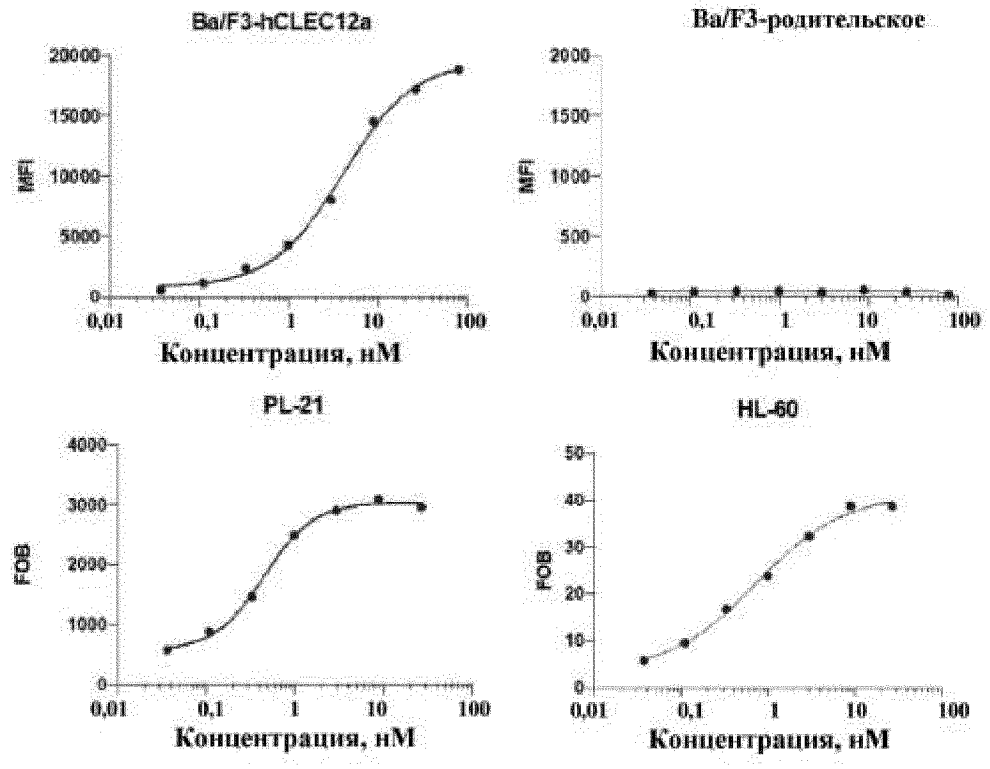
ФИГ. 135 продолжение

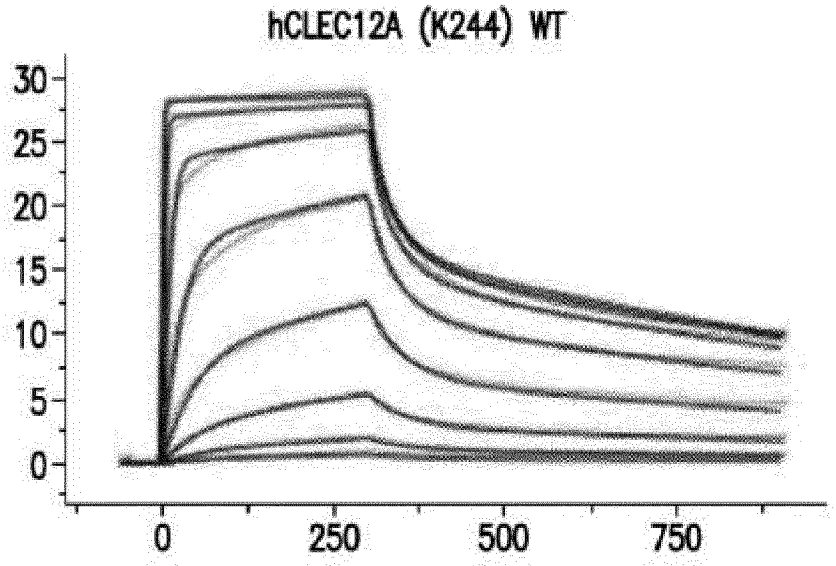

Молекула на основе теподитамаба
600 с, время ассоциации
300 с, время ассоциации
30 с, время ассоциации
Нормализованное значение ответа при связывании, %
Время диссоциации, с
0
25
50
75
100
0
100
200


AB0089
600 с, время ассоциации
300 с, время ассоциации
30 с, время ассоциации
Нормализованное значение ответа при связывании, %
Время диссоциации, с
0
25
50
75
100
0
100
200

ФИГ. 136

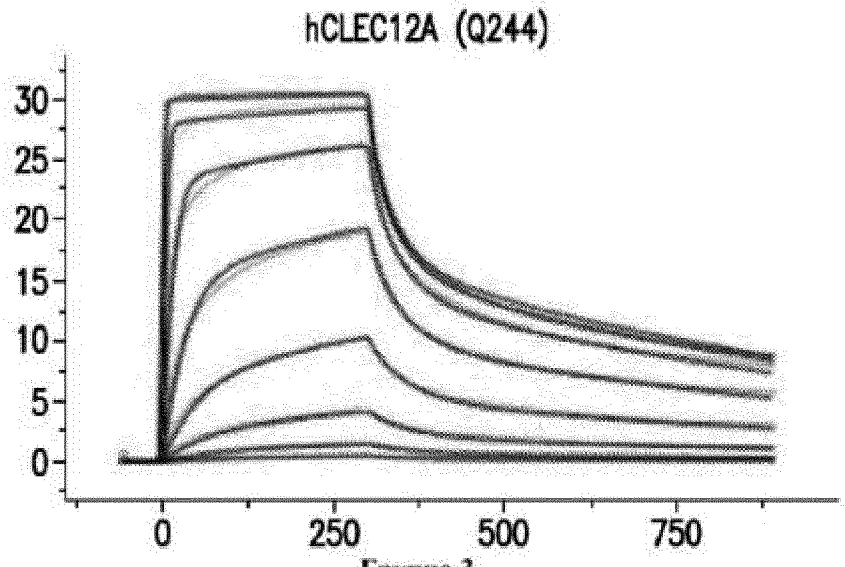
ФИГ. 137


Ba/F3-hCLEC12a
MFI
20000
15000
10000
5000
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
Ba/F3-родительское
MFI
2000
1500
1000
500
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
PL-21
FOB
4000
3000
2000
1000
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
HL-60
FOB
50
40
30
20
10
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ




Группа 8

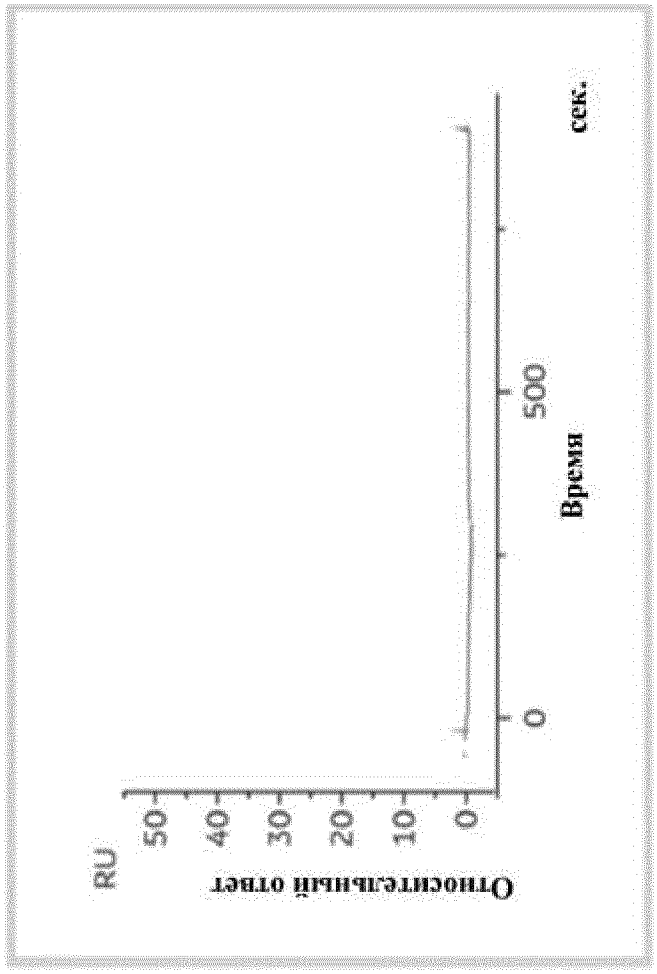
hCLEC12A K224Q; AB0089; модель с двумя состояниями




Группа 3

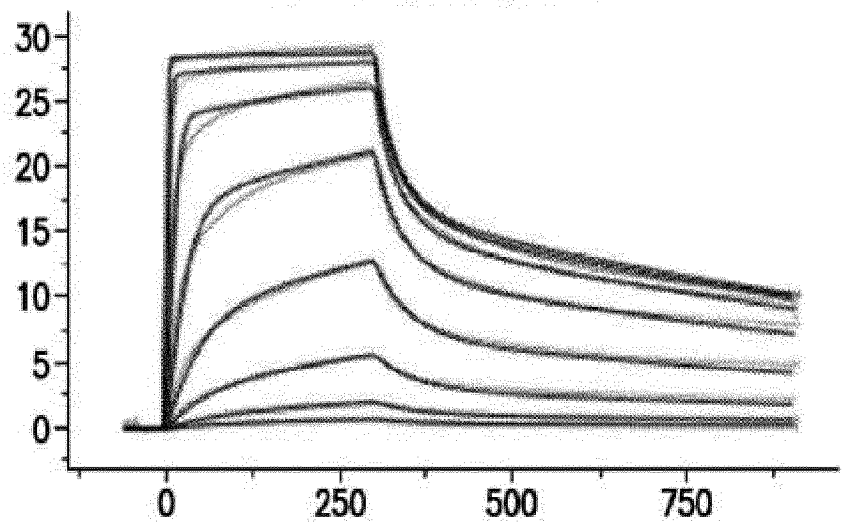
hCLEC12A K224Q; AB0089; модель с двумя состояниями

ФИГ. 138




ФИГ. 138 продолжение

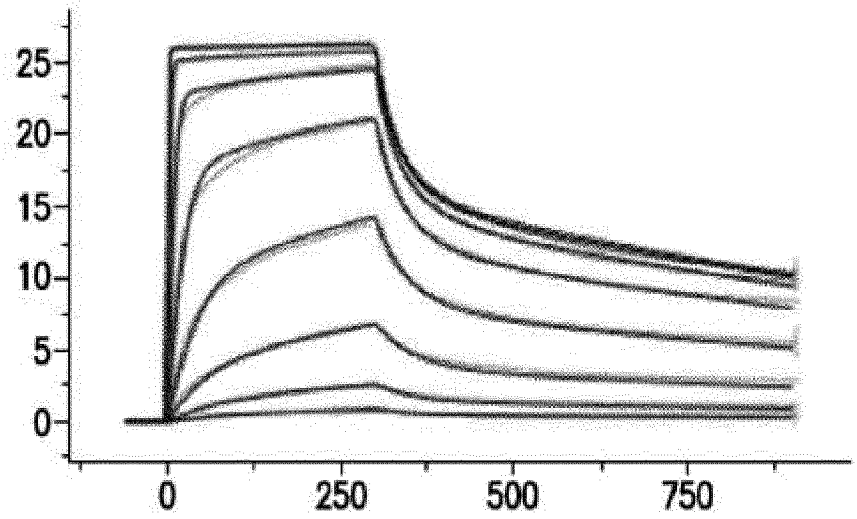
hCLEC12A, без обработки




Группа 9

hCLEC12A-His; AB0089; модель с двумя состояниями

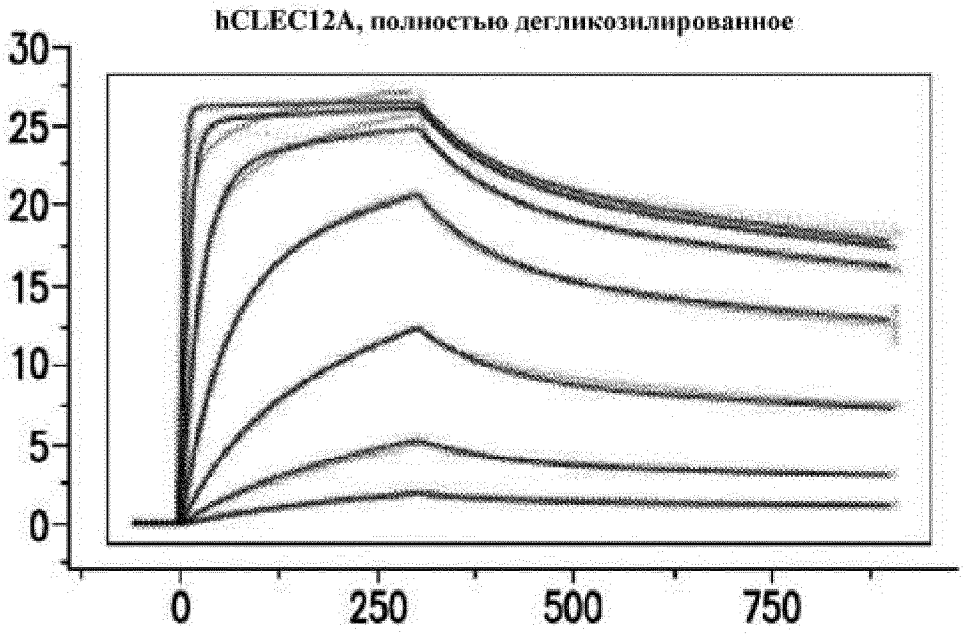
hCLEC12A, десиалилированное




Группа 4

Десиалилированное hCLEC12A-His; AB0089; модель с двумя состояниями

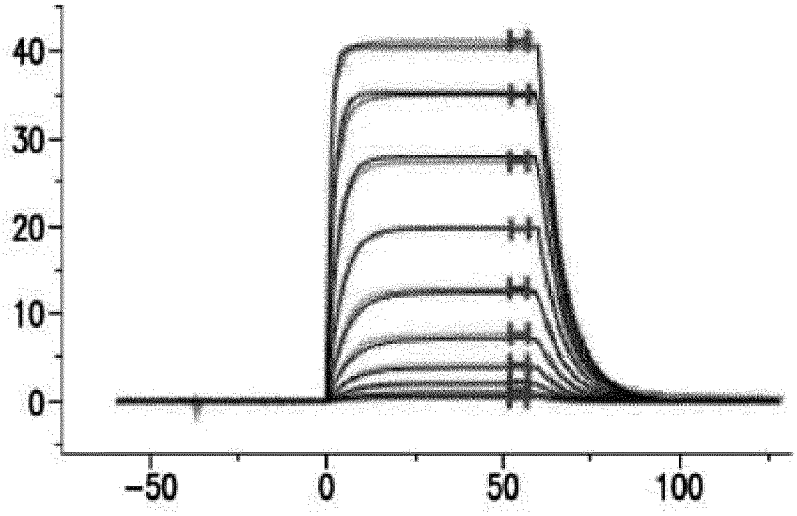
ФИГ. 139



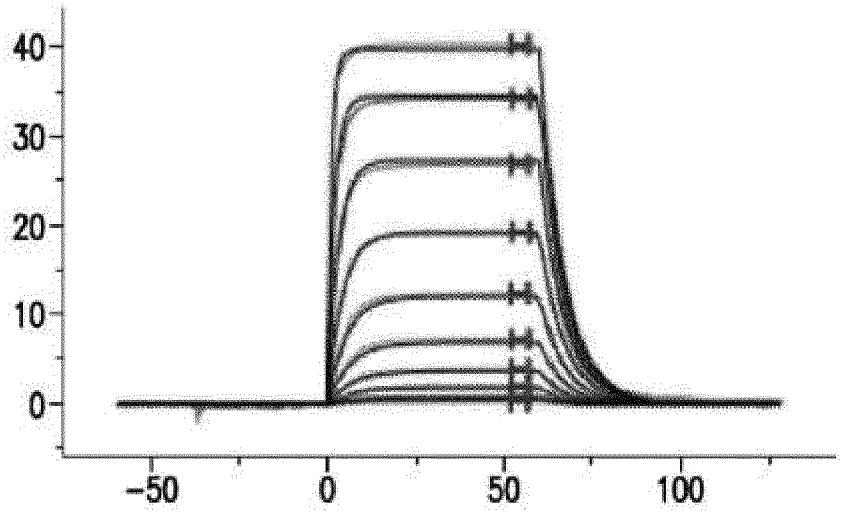

Группа 1

Дегликозилированное hCLEC12A-His; AB0089; модель с двумя состояниями

ФИГ. 139 продолжение

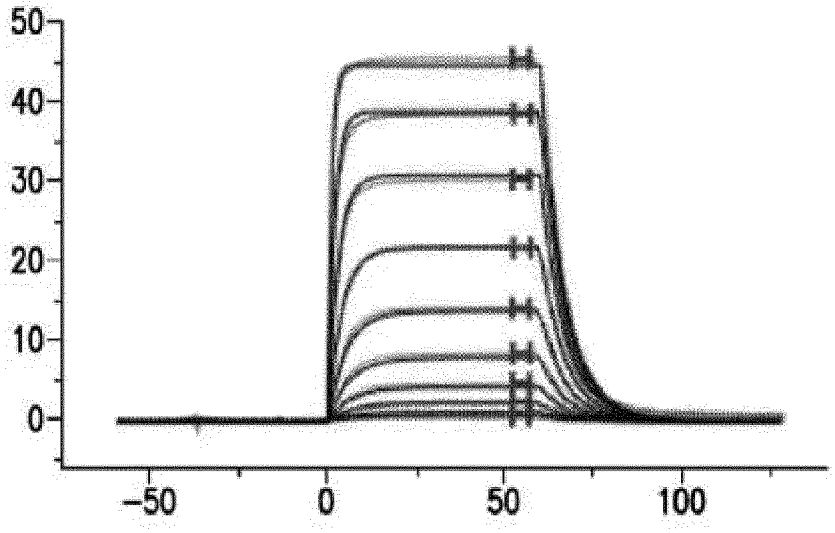



Группа 16
AB0089-002; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

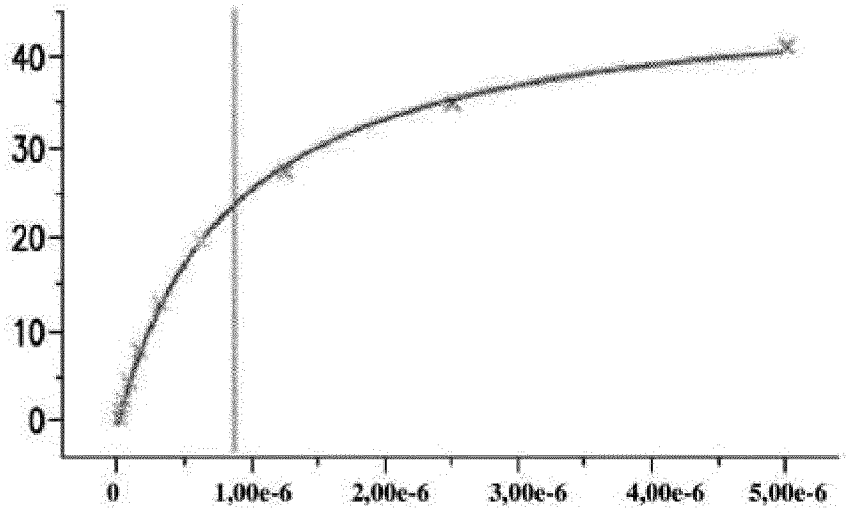



Группа 17
AB0089-002; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

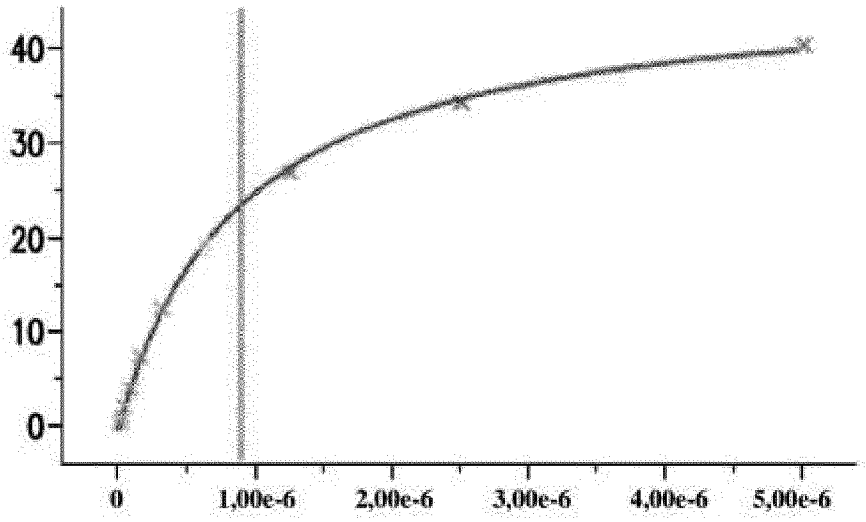
ФИГ. 140



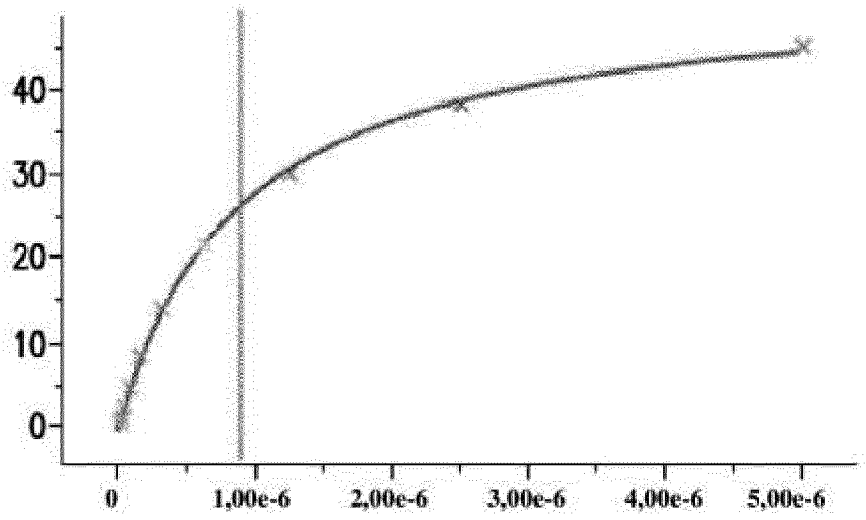

Группа 18
AB0089-002; mFc-hNKG2D; связывание 1:1




Группа 16
AB0089-002; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии
ФИГ. 140 продолжение

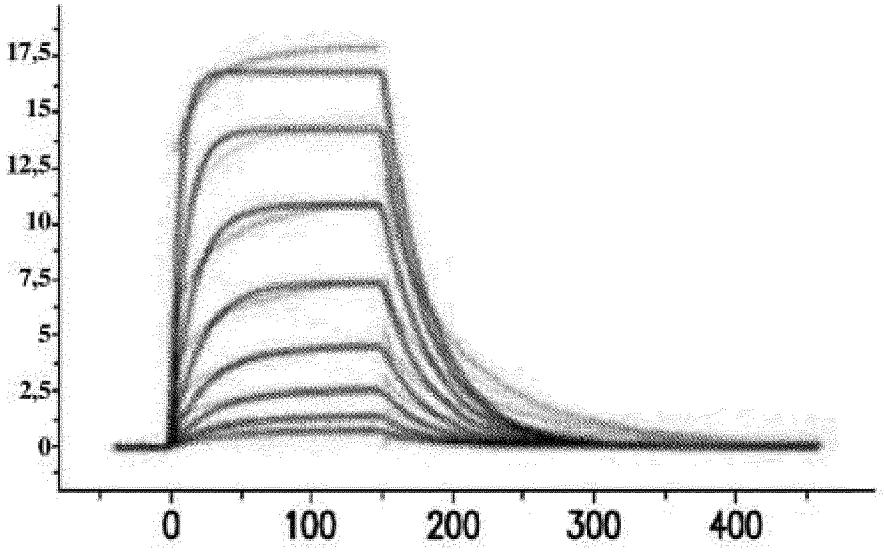



Группа 17
AB0089-002; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии



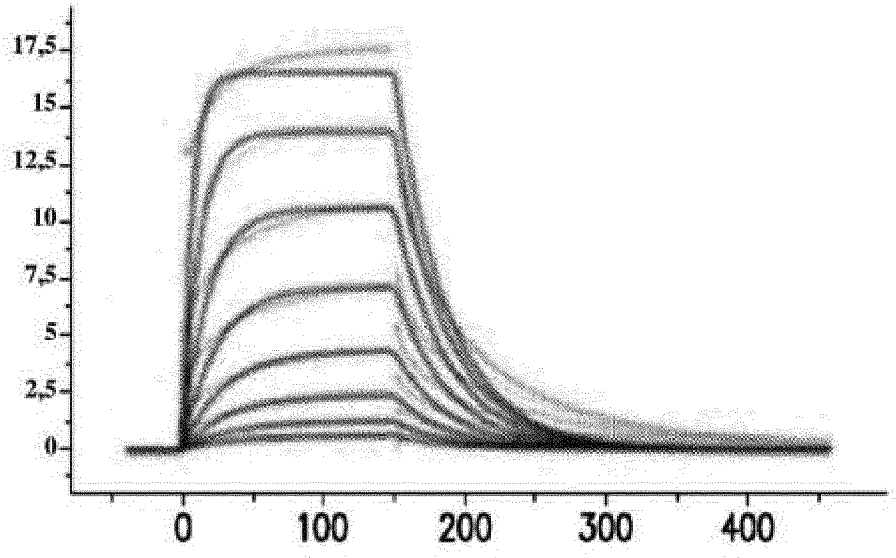

Группа 18
AB0089-002; mFc-hNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

ФИГ. 140 продолжение




Группа 1

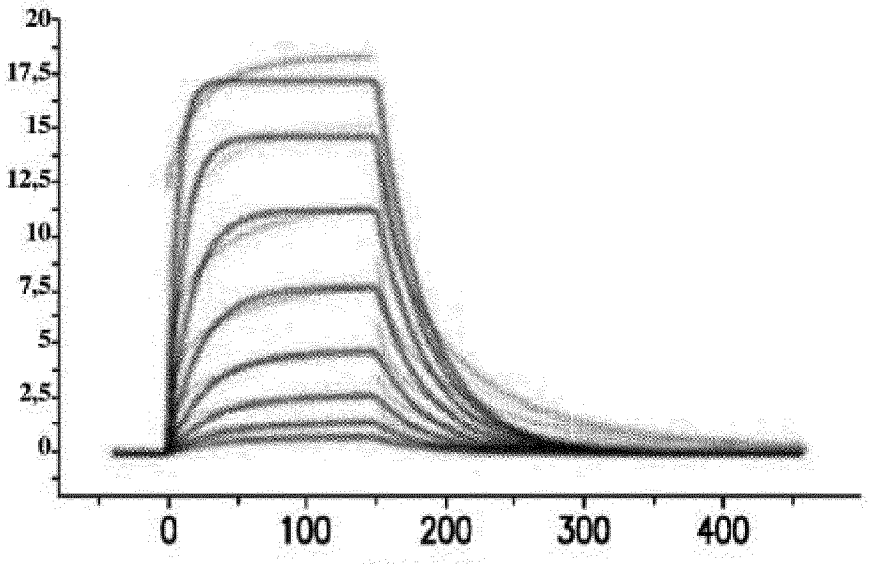
AB0089-002; связывание 1:1




Группа 2

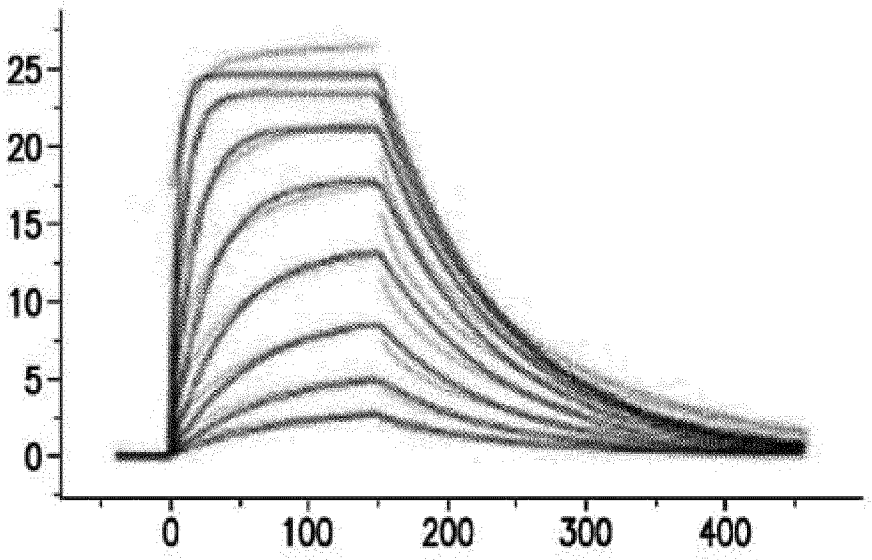
AB0089-002; связывание 1:1

ФИГ. 141




Группа 3

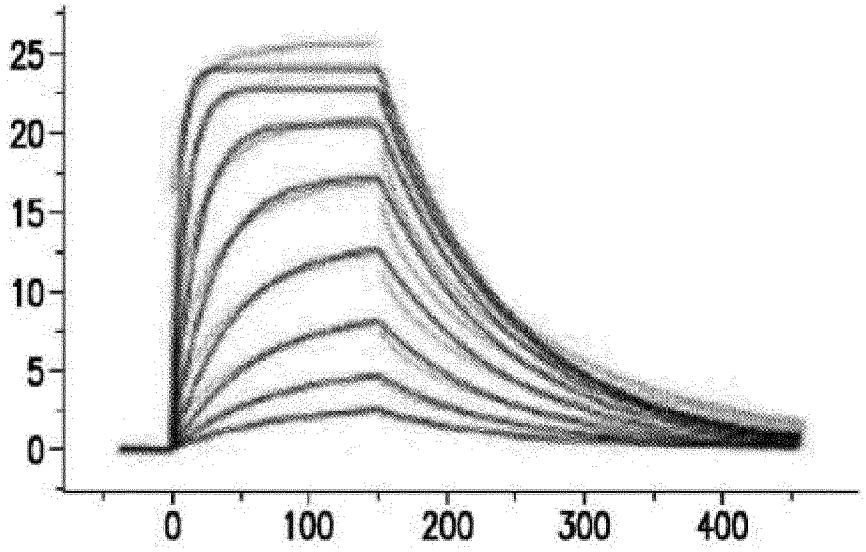
AB0089-002; связывание 1:1




Группа 25

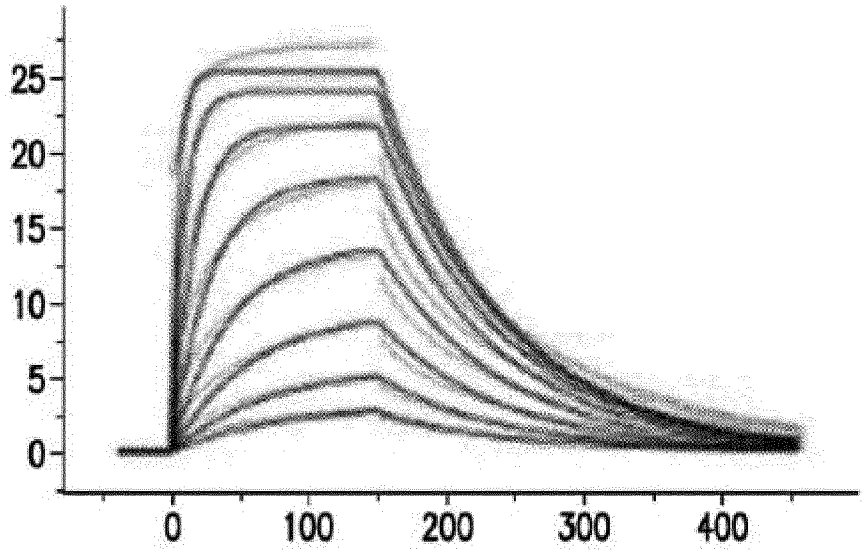
трастузумаб; связывание 1:1

ФИГ. 141 продолжение




Группа 26

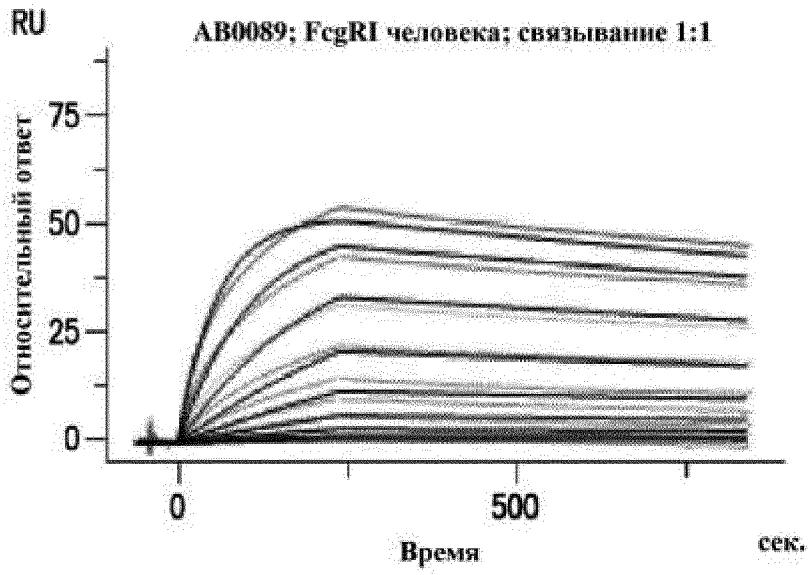
трастузумаб; связывание 1:1

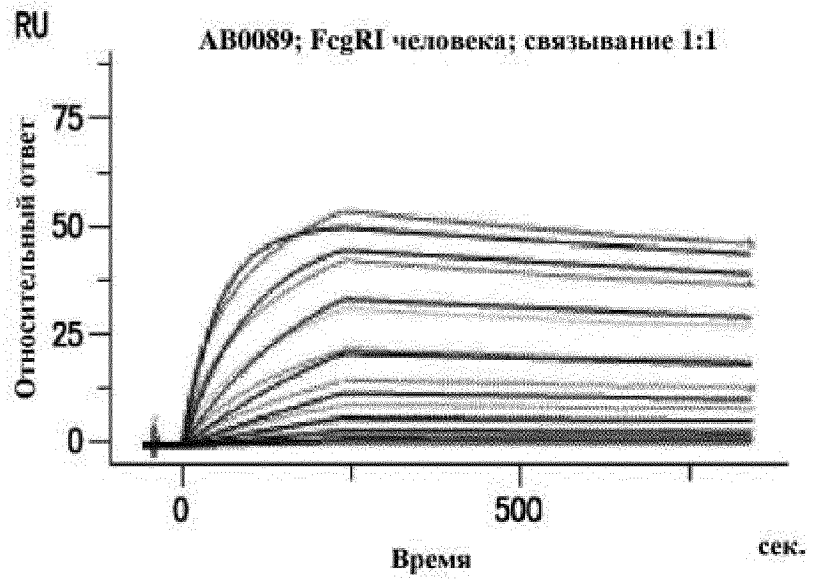



Группа 27

трастузумаб; связывание 1:1

ФИГ. 141 продолжение

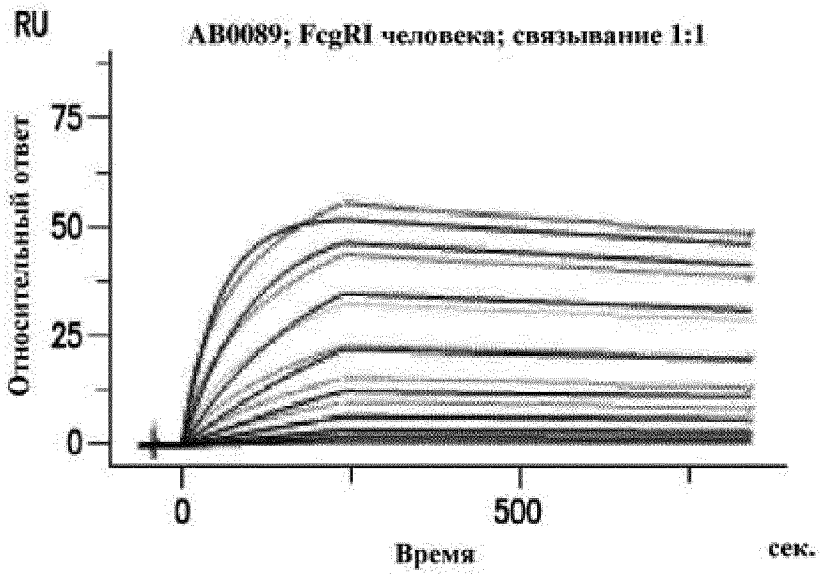


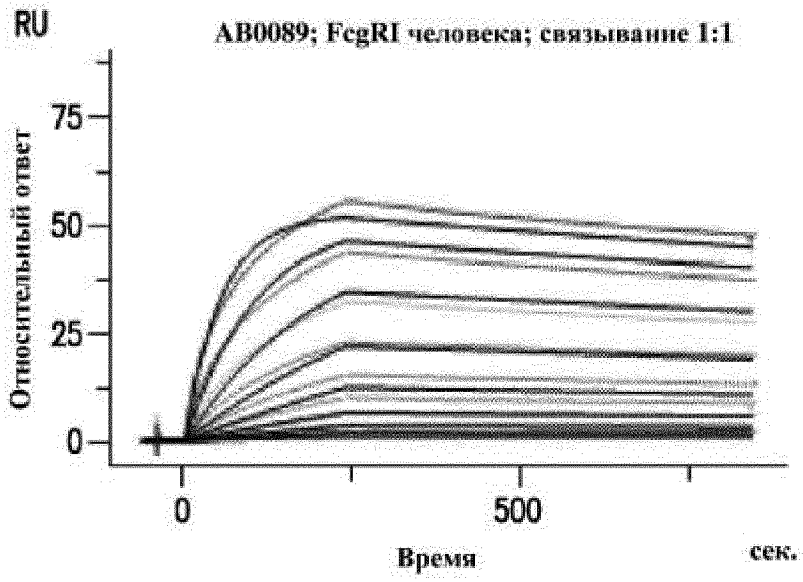




**AB0089**

$K_D$ = 5,1 ± 1,0 нМ

ФИГ. 142

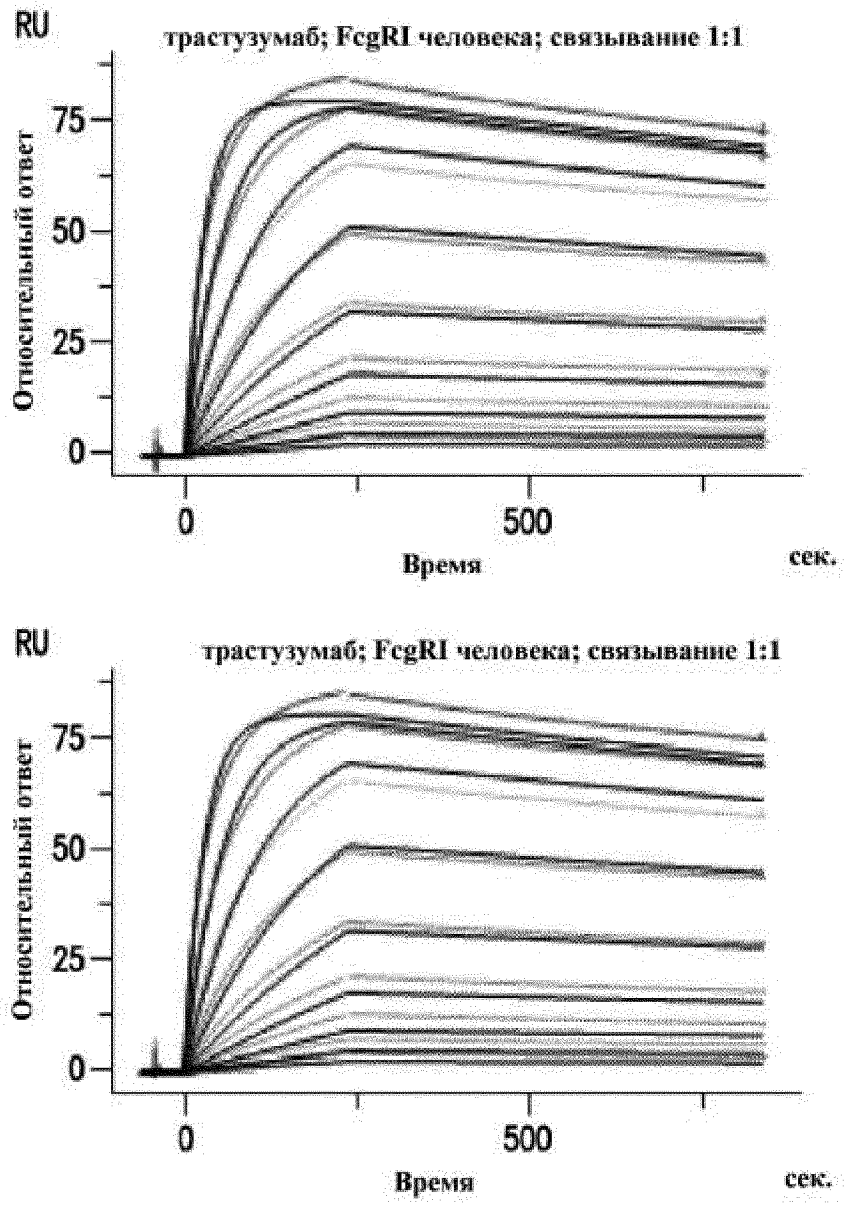



**AB0089**

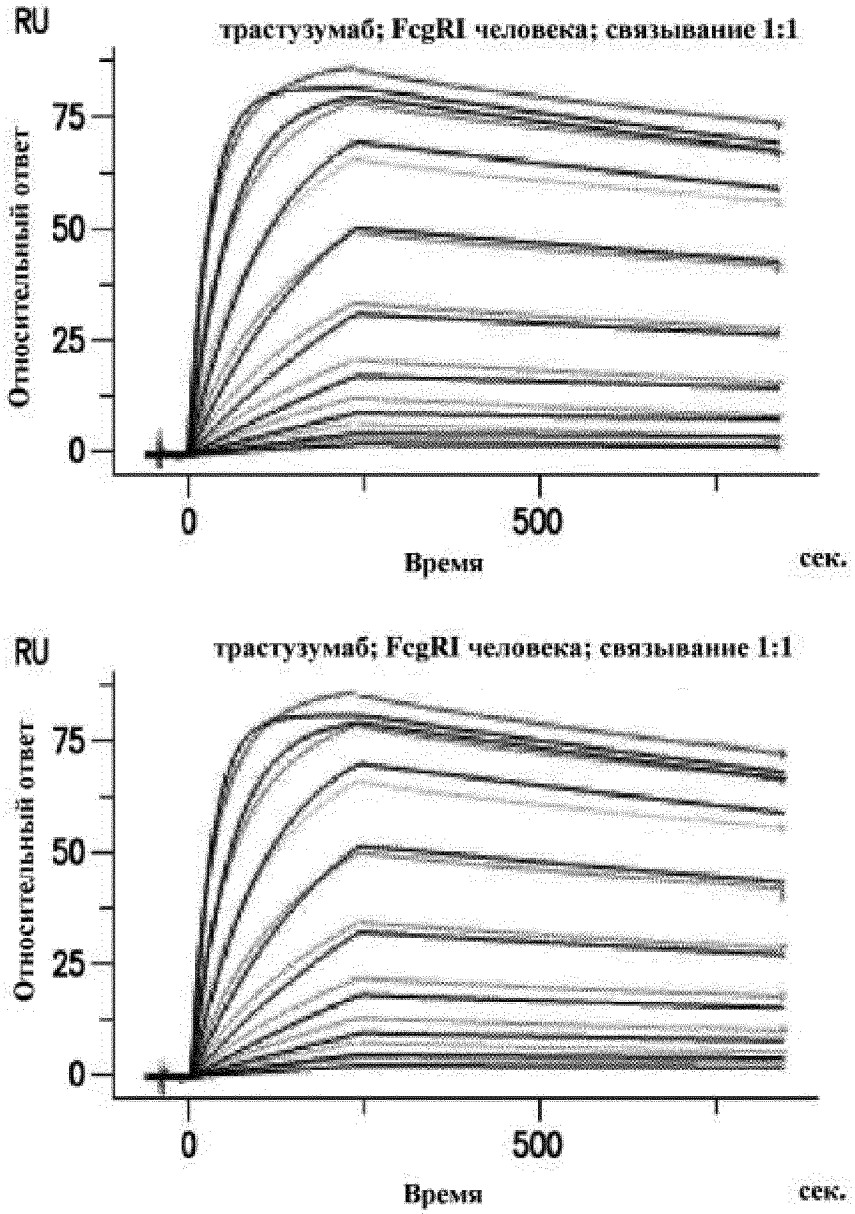
**$K_D$ = 5,1 ± 1,0 нМ**

**ФИГ. 142 продолжение**



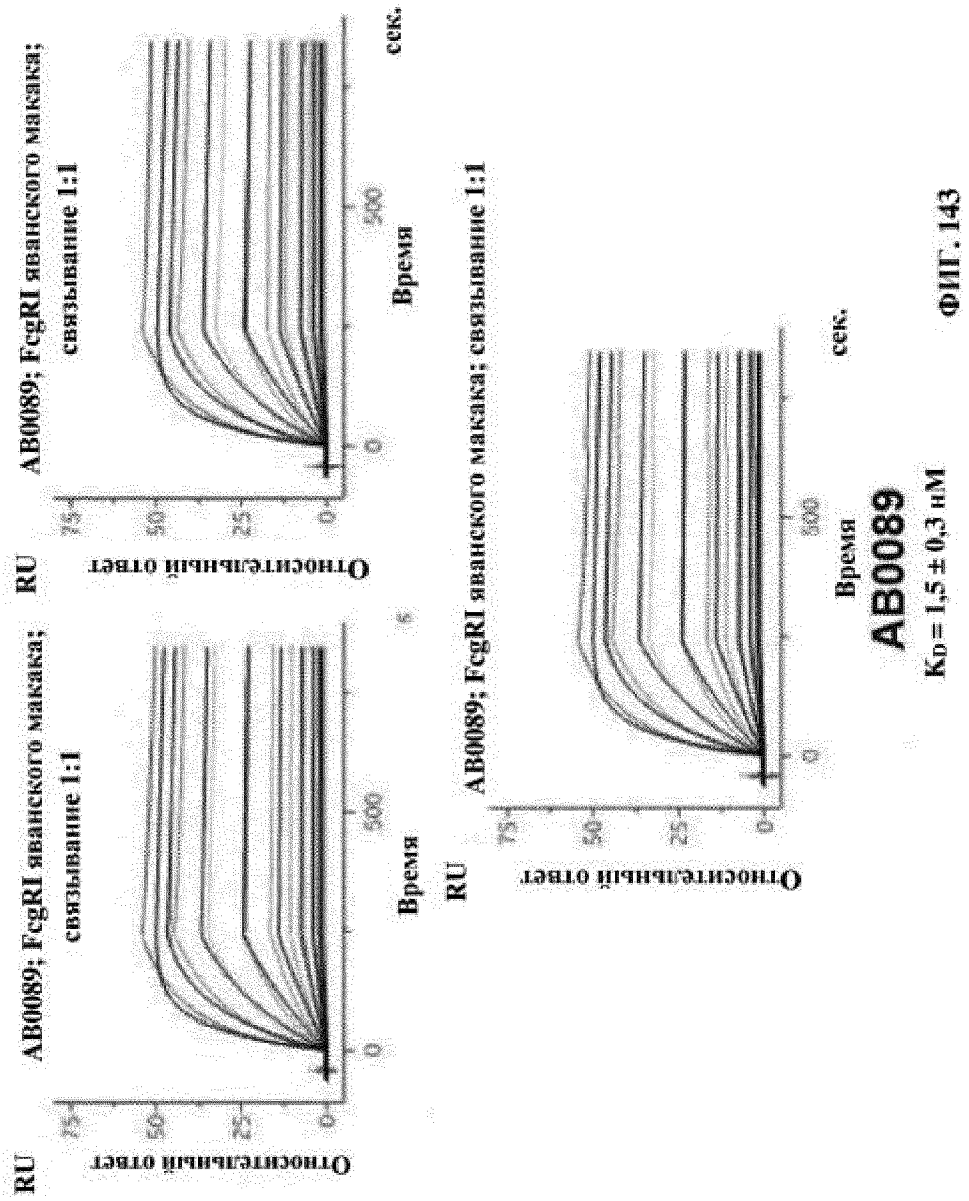

**Трастузумаб**
**$K_D$ = 2,9 ± 0,4 нМ**

**ФИГ. 142 продолжение**

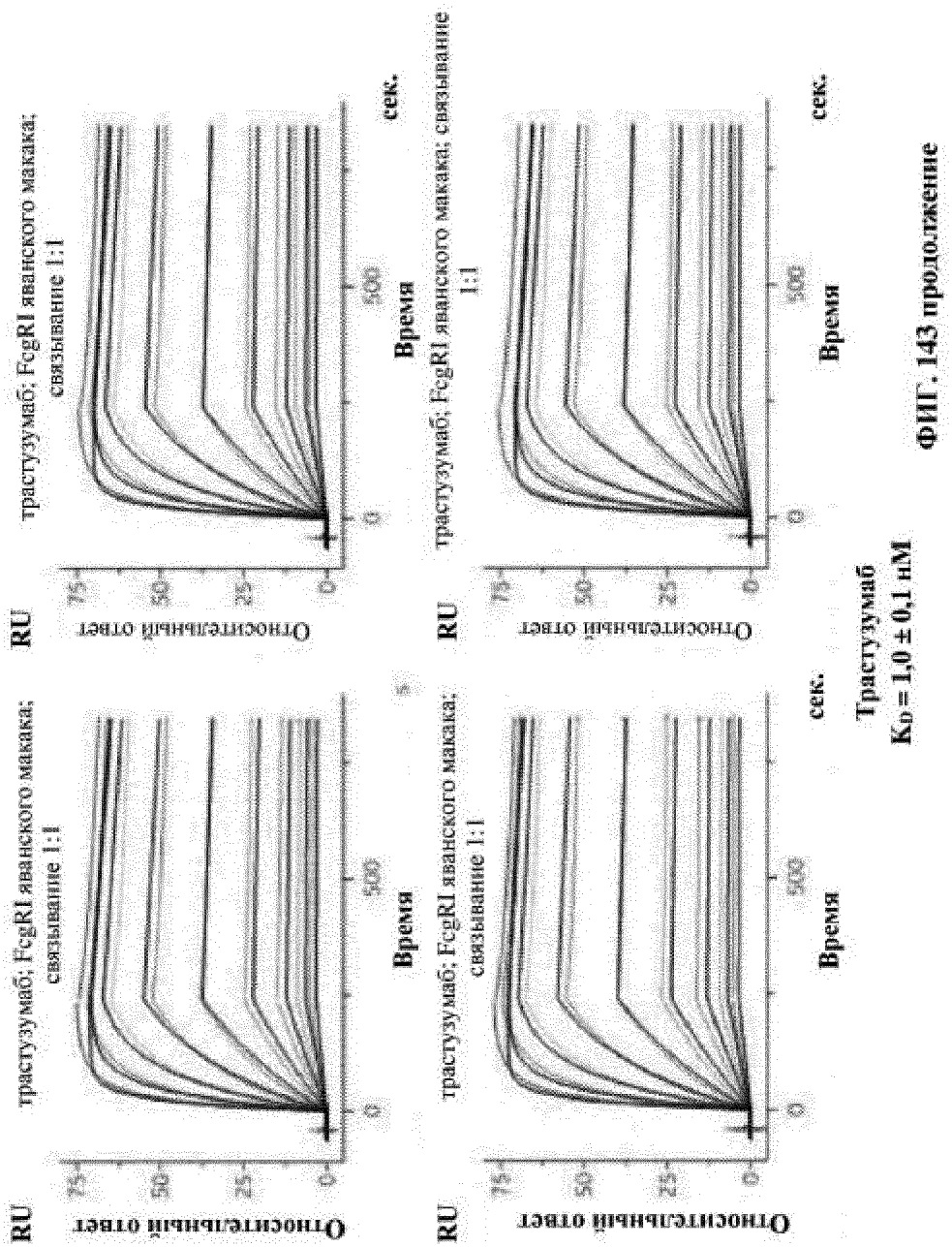



**Трастузумаб**
**$K_D$ = 2,9 ± 0,4 нМ**

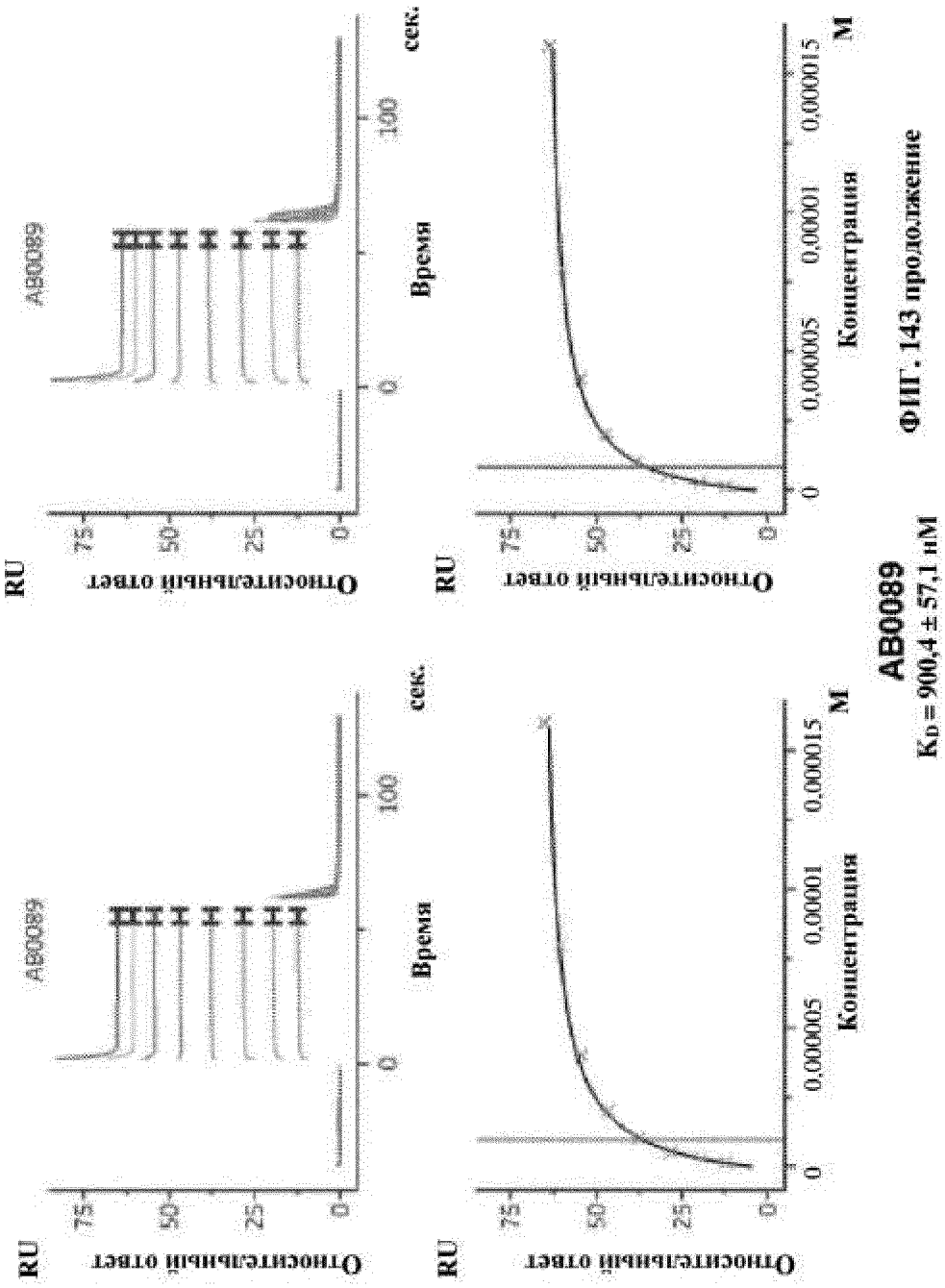
**ФИГ. 142 продолжение**


AB0089; FcgRI яванского макака; связывание 1:1
RU
Относительный ответ
Время
сек.
AB0089
$K_D$ = 1,5 ± 0,3 нМ

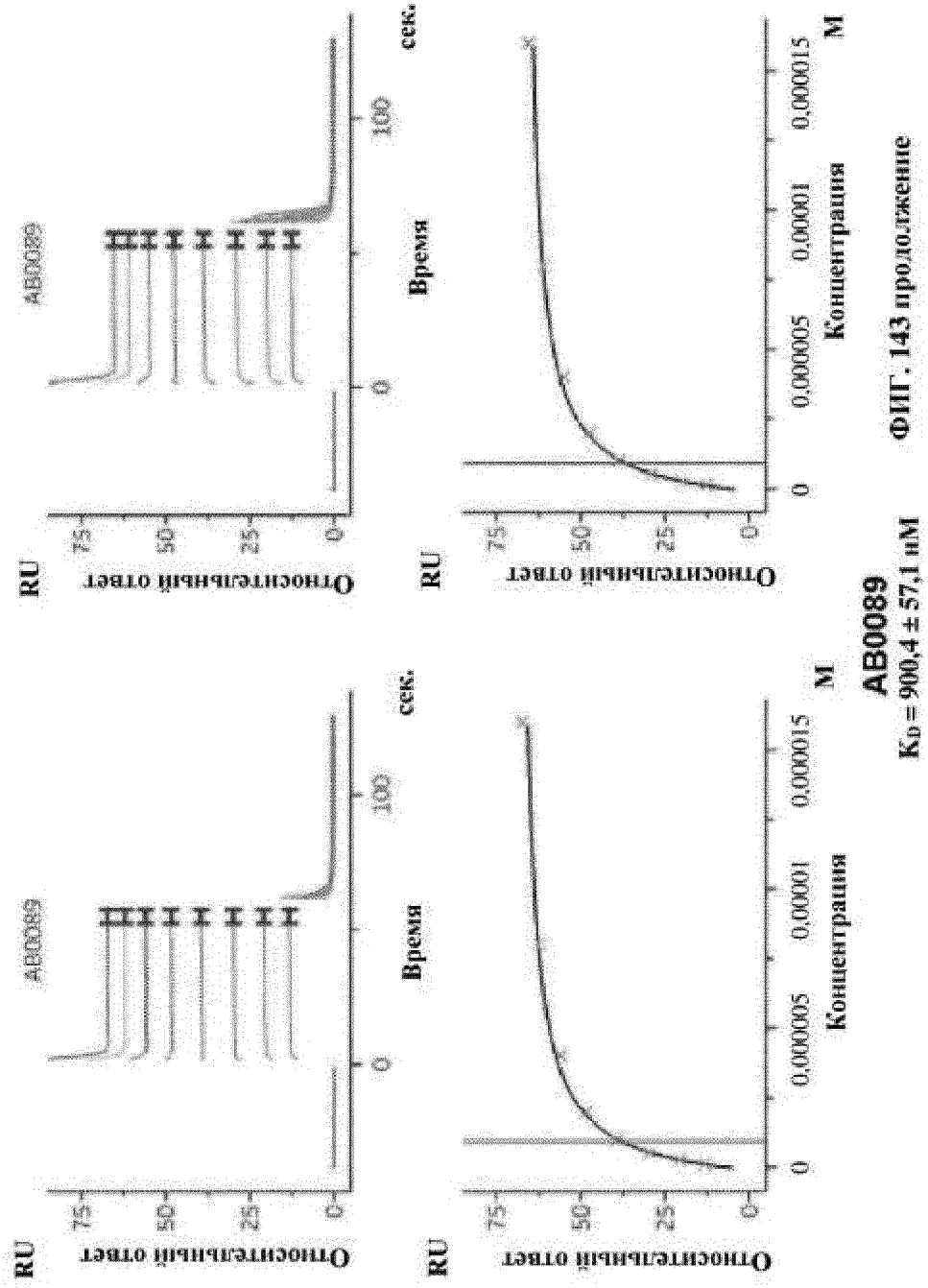
ФИГ. 143



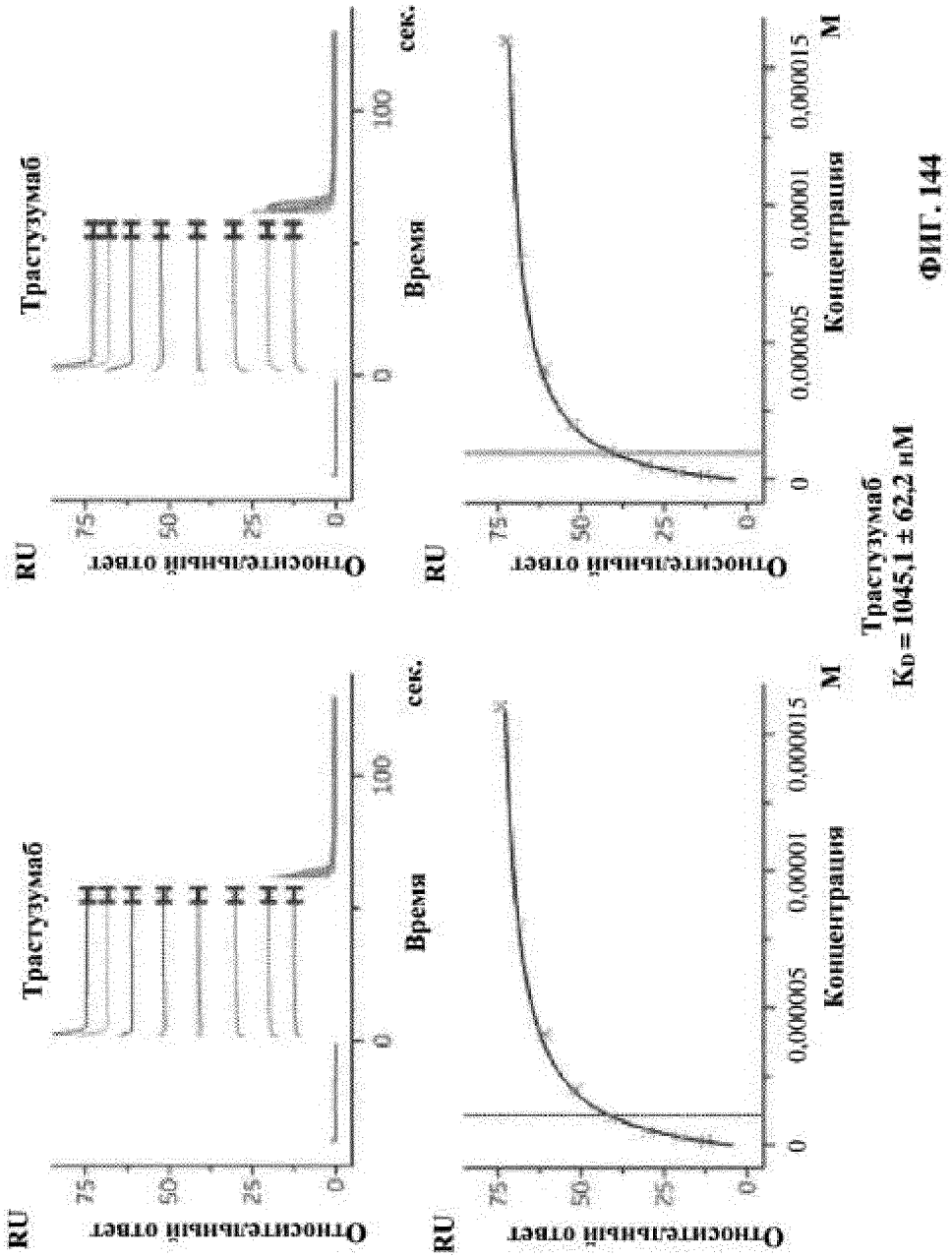

ФИГ. 143 продолжение



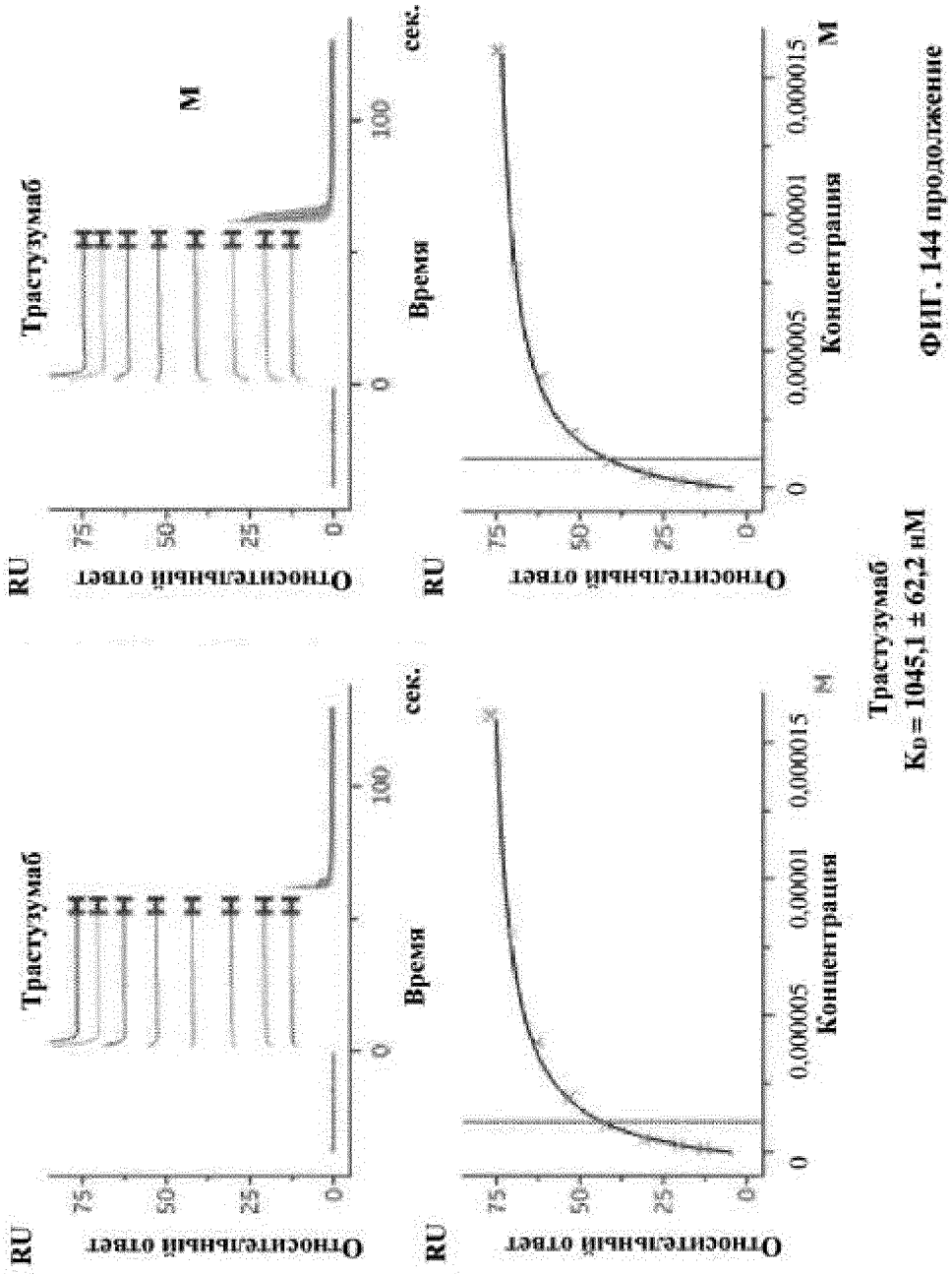

ФИГ. 143 продолжение



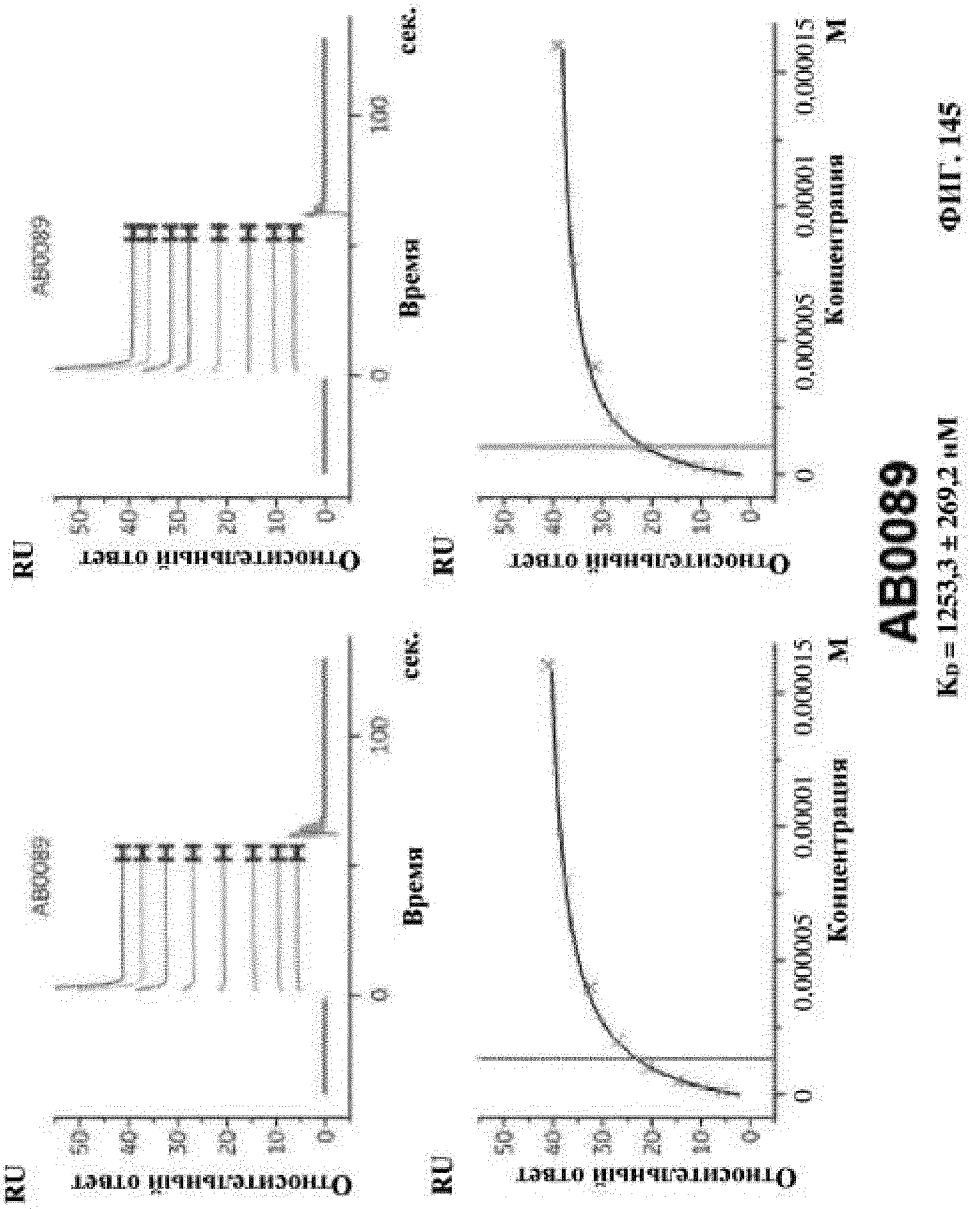

ФИГ. 143 продолжение


Трастузумаб
RU
Относительный ответ
75
50
25
0
0
100
Время
сек.
Трастузумаб
$K_D$ = 1045,1 ± 62,2 нМ
0
0,000005
0,00001
0,000015
Концентрация
M

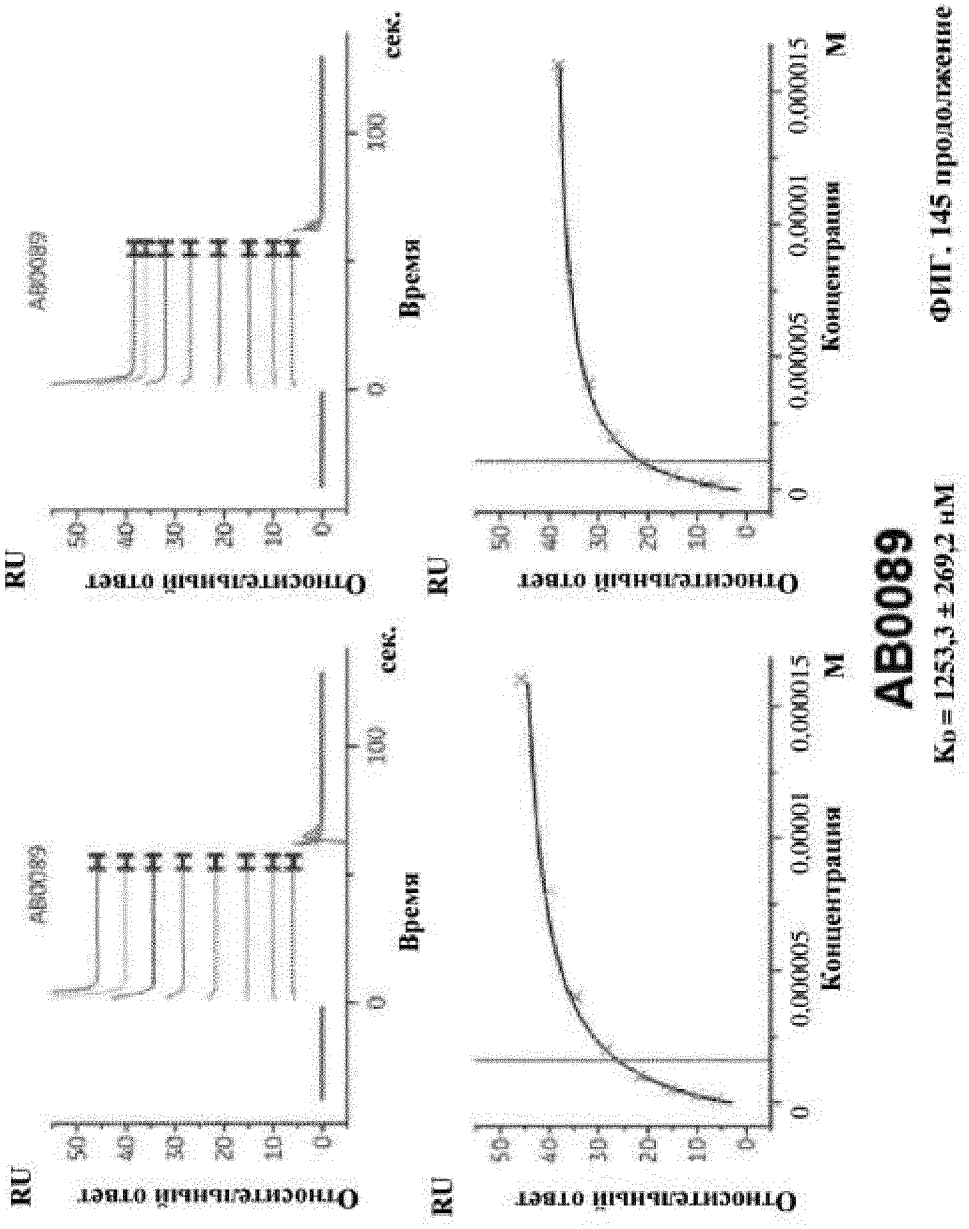
ФИГ. 144



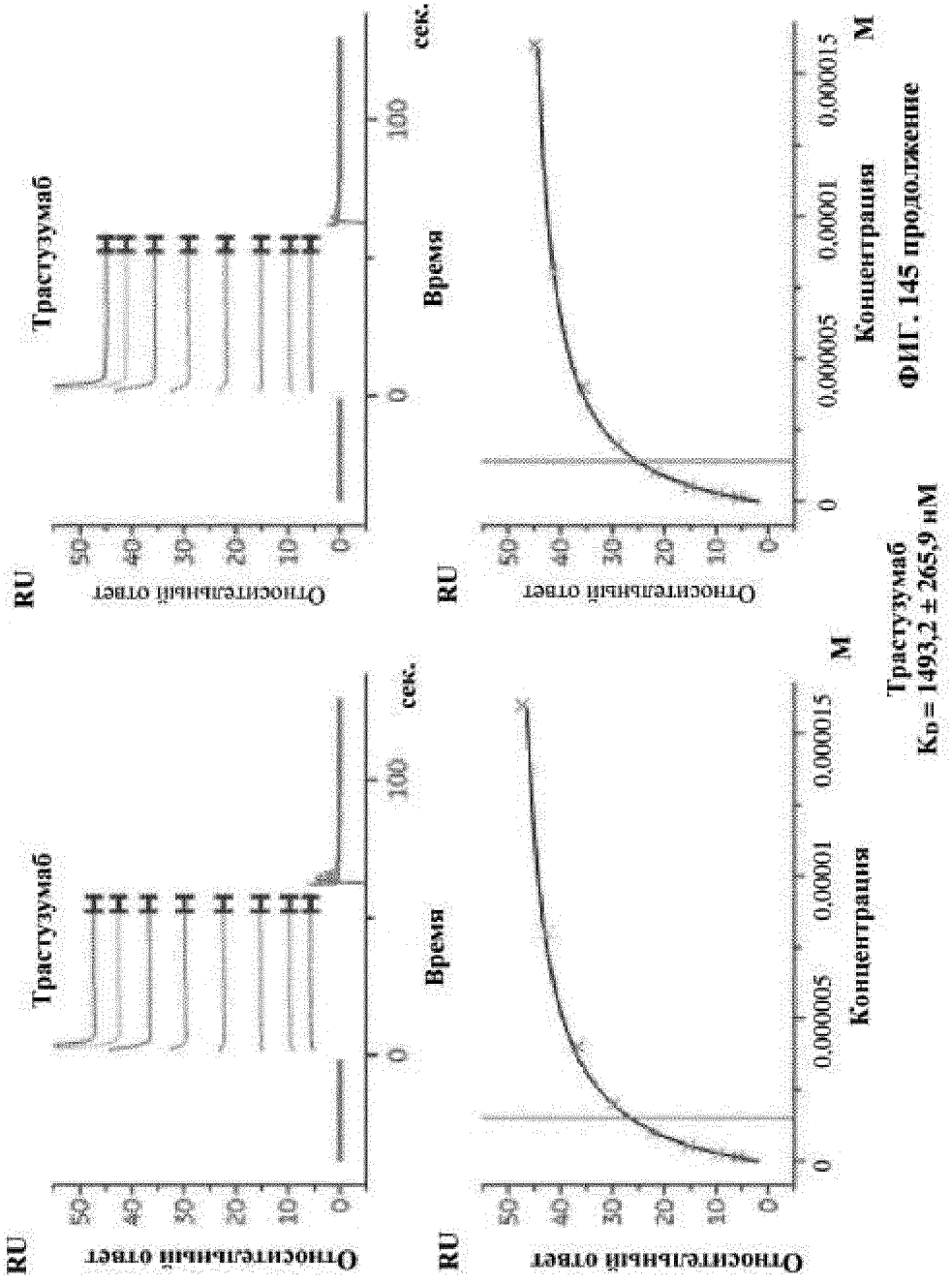

ФИГ. 144 продолжение


AB0089
RU
Относительный ответ
Время
сек.
Концентрация
M
AB0089
$K_D$ = 1253,3 ± 269,2 нМ

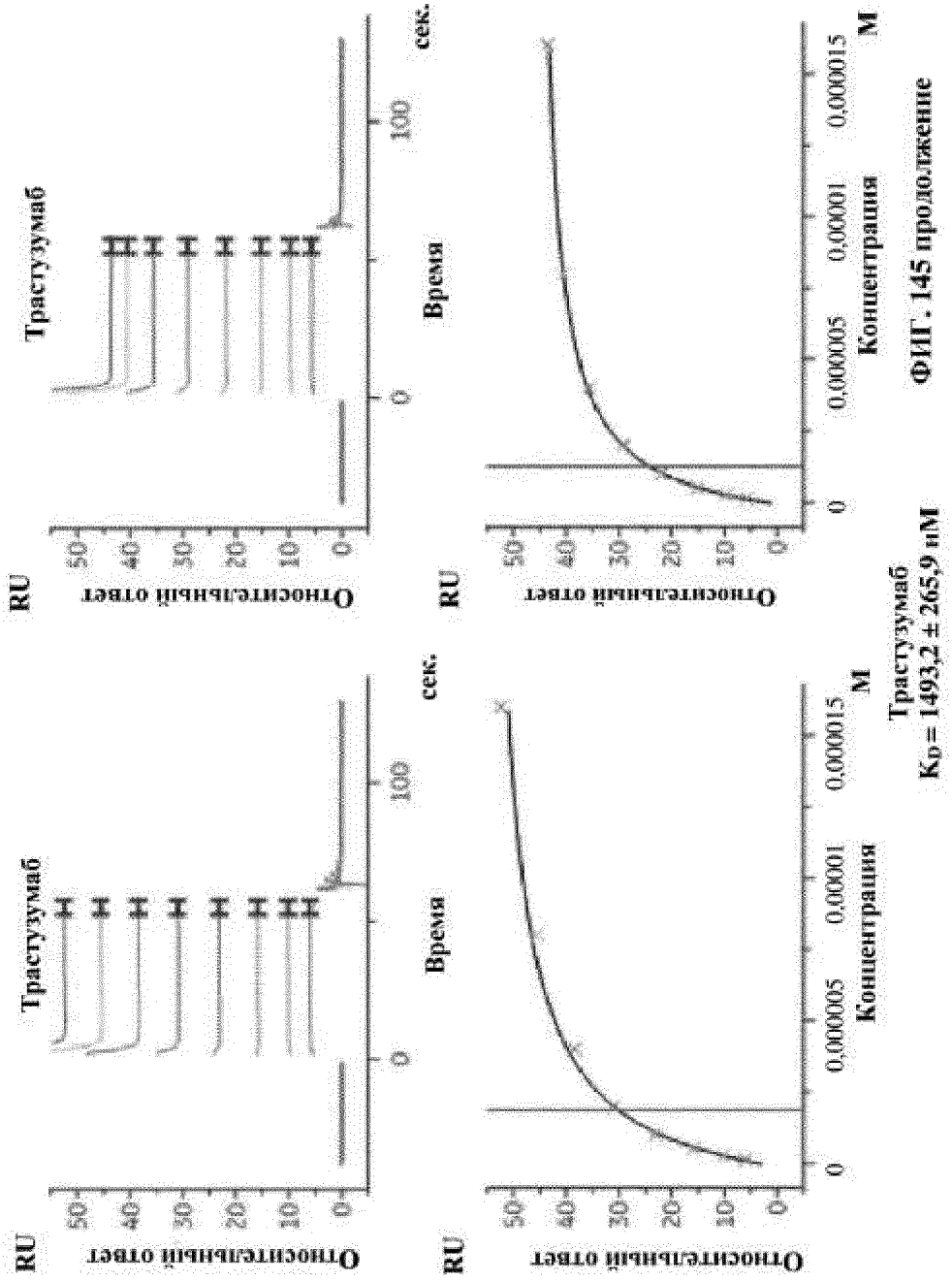
ФИГ. 145



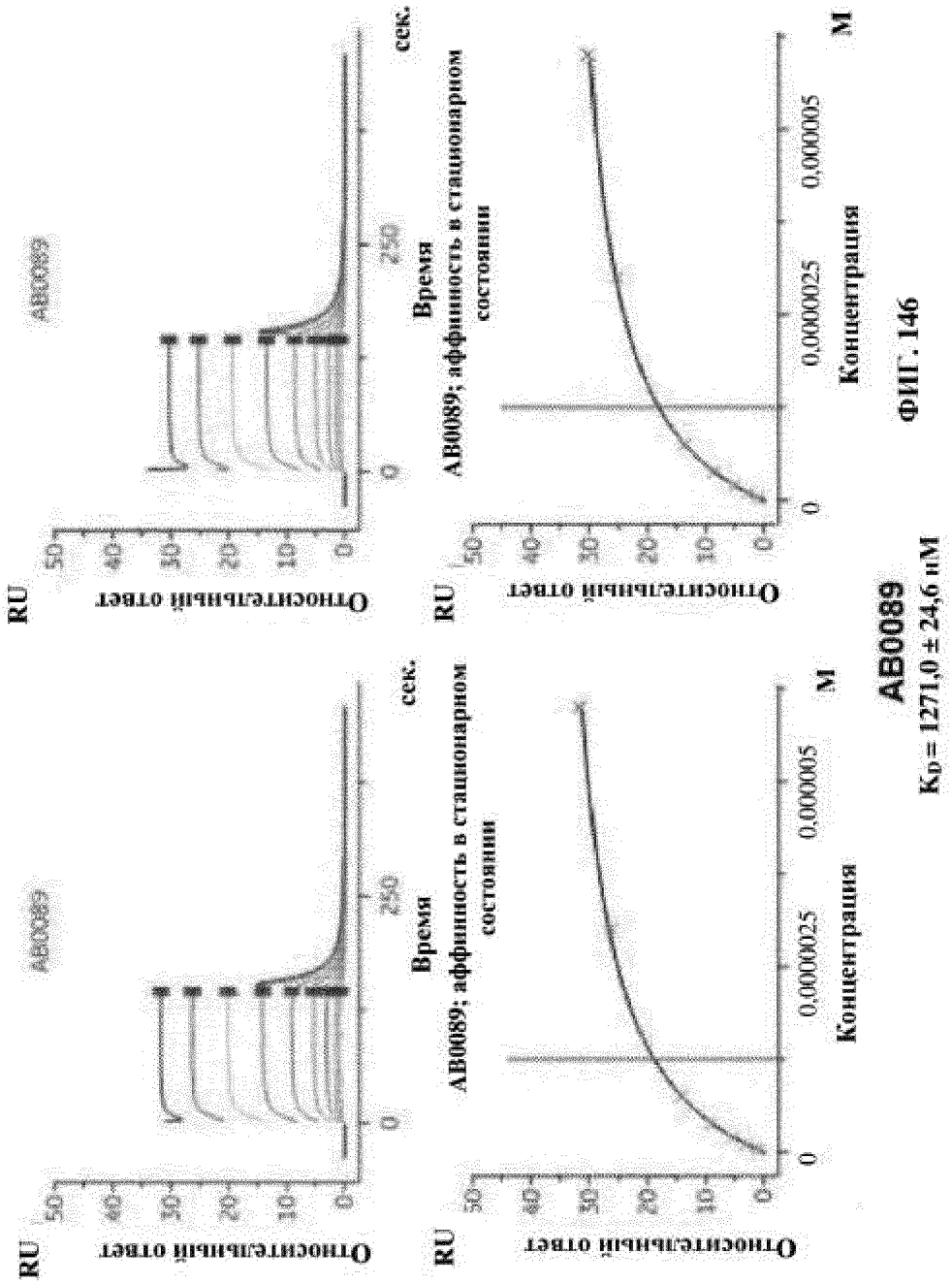

ФИГ. 145 продолжение



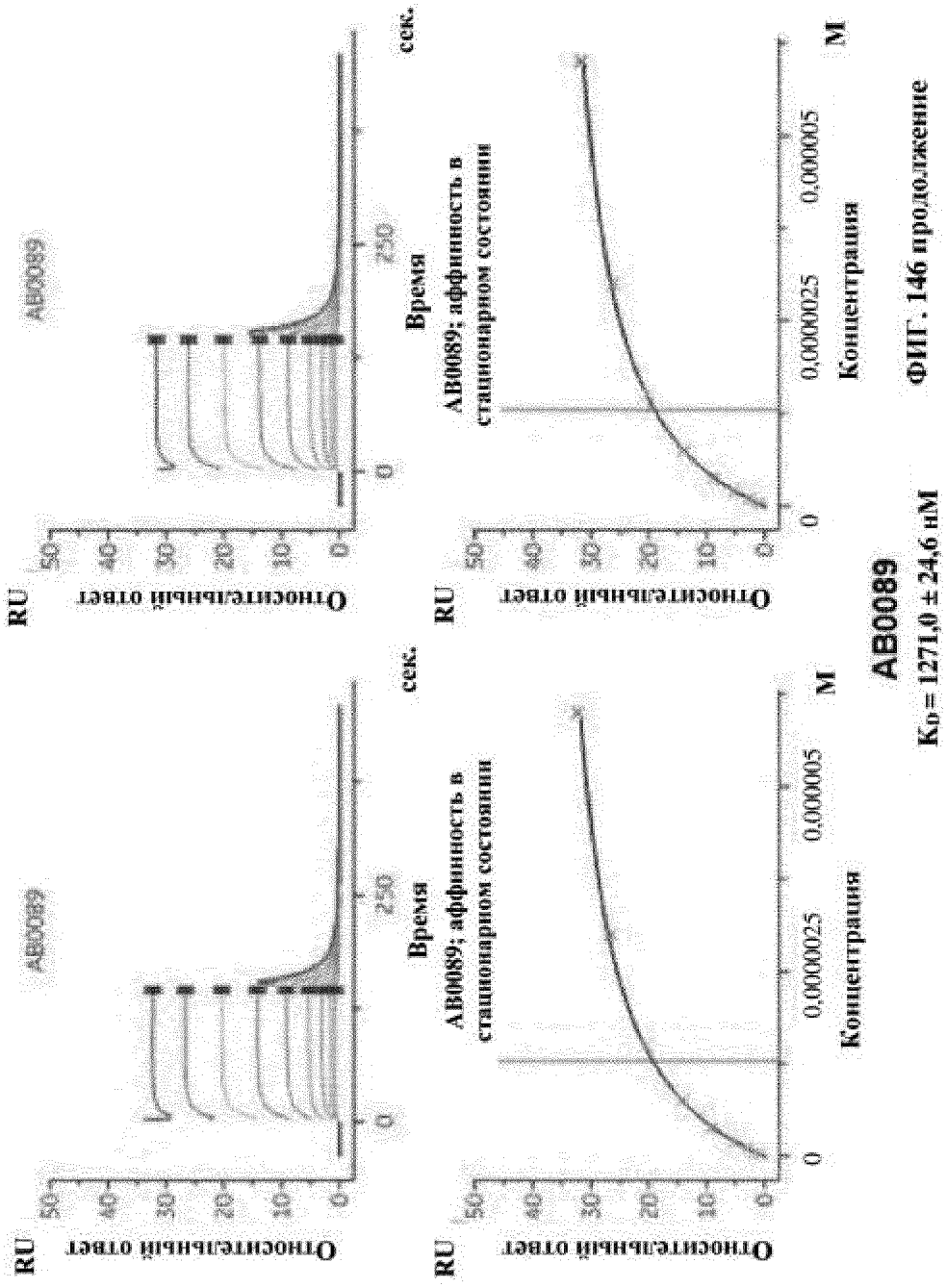

ФИГ. 145 продолжение



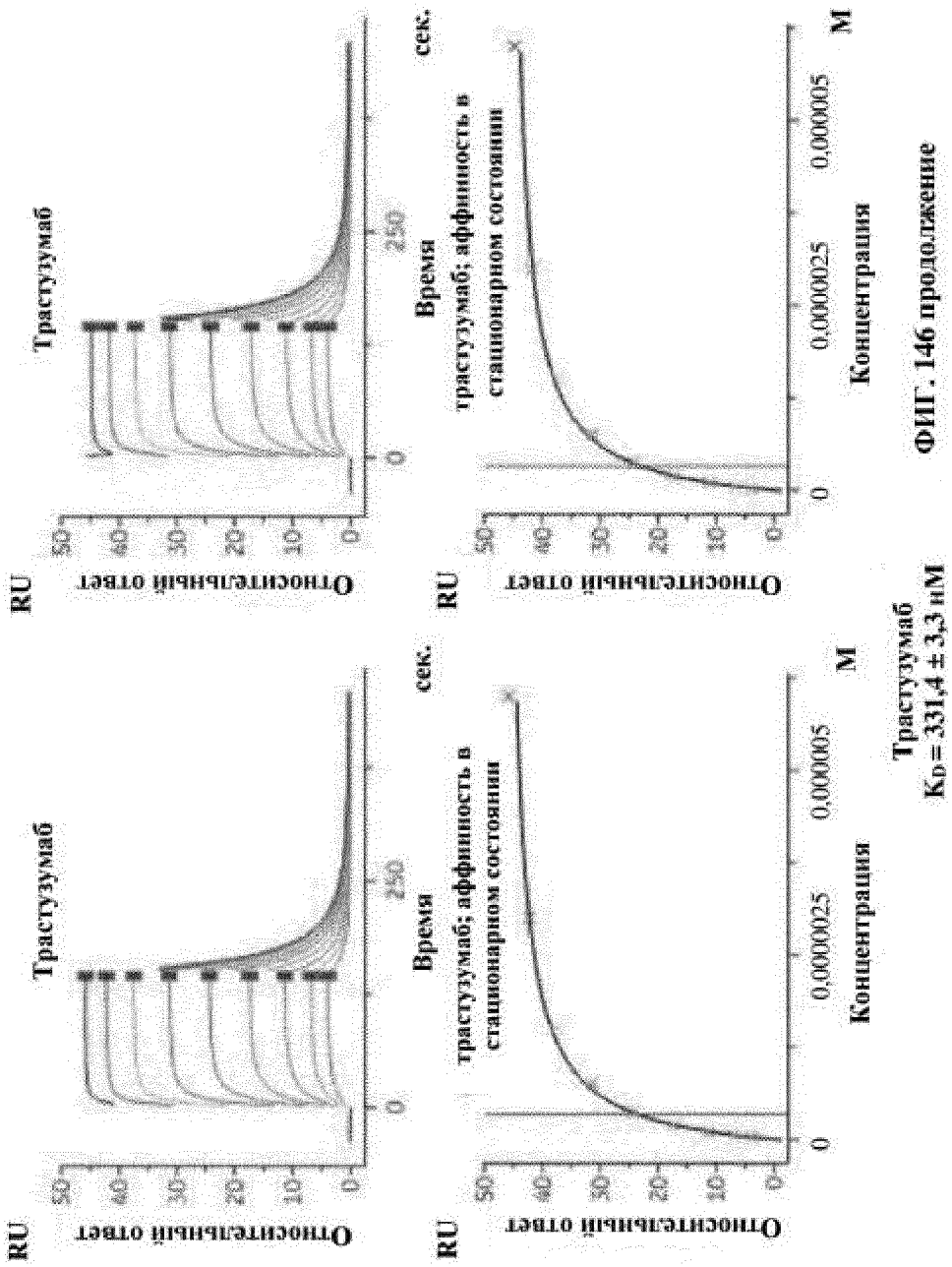

ФИГ. 145 продолжение


AB0089
RU
Относительный ответ
Время
сек.
AB0089; аффинность в стационарном состоянии
Концентрация
M
AB0089
$K_D$ = 1271,0 ± 24,6 нМ

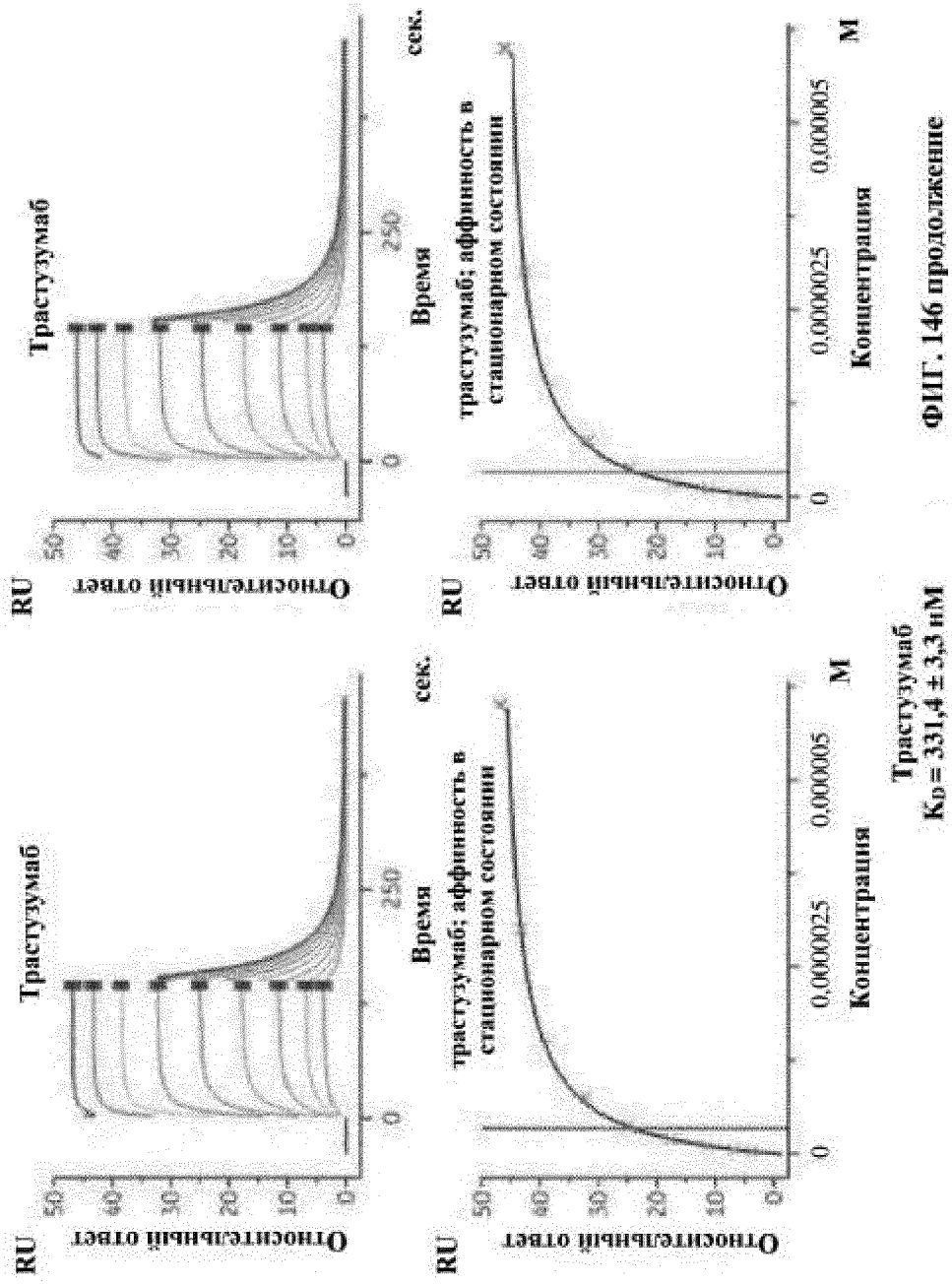
ФИГ. 146



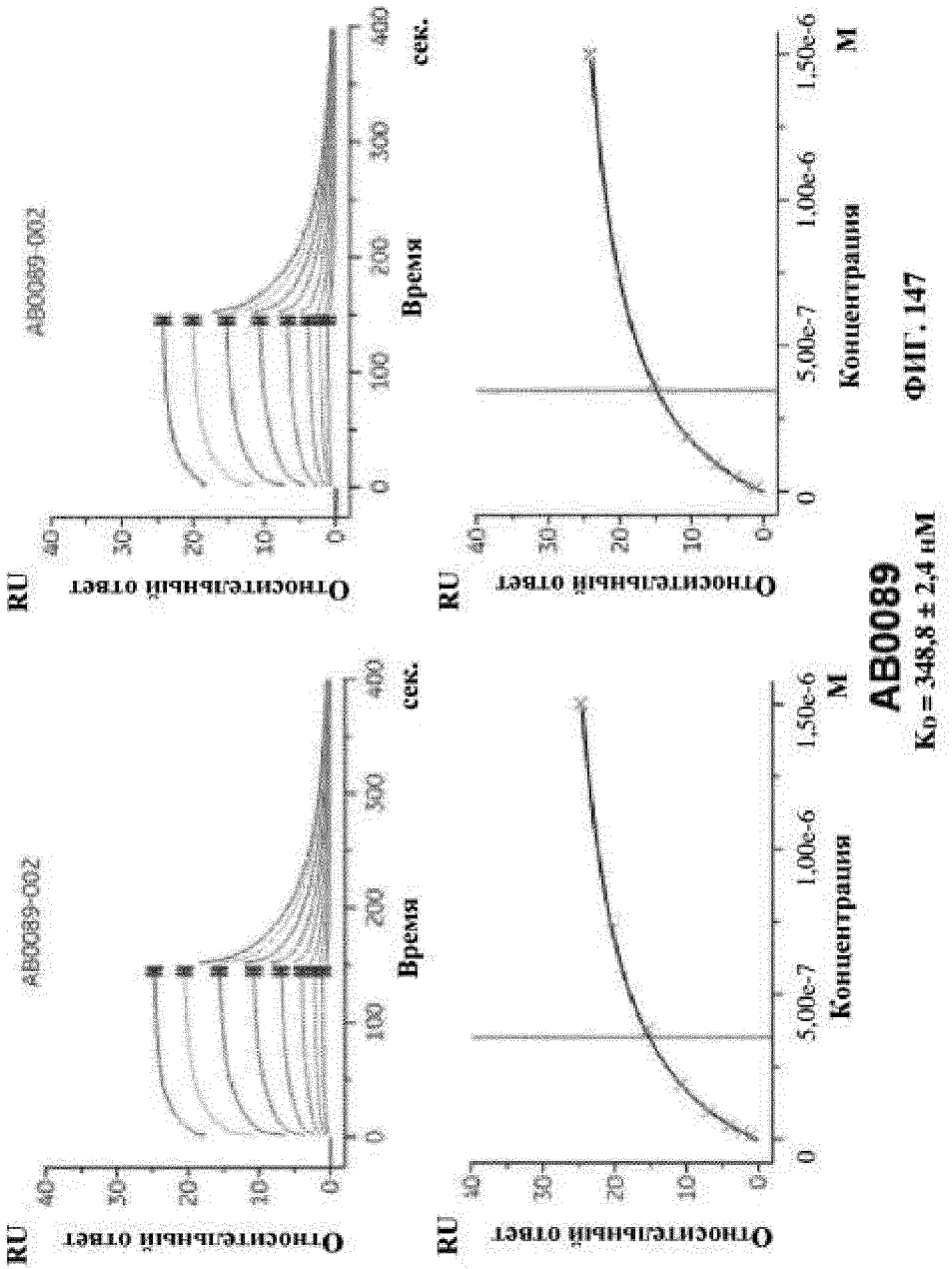

ФИГ. 146 продолжение



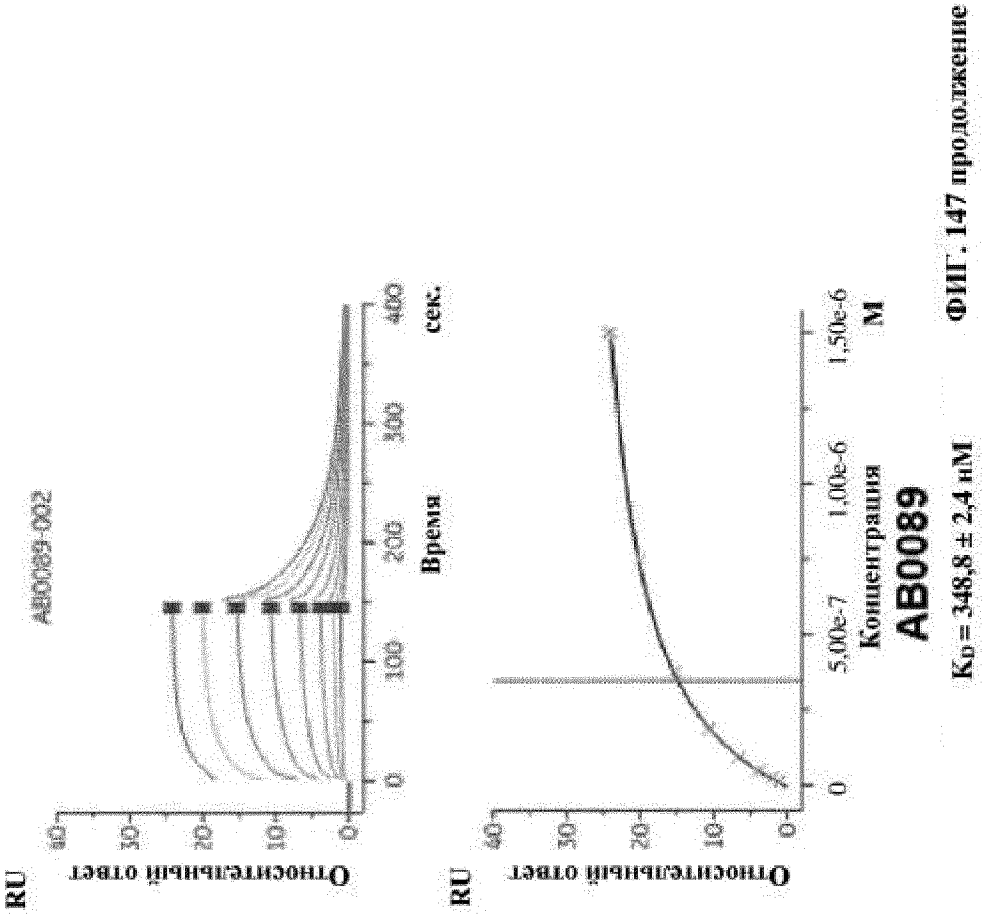

ФИГ. 146 продолжение



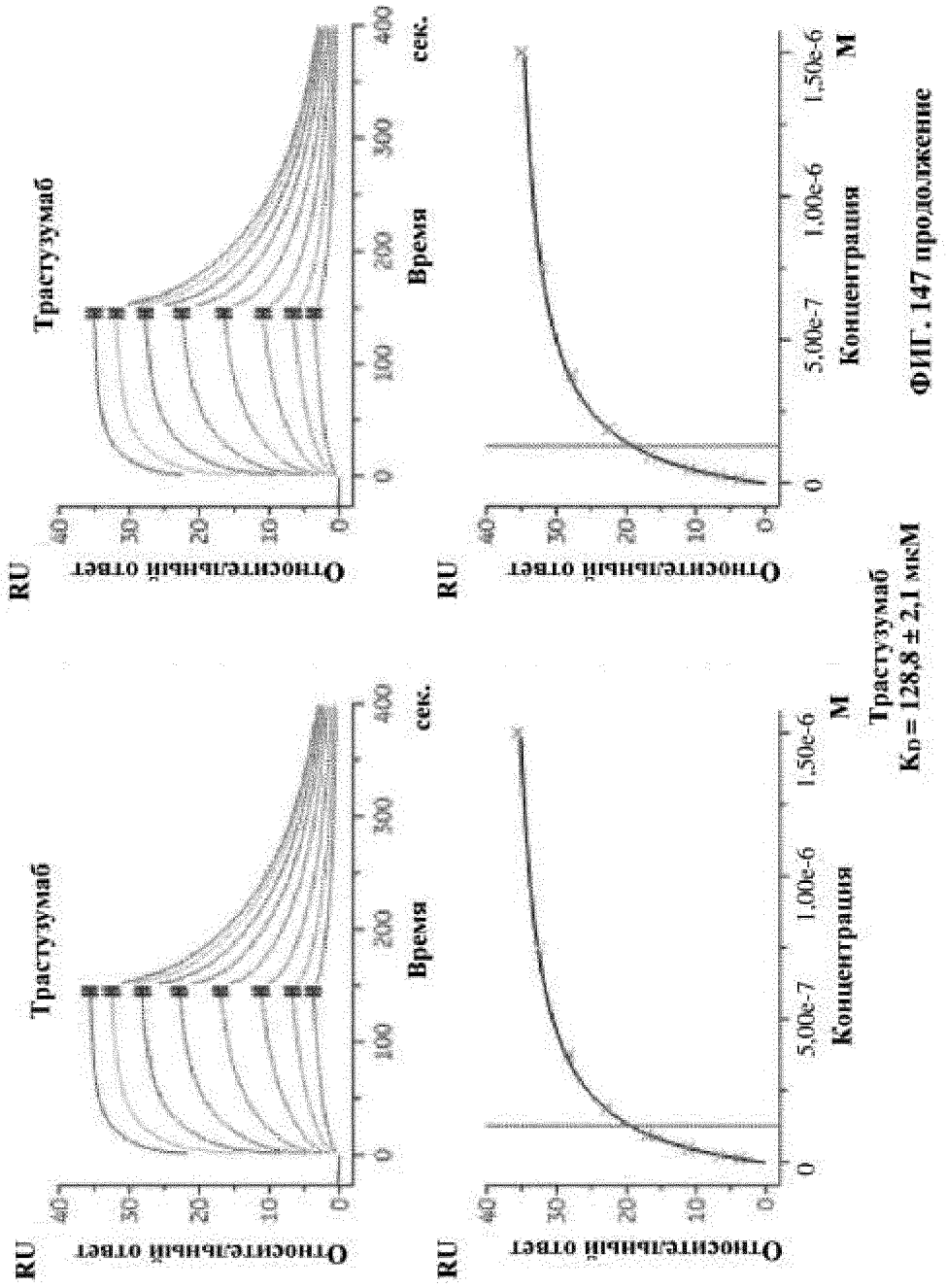

ФИГ. 146 продолжение


AB0089-002
Относительный ответ
RU
Время
сек.
Концентрация
M
AB0089
KD = 348,8 ± 2,4 нМ

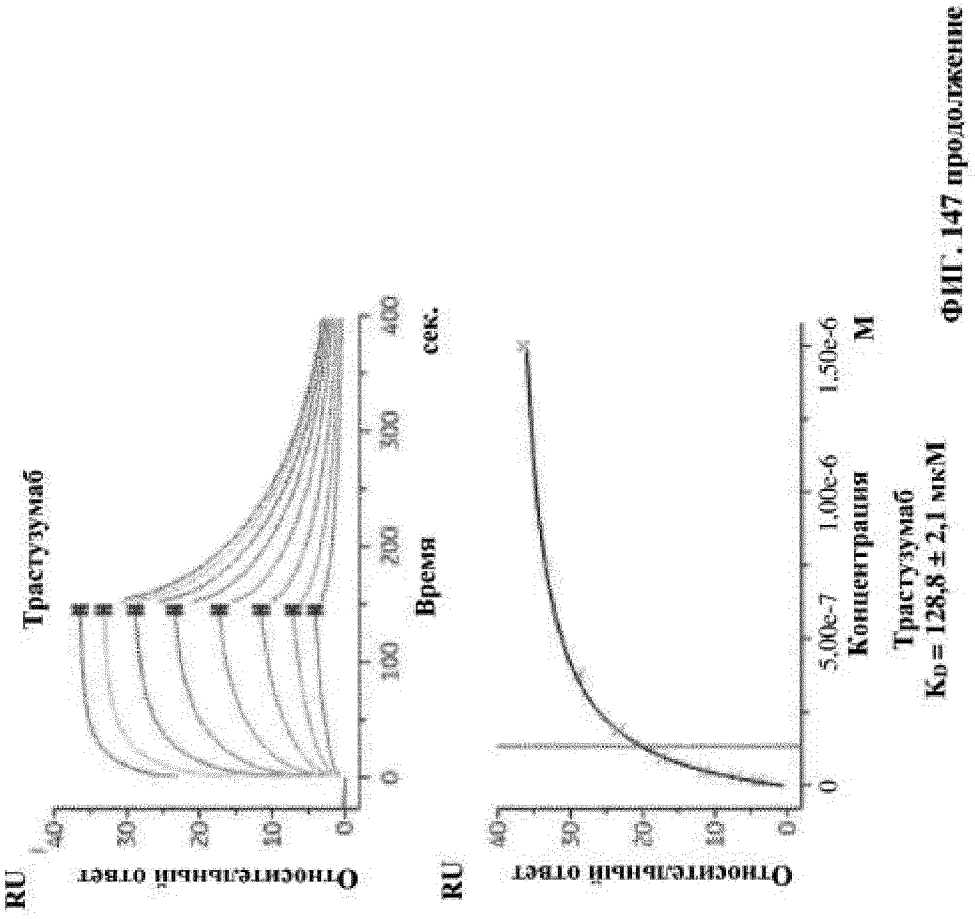
ФИГ. 147



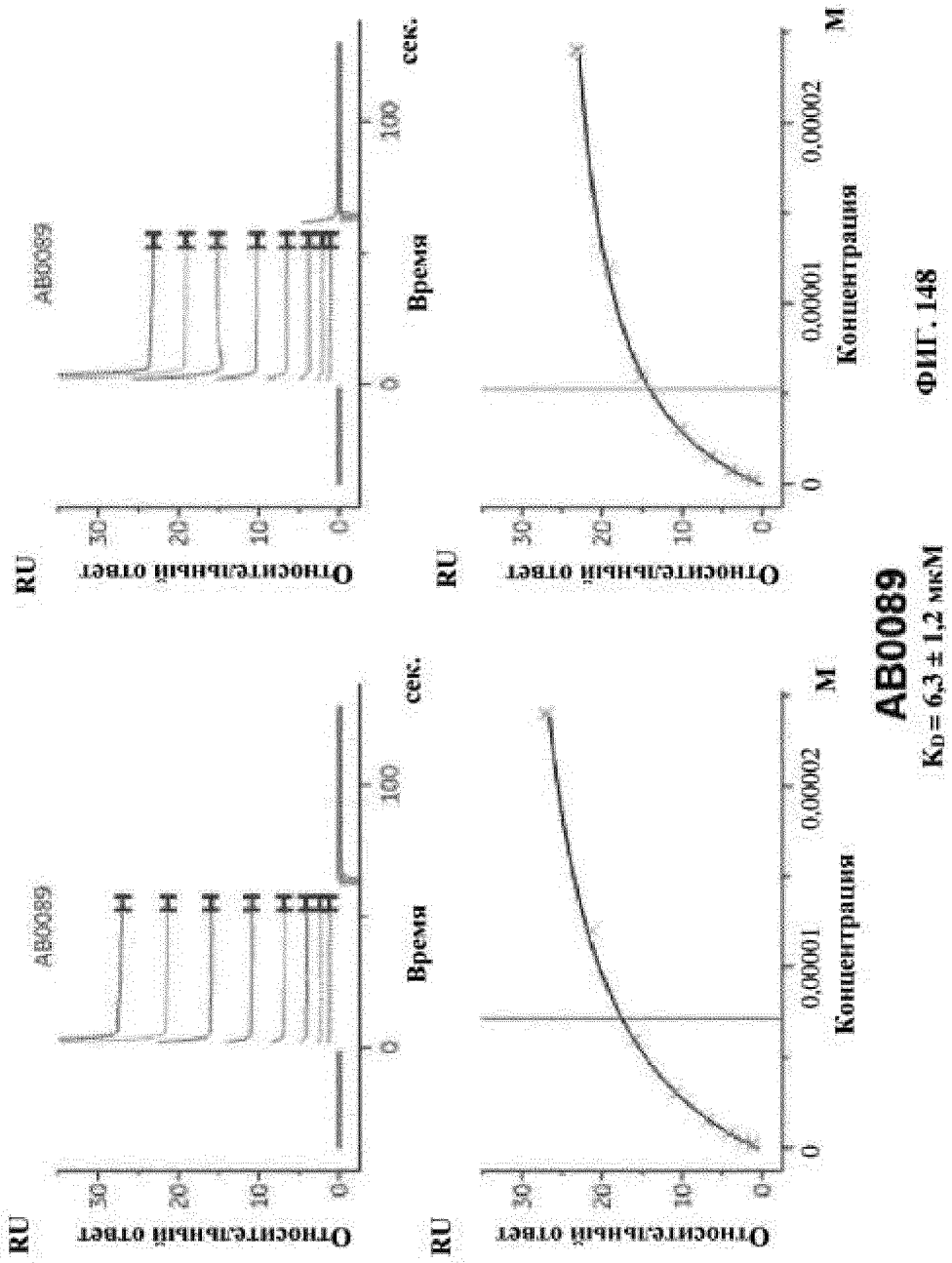

ФИГ. 147 продолжение



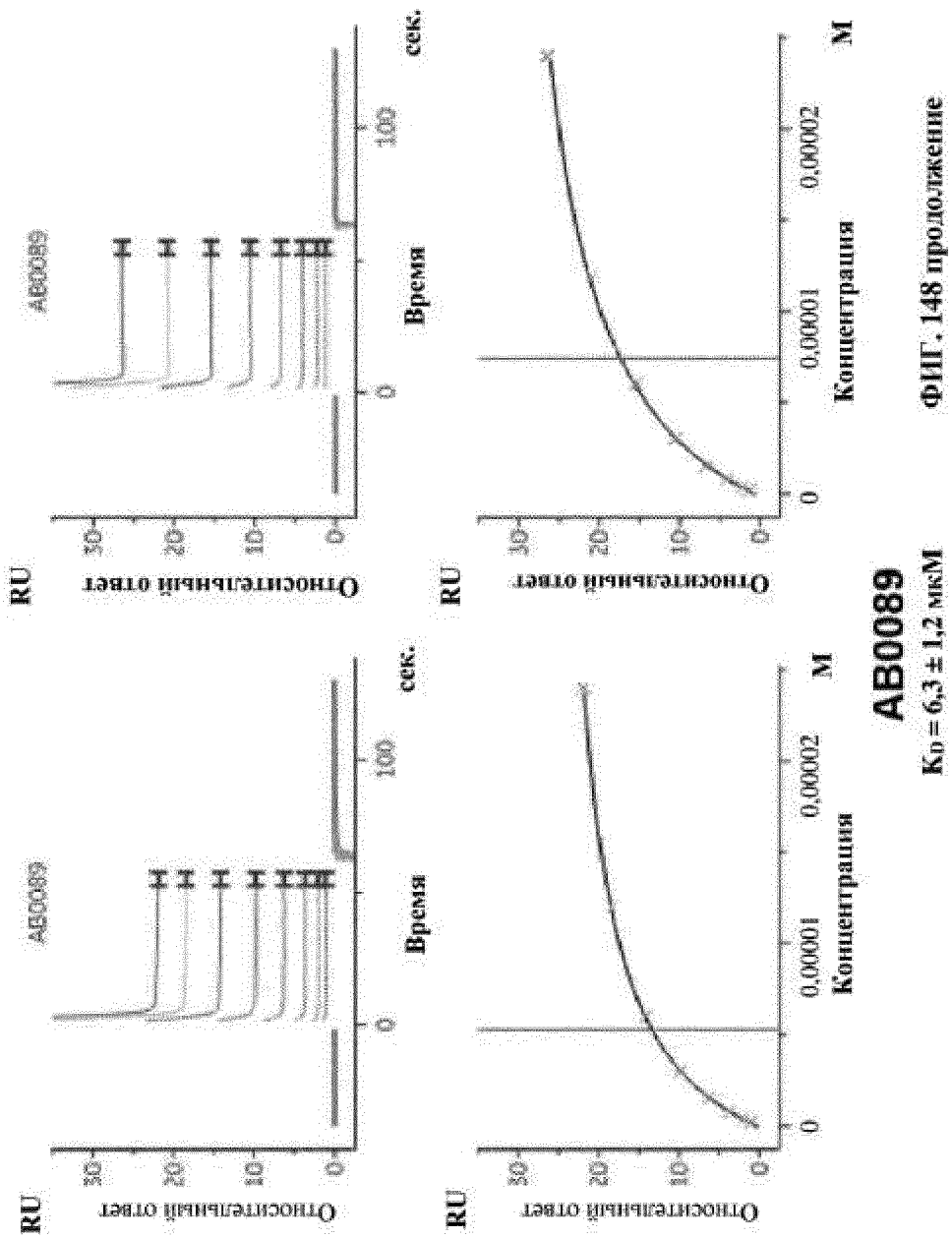

ФИГ. 147 продолжение



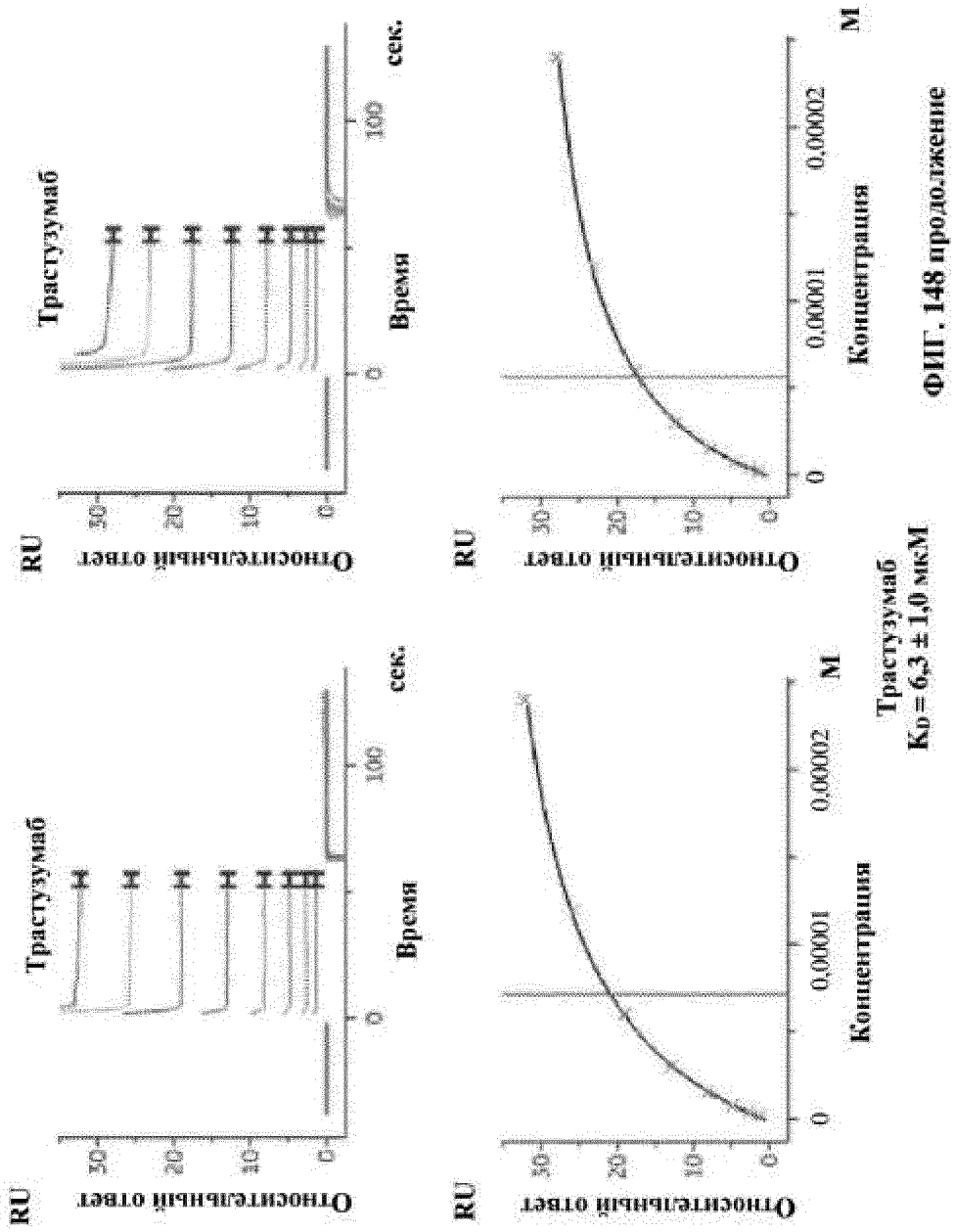

ФИГ. 147 продолжение


AB0089
RU
Относительный ответ
Время
сек.
Концентрация
M
$K_D$ = 6,3 ± 1,2 мкМ

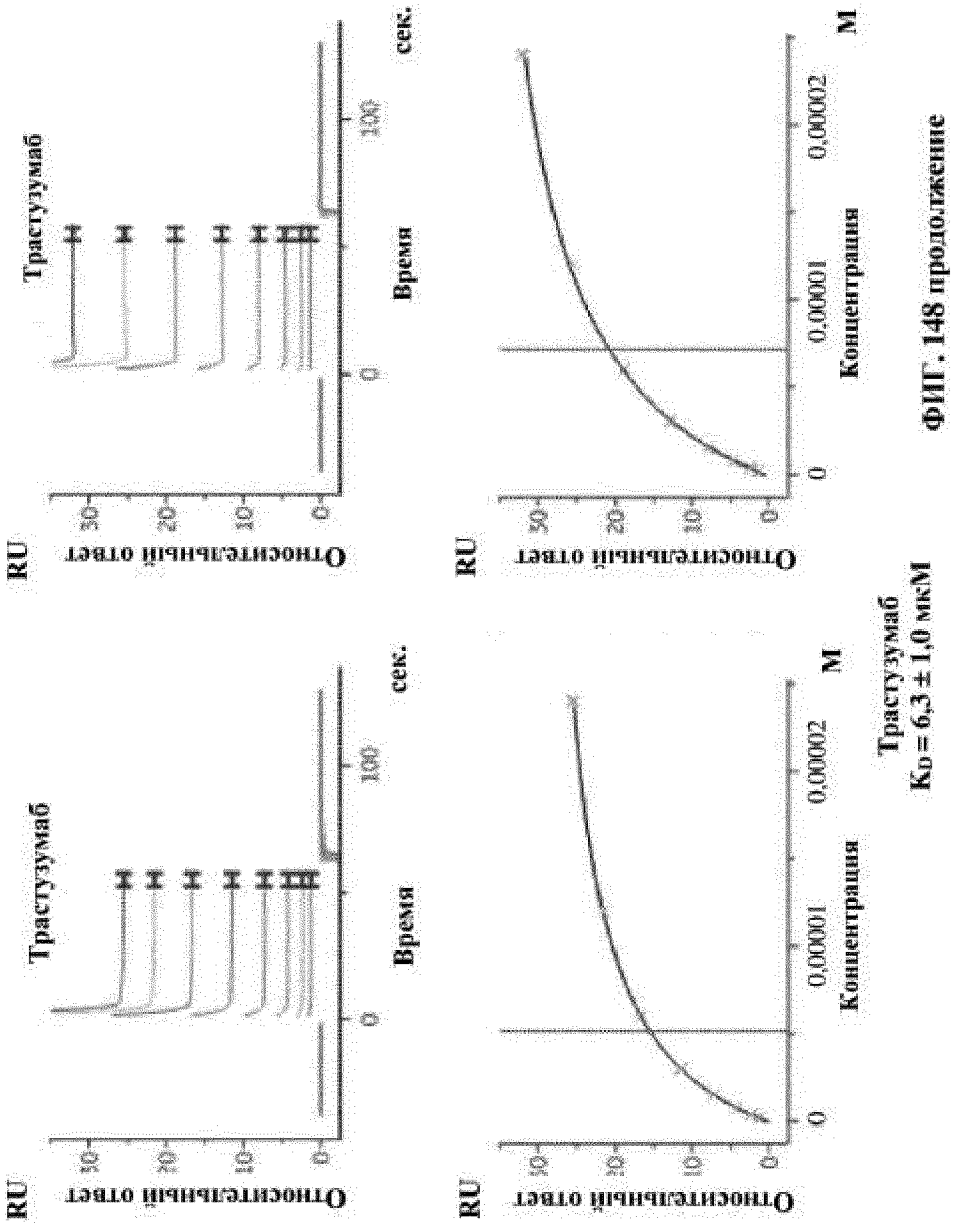
ФИГ. 148



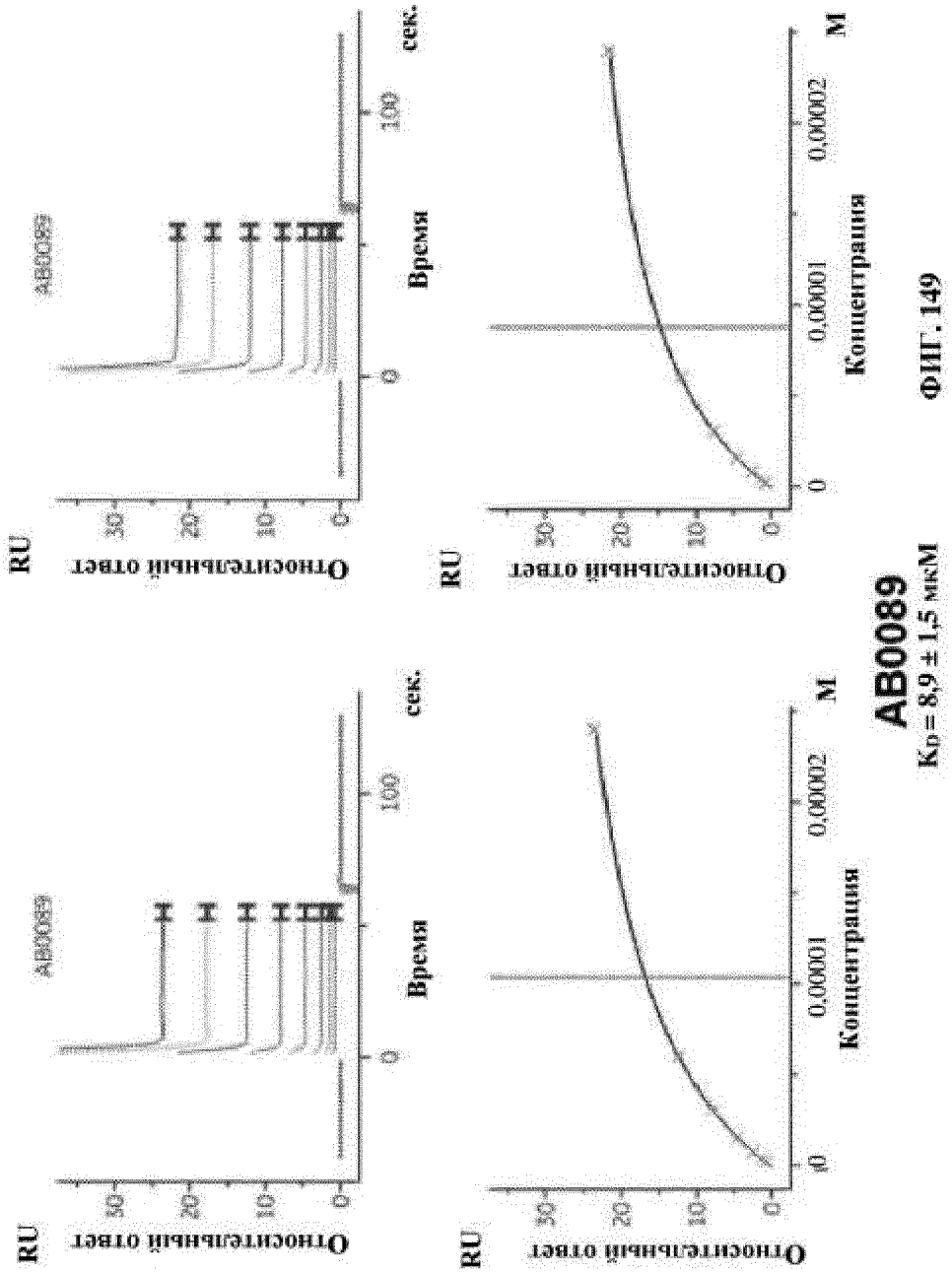

ФИГ. 148 продолжение



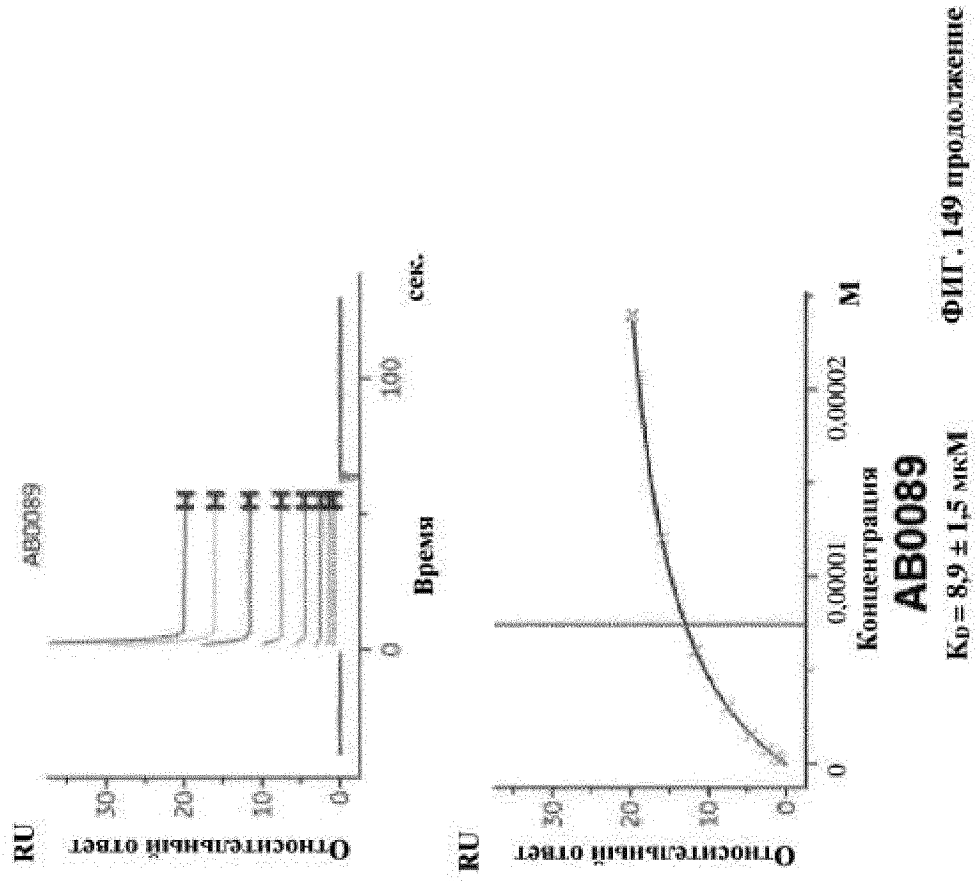

ФИГ. 148 продолжение



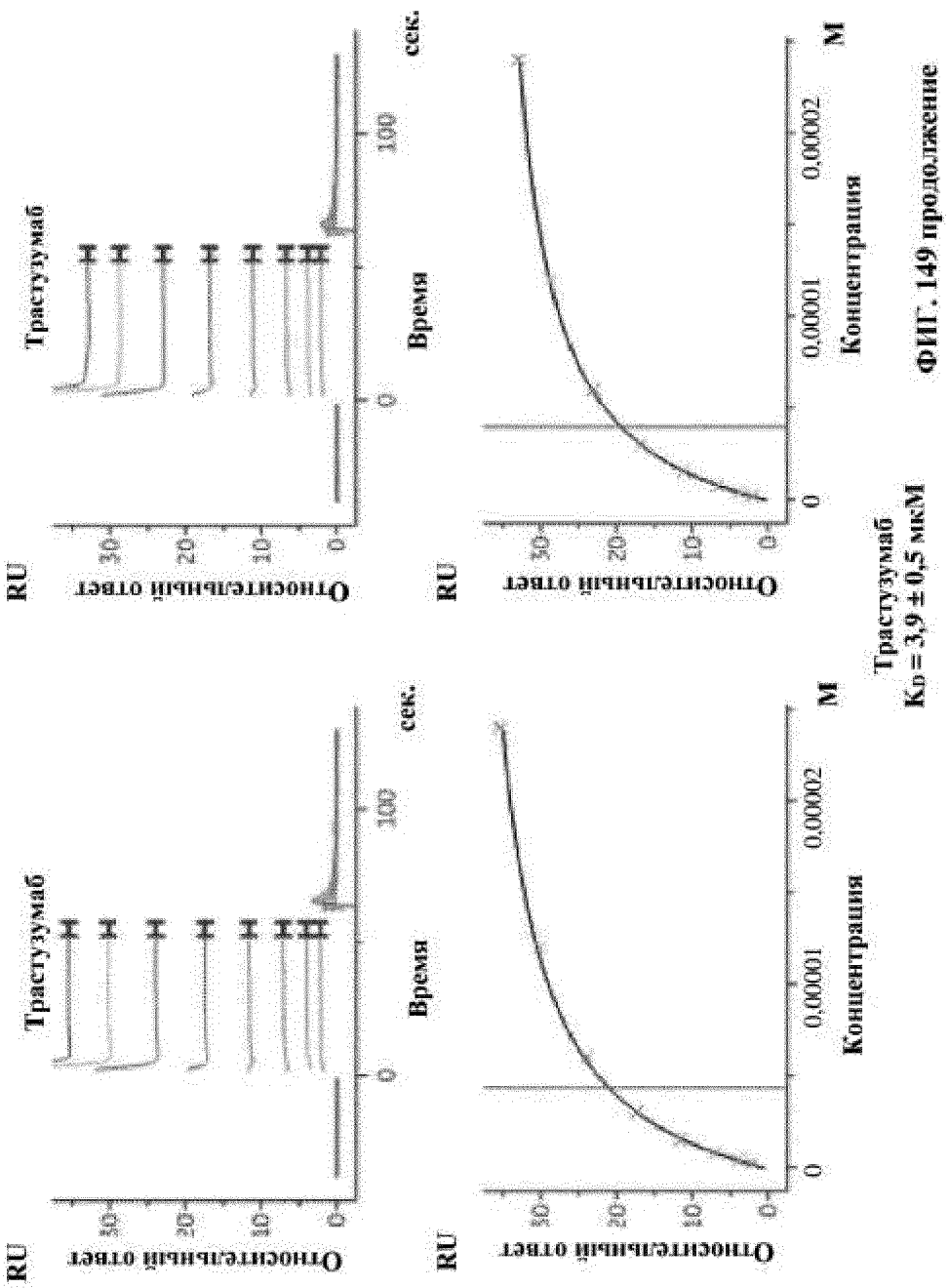

ФИГ. 148 продолжение


AB0089
Относительный ответ
RU
Время
сек.
Концентрация
M
$K_D$ = 8,9 ± 1,5 мкМ

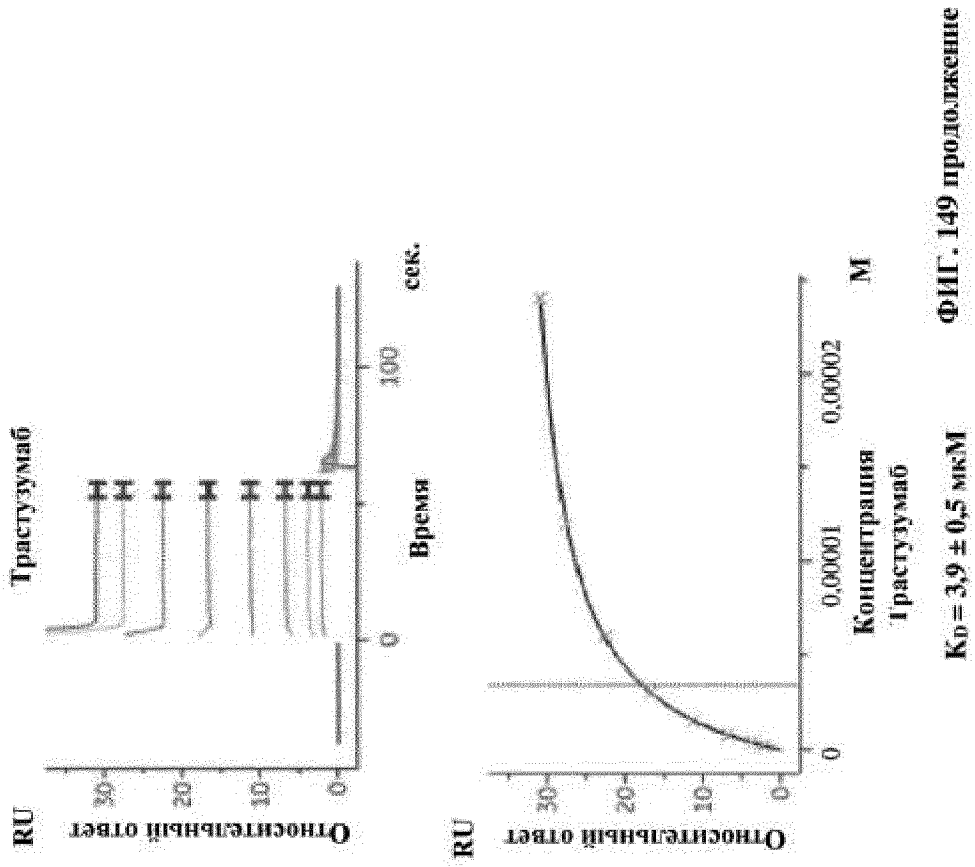
ФИГ. 149



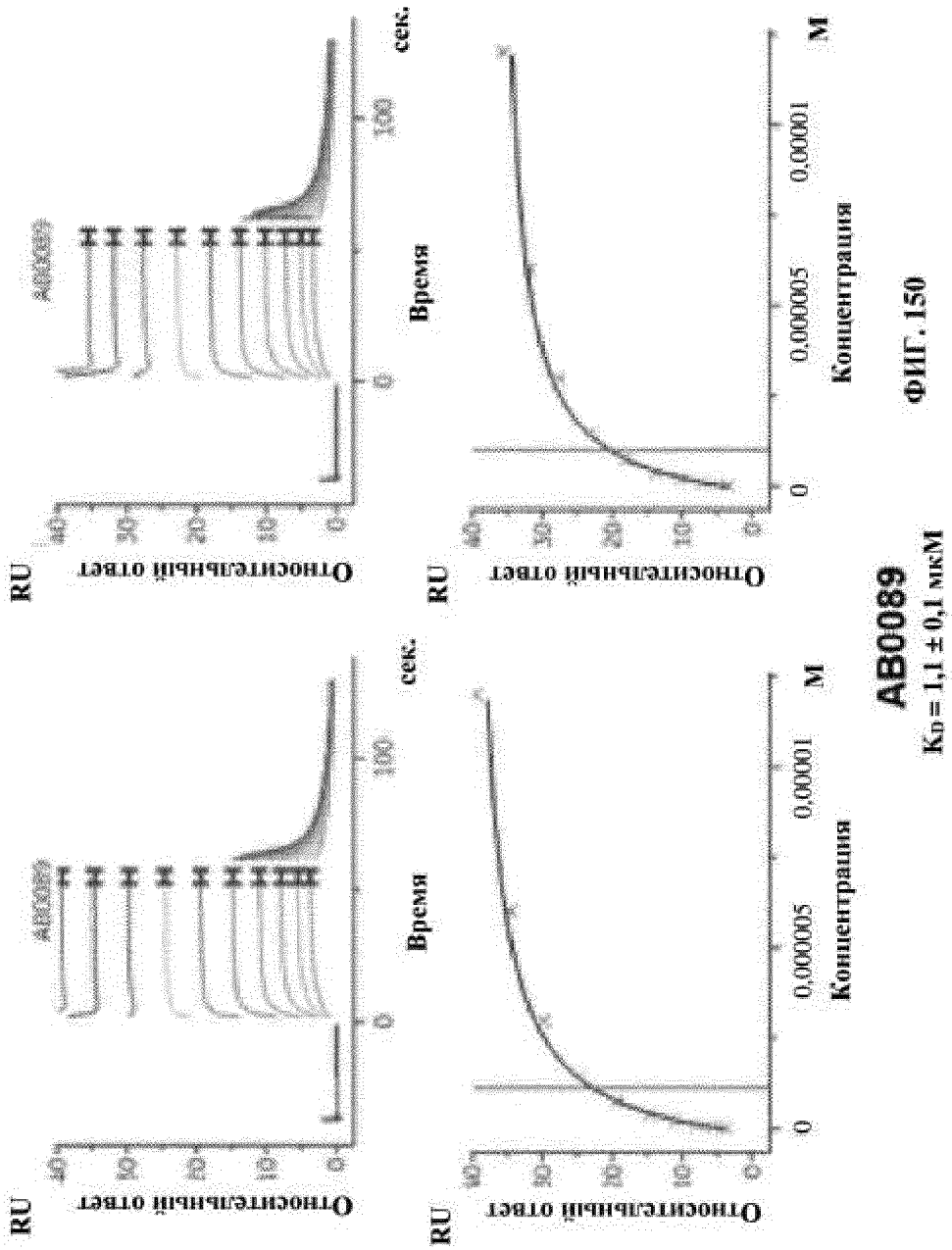

ФИГ. 149 продолжение



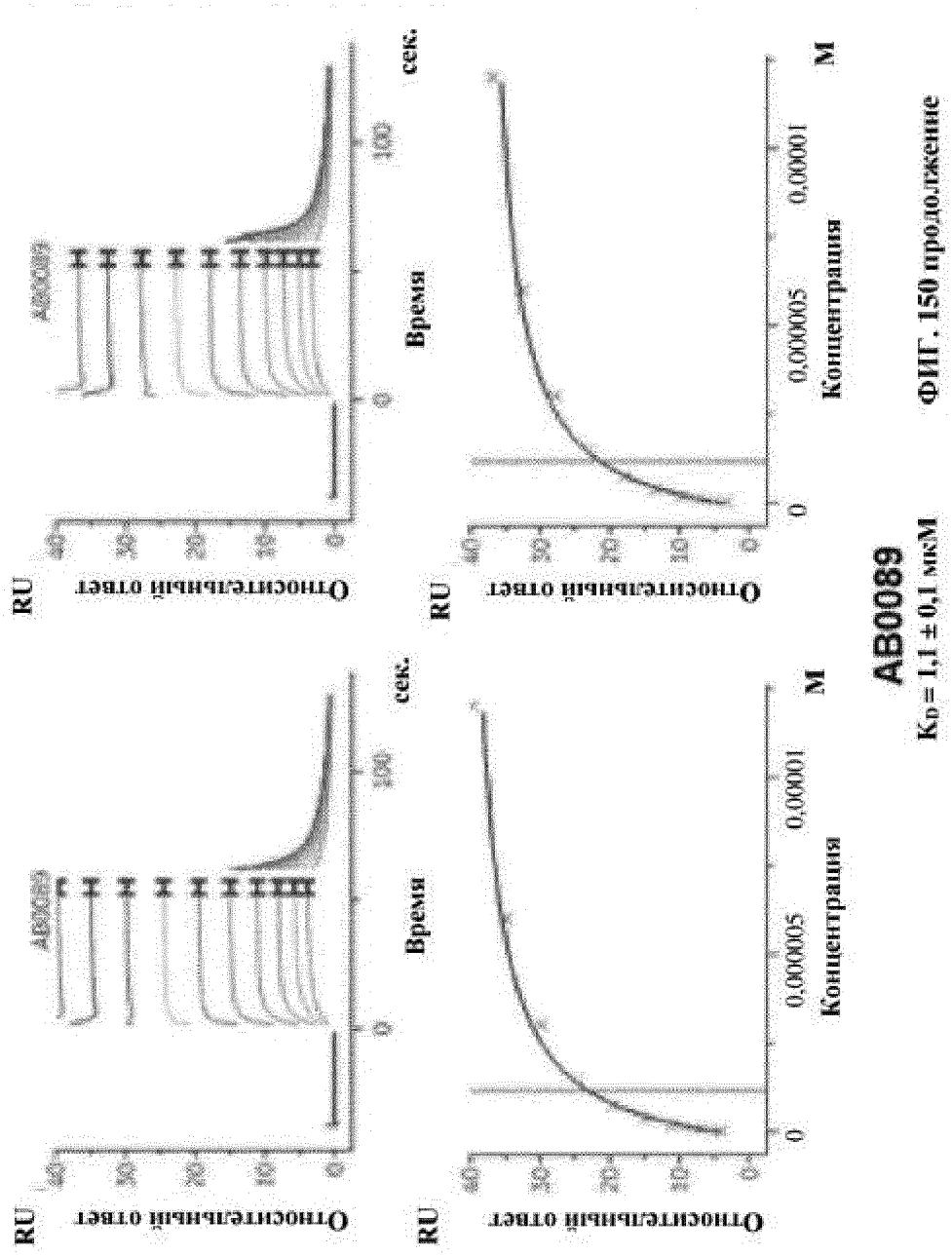

ФИГ. 149 продолжение



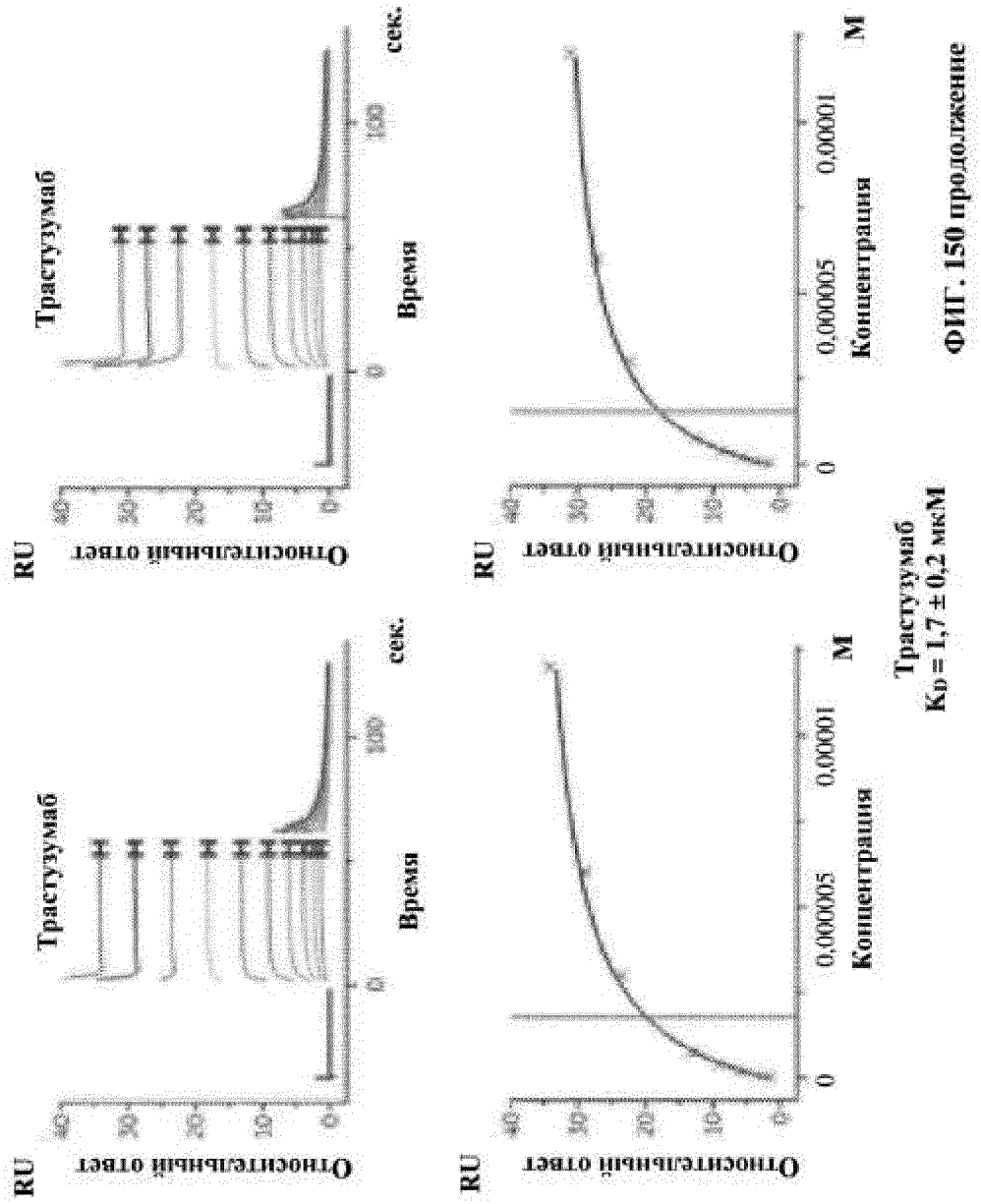

ФИГ. 149 продолжение


AB0089
Относительный ответ
RU
Время
сек.
Концентрация
M
AB0089
$K_D$ = 1,1 ± 0,1 мкМ

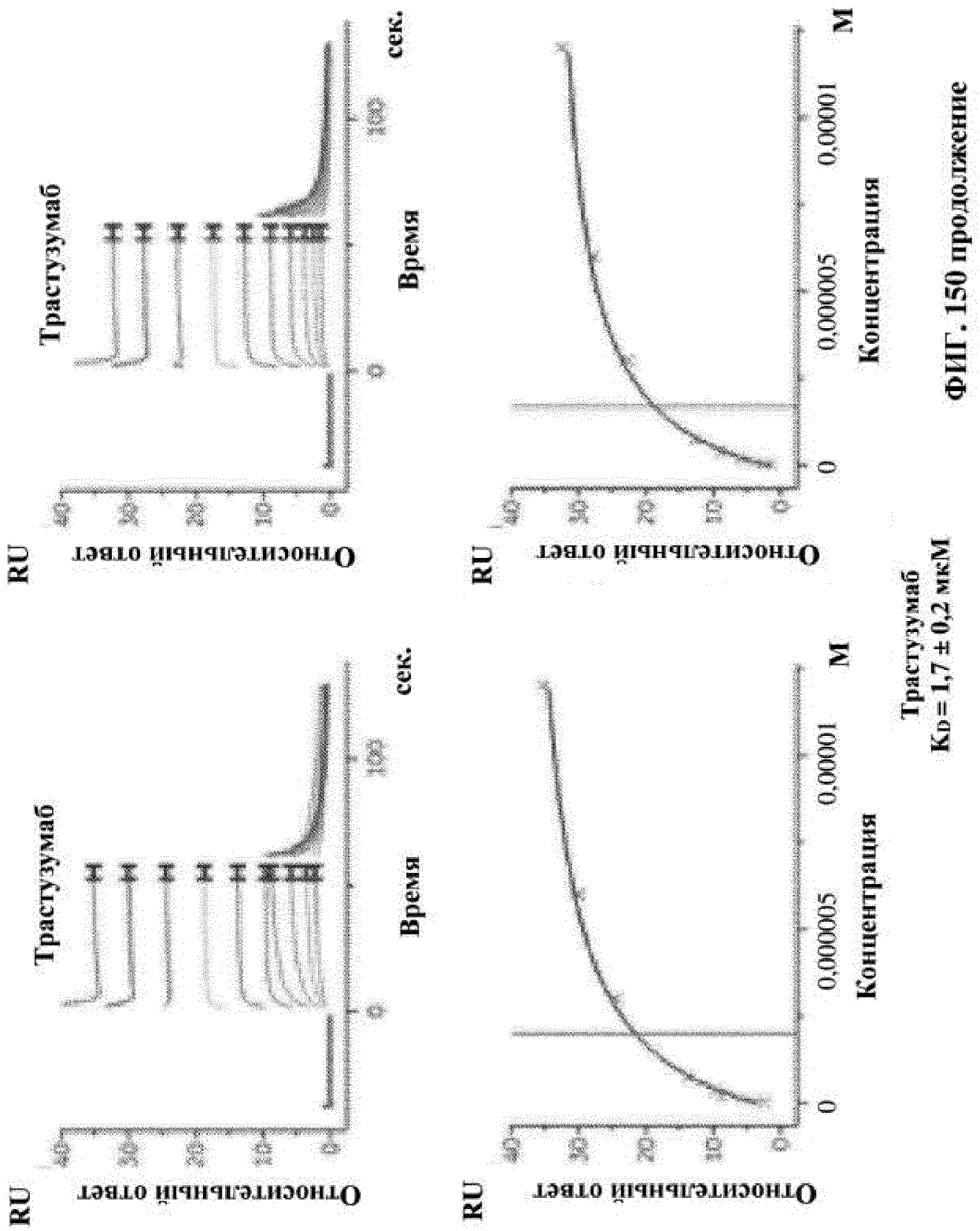
ФИГ. 150



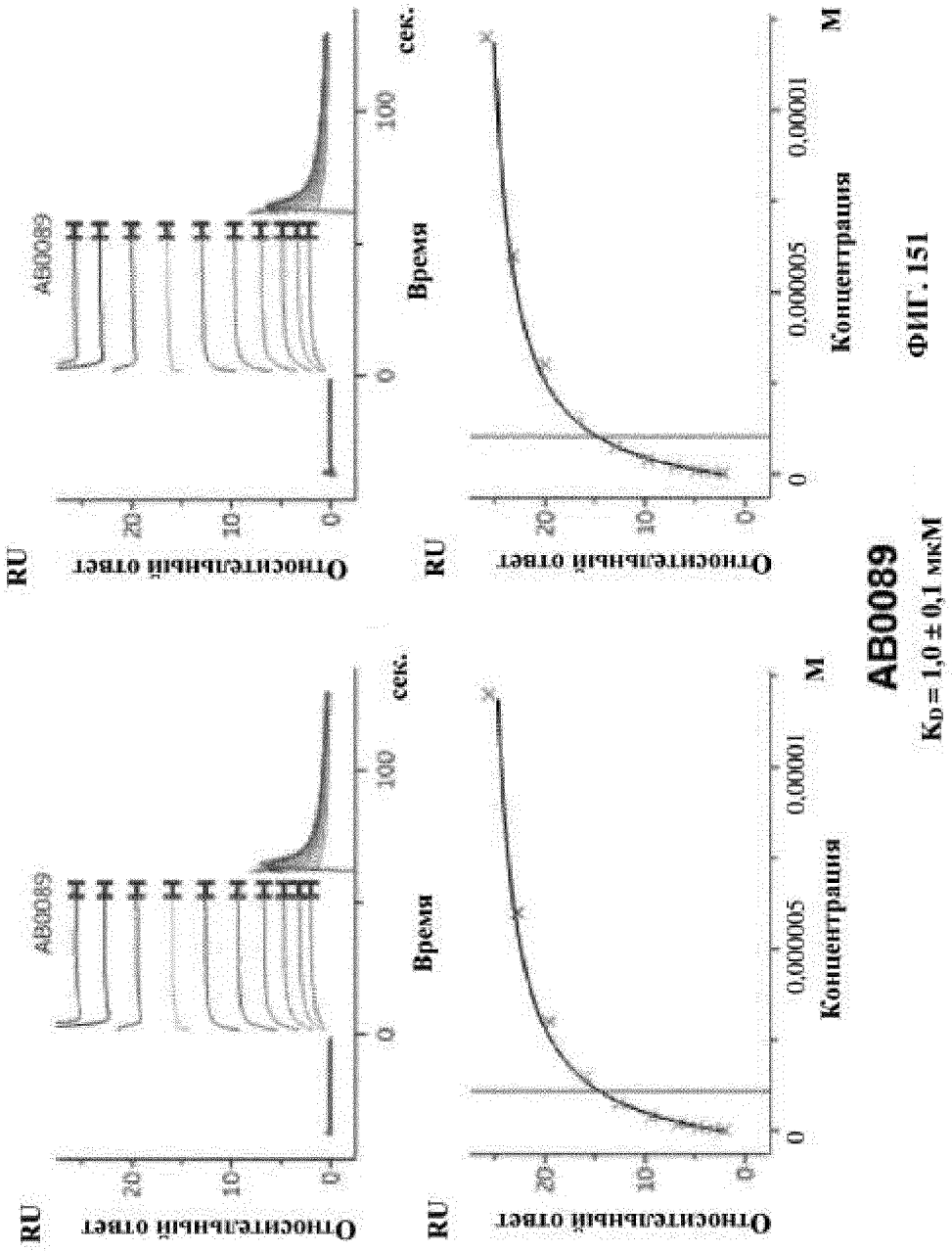

ФИГ. 150 продолжение



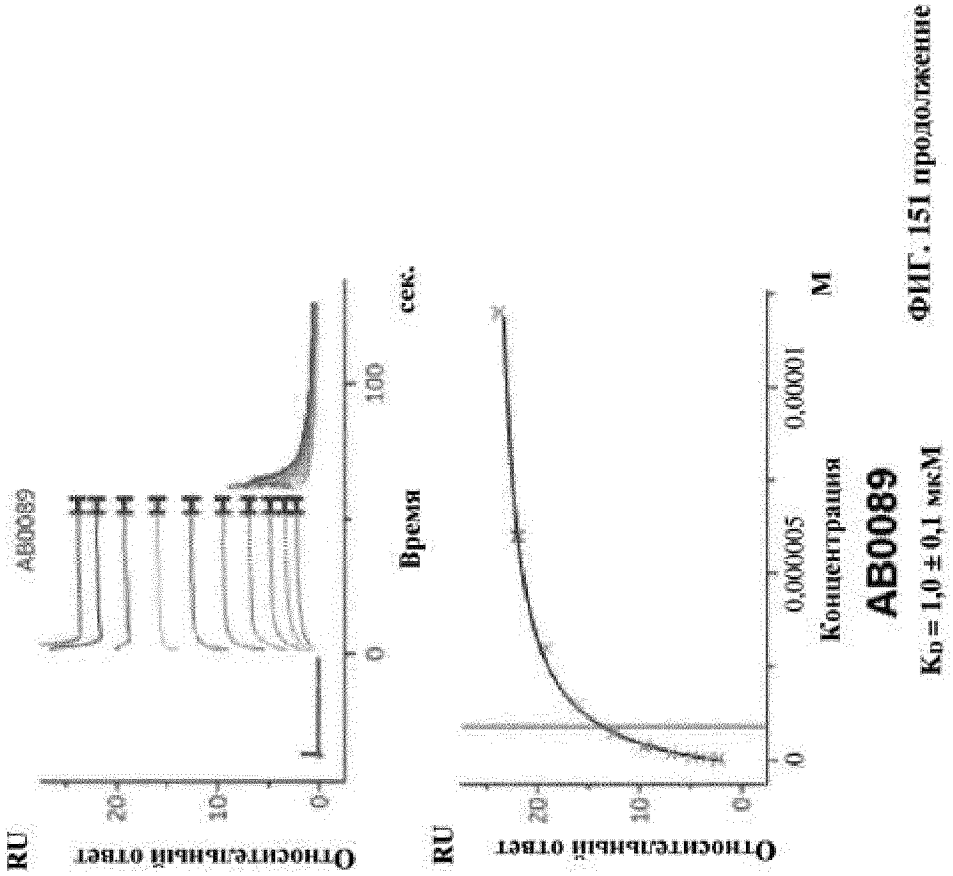

ФИГ. 150 продолжение



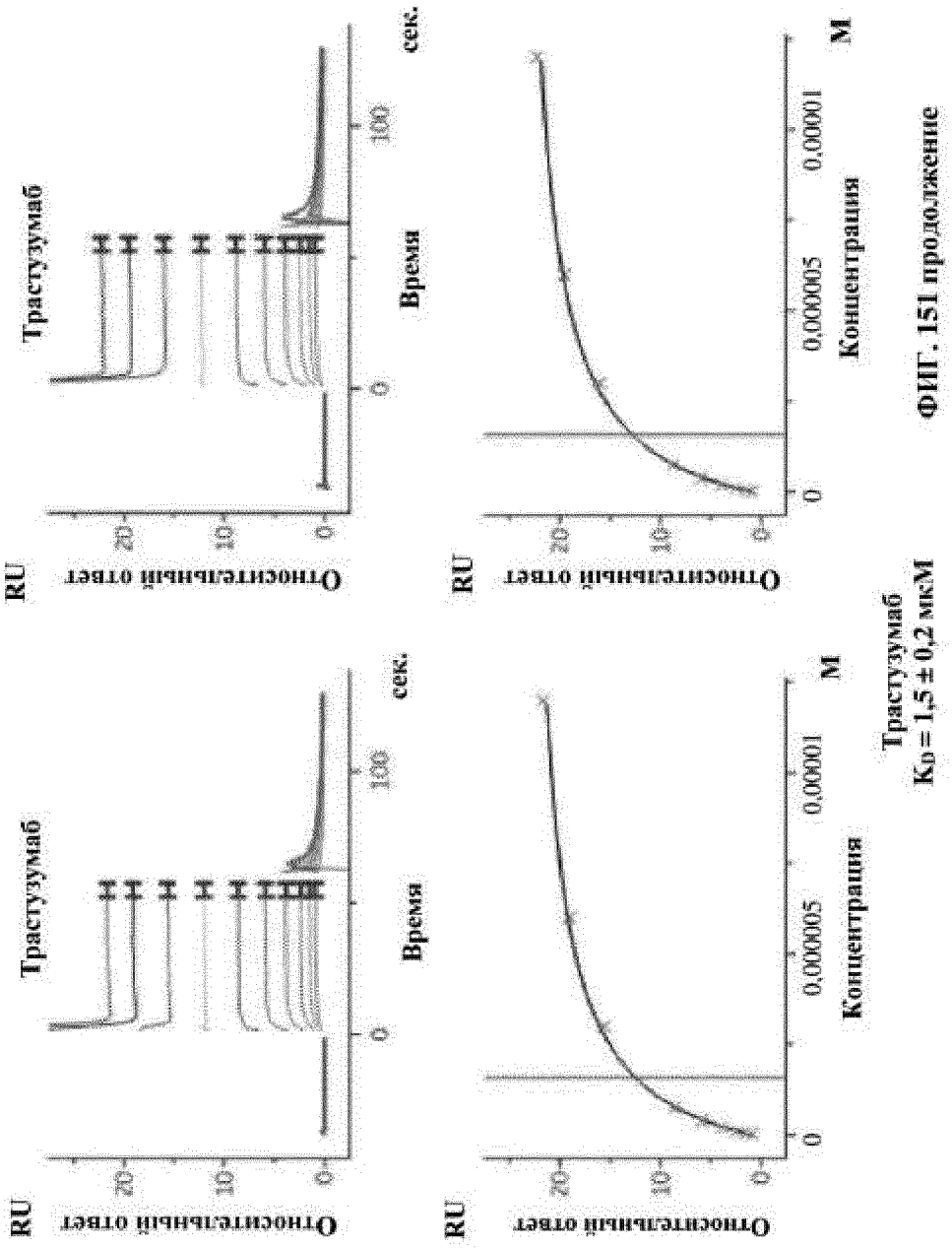

ФИГ. 150 продолжение


AB0089
RU
Относительный ответ
Время
сек.
Концентрация
M
AB0089
$K_D$ = 1,0 ± 0,1 мкМ

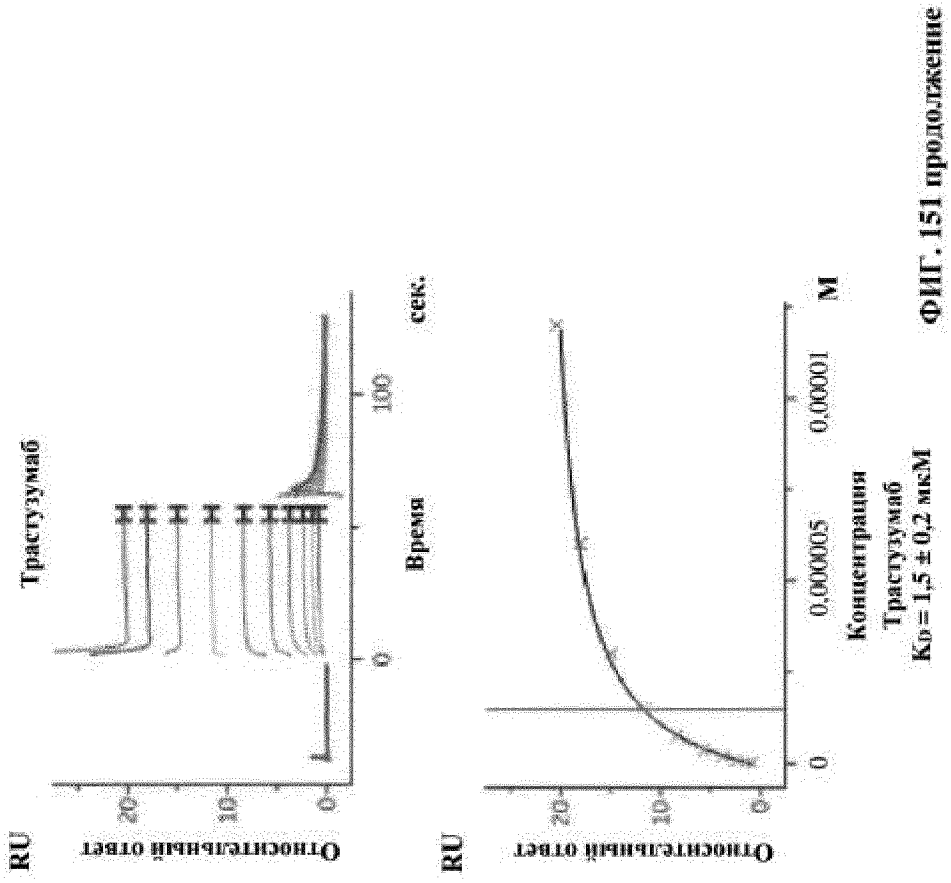
ФИГ. 151



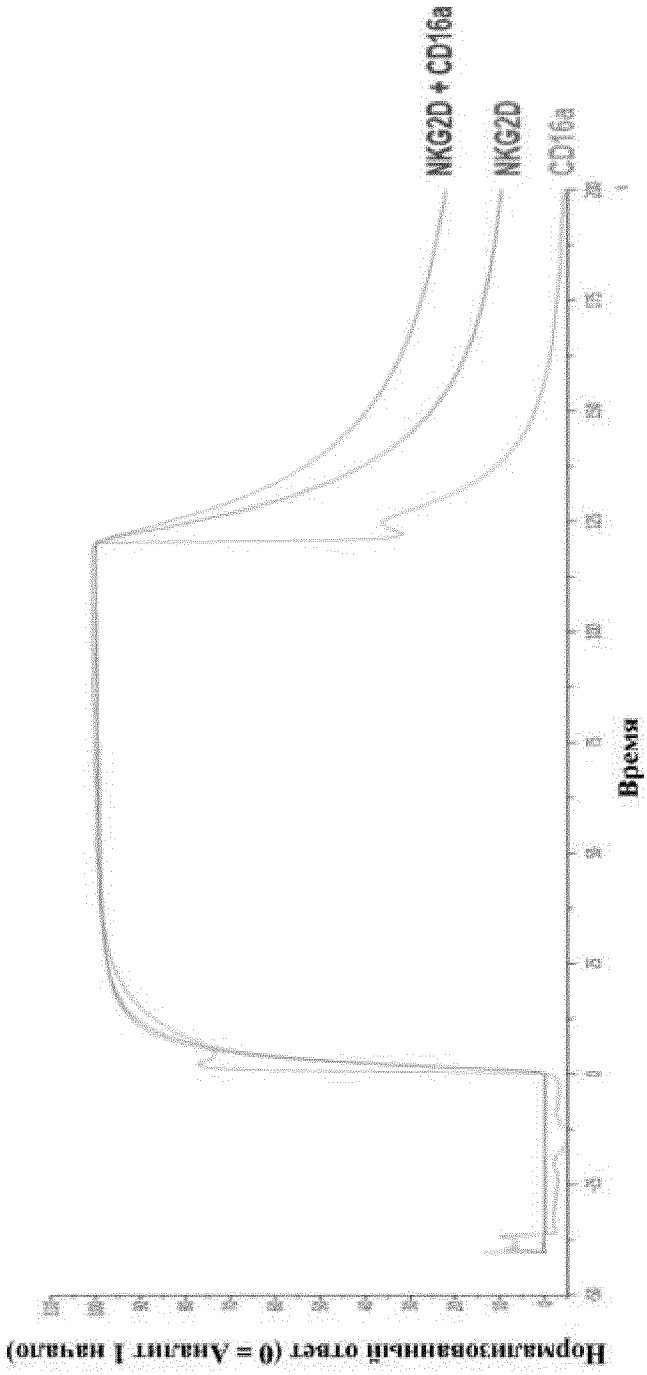

ФИГ. 151 продолжение



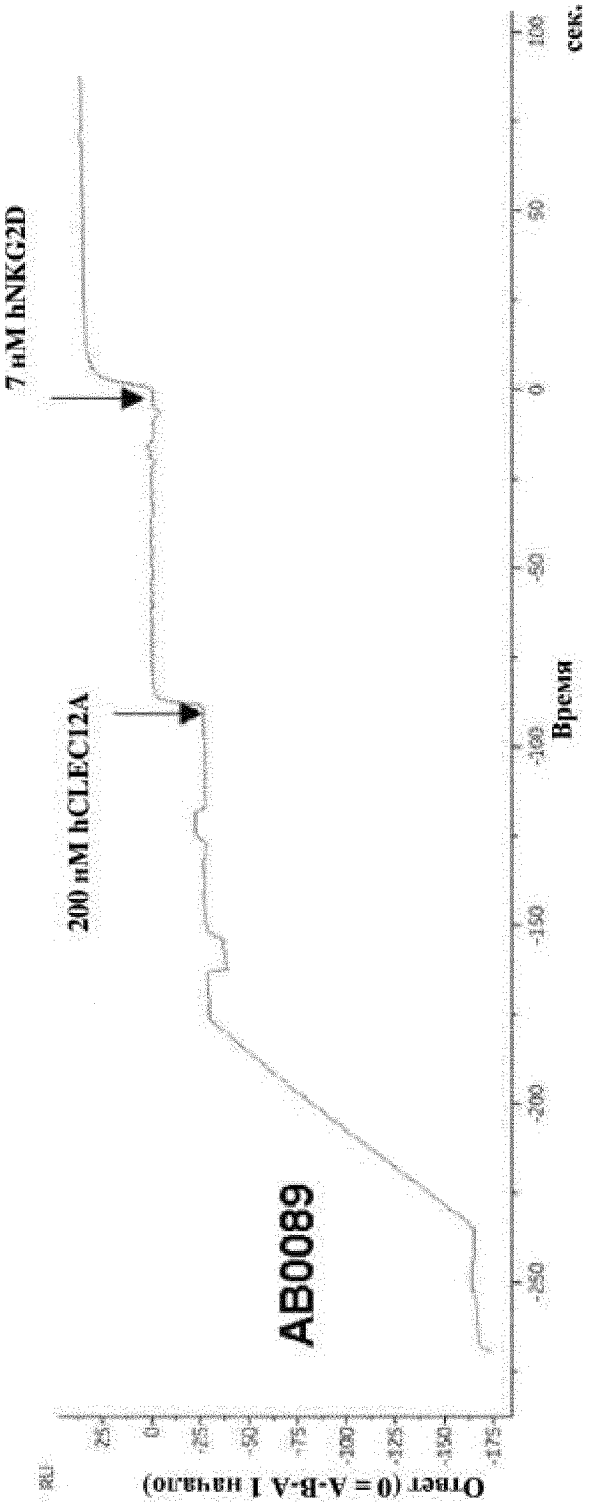

ФИГ. 151 продолжение



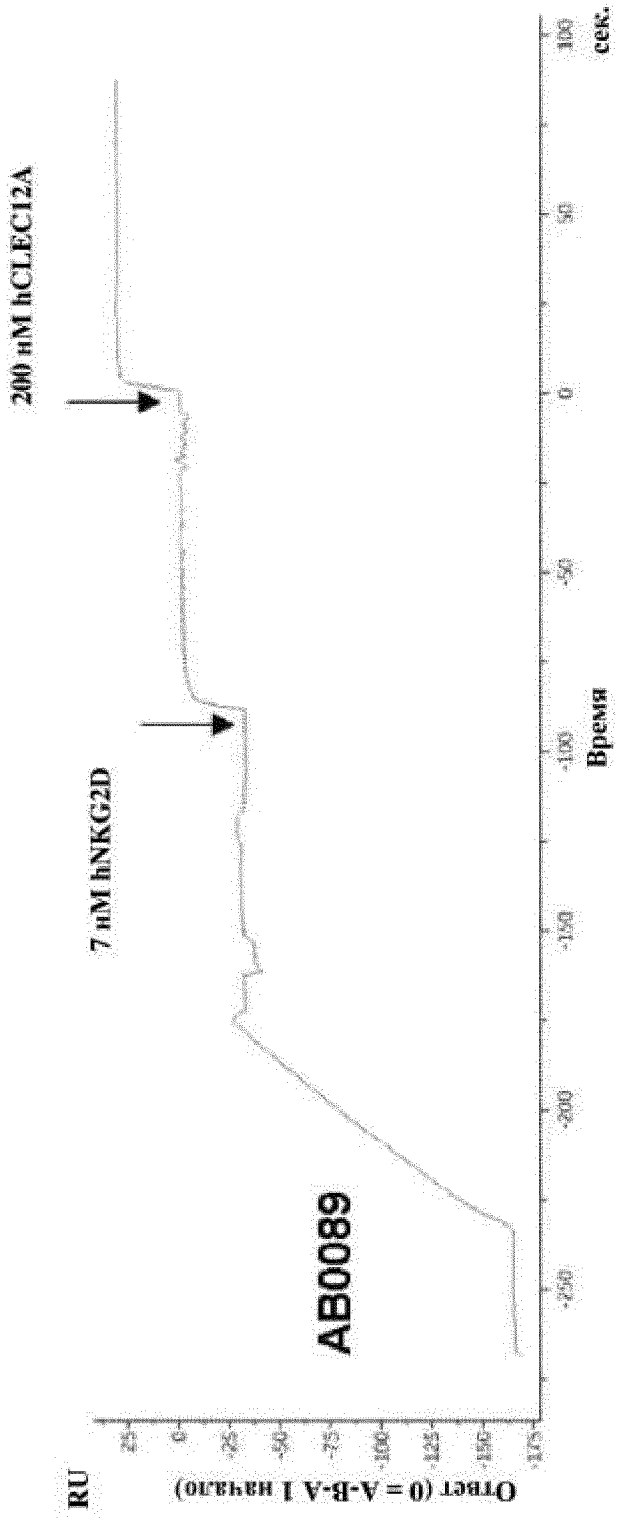

ФИГ. 151 продолжение


NKG2D + CD16a
NKG2D
CD16a
Время
Нормализованный ответ (0 = Анализ 1 начало)

ФИГ. 152

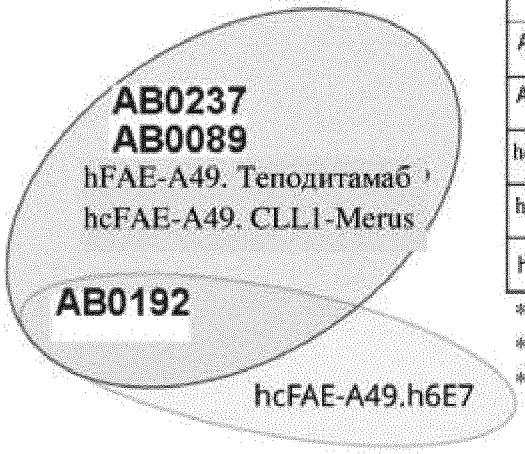

7 нМ hNKG2D
200 нМ hCLEC12A
AB0089
Ответ (0 = А-Б-А 1 начало)
Время
сек.

ФИГ. 153




ФИГ. 153 продолжение

**ФИГ. 154**

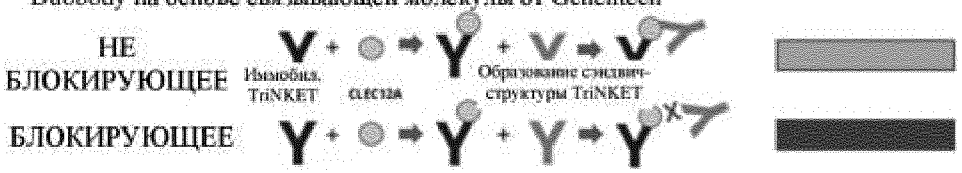


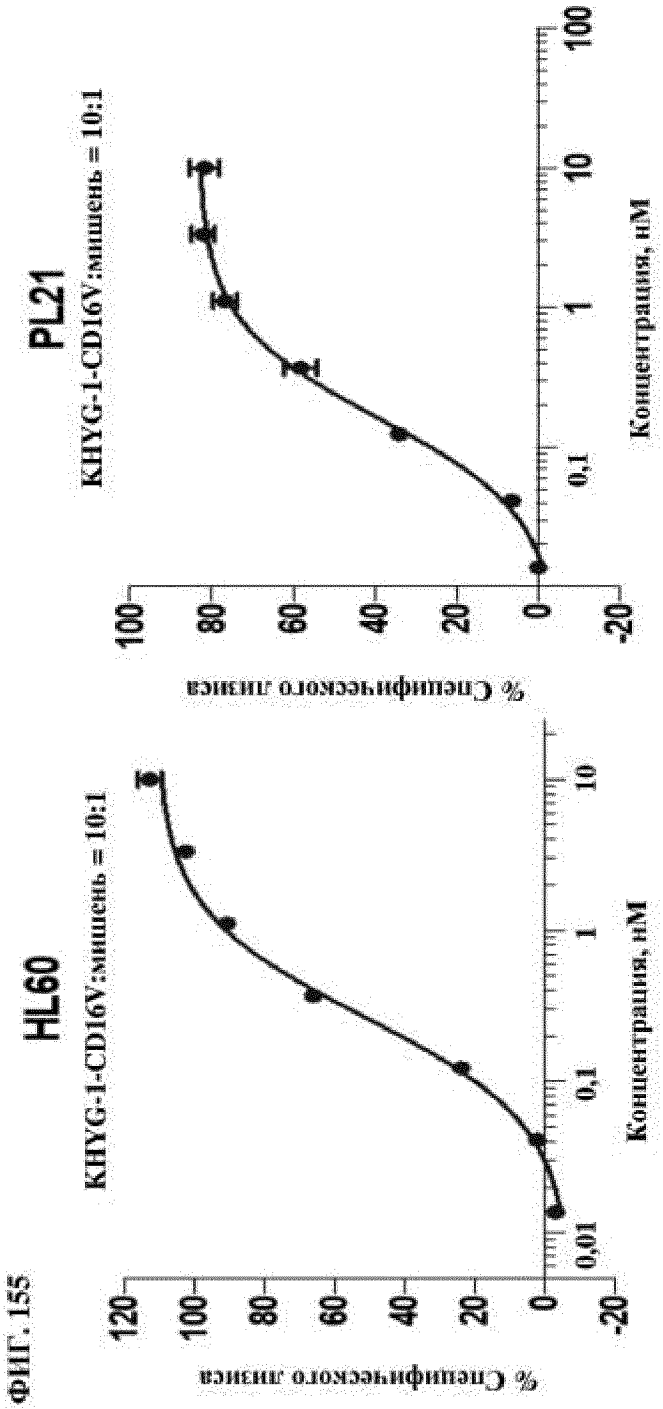

| | AB0237 | AB0192 | AB0089 | hcFAE-A49. Теподитамаб* | hcFAE-A49. CLL1-Merus** | hcFAE-A49.h6E7*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB0237 | | | | | | |
| AB0192 | | | | | | |
| AB0089 | | | | | | |
| hcFAE-A49.Теподитамаб | Недостаточное количество связанной мишени из-за высокой начальной скорости диссоциации иммобилизованного mAb | | | | | |
| hcFAE-A49.CLL1-Merus | | | | | | |
| hcFAE-A49.h6E7 | | | | | | |

* Duobody на основе CLEC12A-связывающего плеча из теподитамаба (Merus)

** Duobody на основе CLEC12A-связывающего плеча из mAb CLL1-Merus

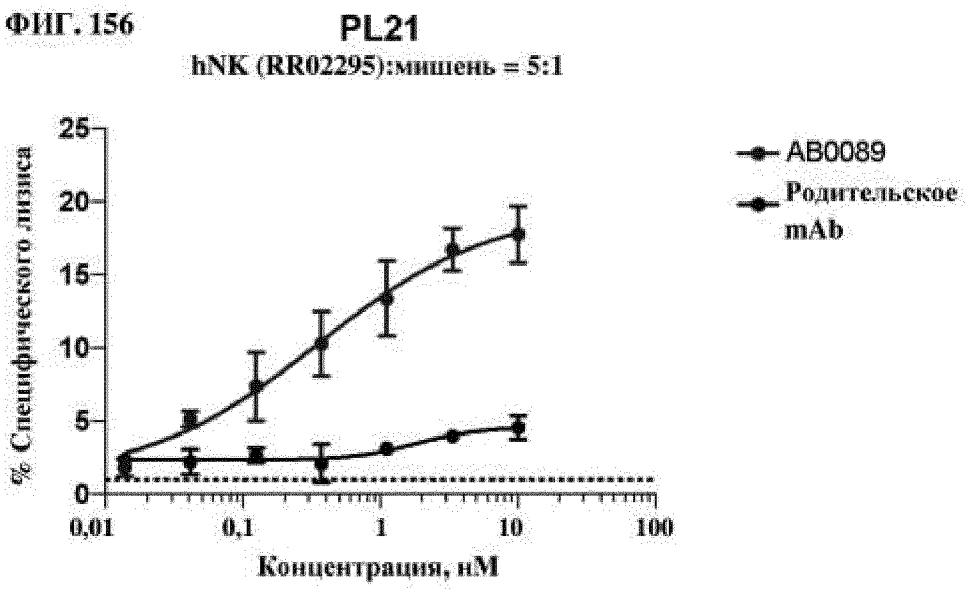
*** Duobody на основе связывающей молекулы от Genentech



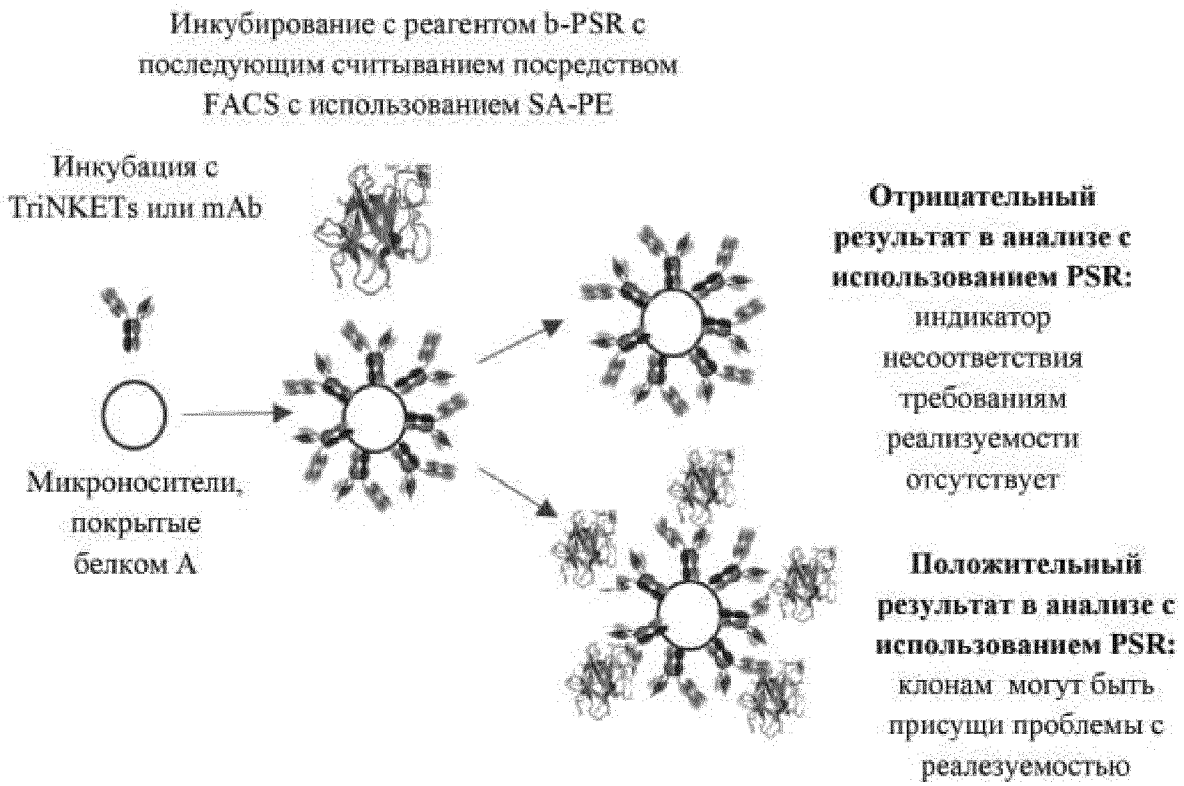

PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
Концентрация, нМ
HL60
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
Концентрация, нМ

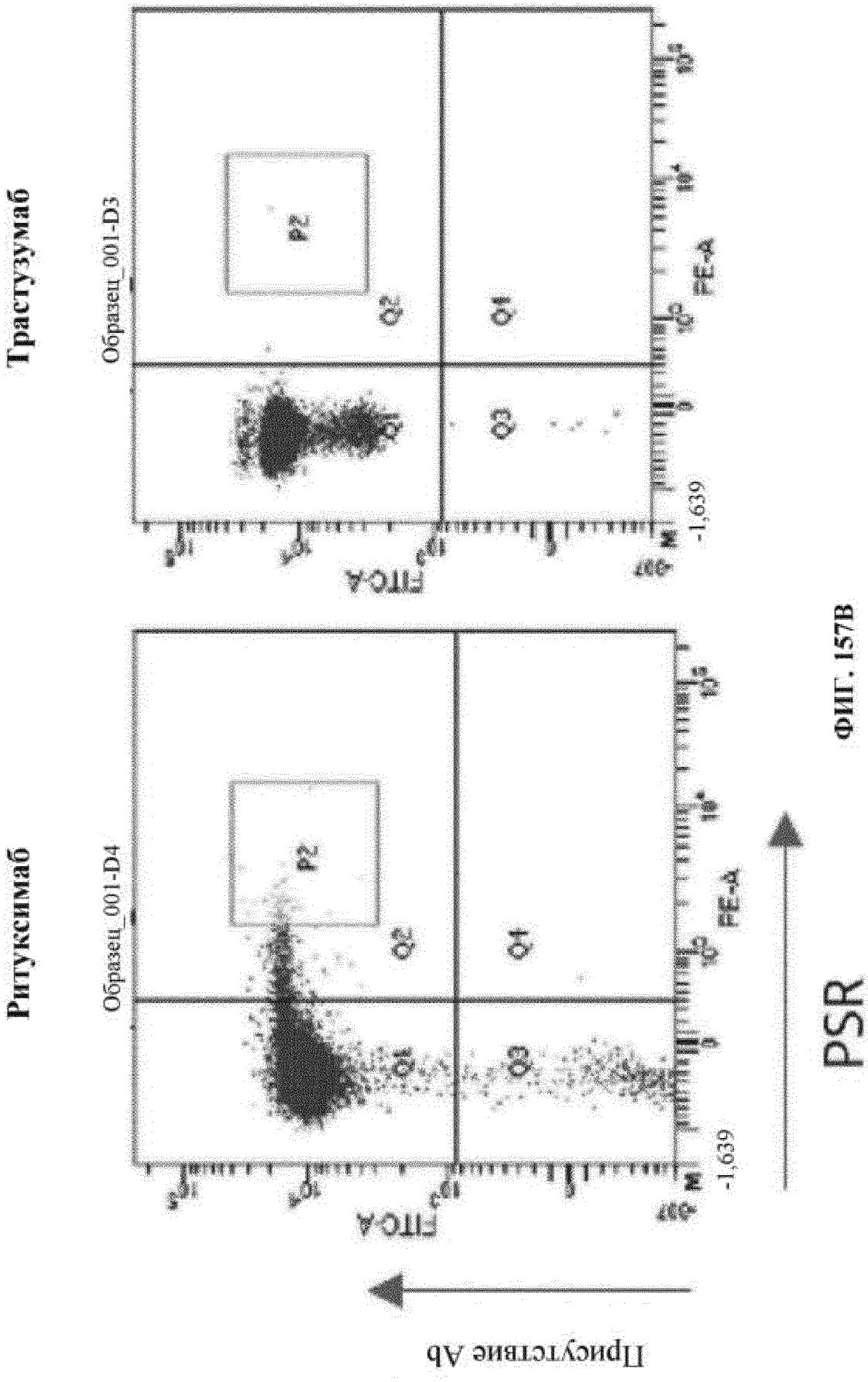
ФИГ. 155

ФИГ. 156

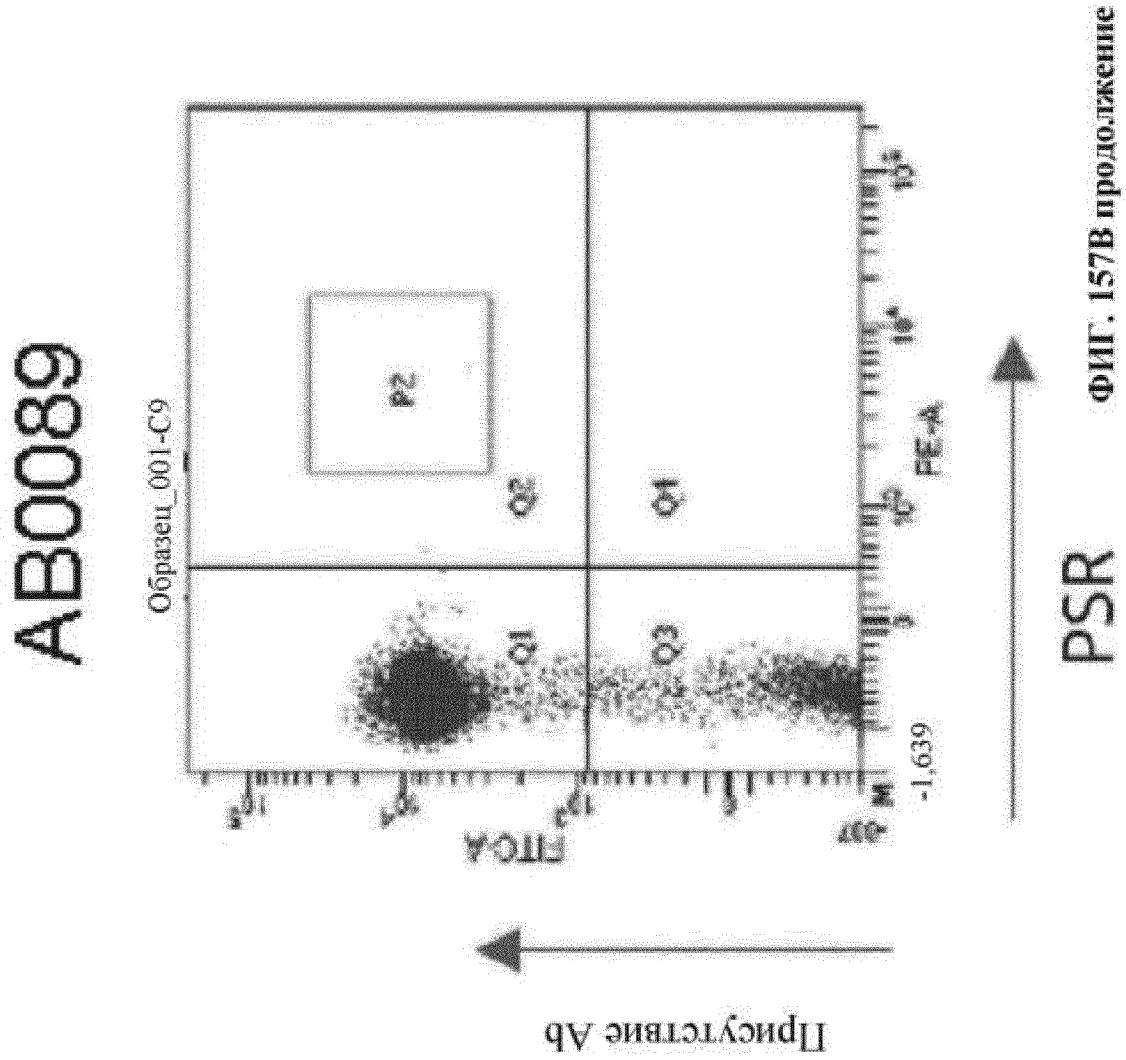

PL21
hNK (RR02295):мишень = 5:1
% Специфического лизиса
25
20
15
10
5
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0089
Родительское mAb

**ФИГ. 157А**


Инкубирование с реагентом b-PSR с последующим считыванием посредством FACS с использованием SA-PE
Инкубация с TriNKETs или mAb
Микроносители, покрытые белком А
**Отрицательный результат в анализе с использованием PSR:** индикатор несоответствия требованиям реализуемости отсутствует
**Положительный результат в анализе с использованием PSR:** клонам могут быть присущи проблемы с реализуемостью

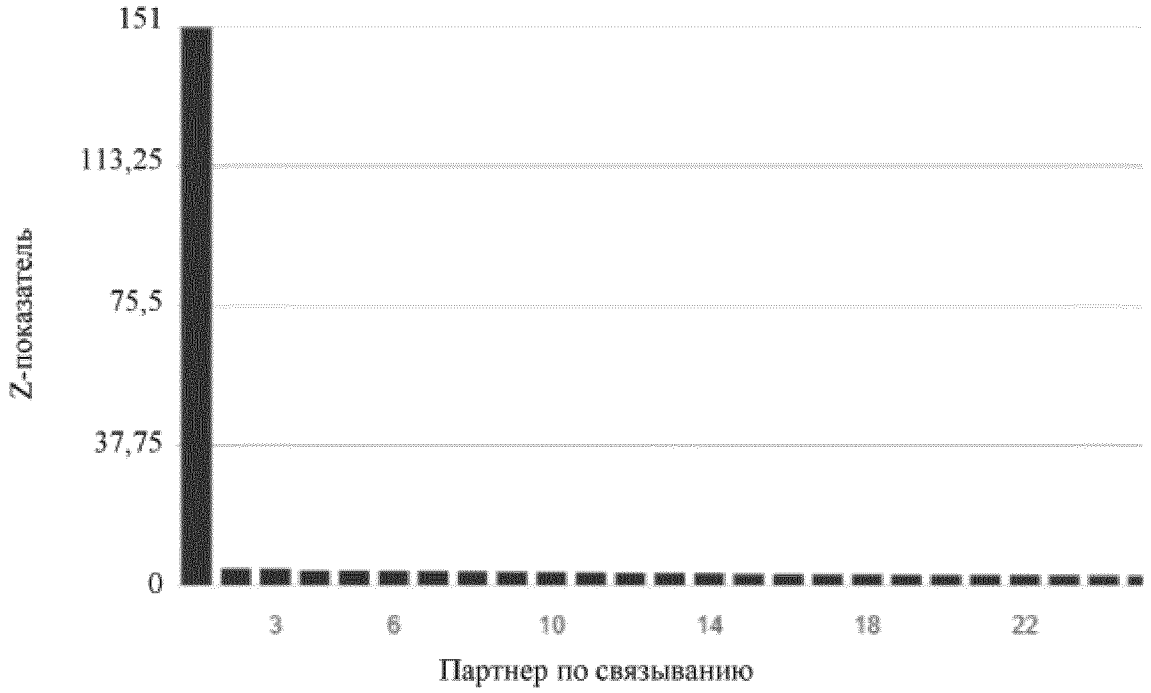

Трастузумаб
Образец_001-D3
P2
Q2
Q1
Q4
Q3
FITC-A
PE-A
-1,639
Ритуксимаб
Образец_001-D4
P2
Q2
Q1
Q4
Q3
FITC-A
PE-A
-1,639
Присутствие Ab
PSR

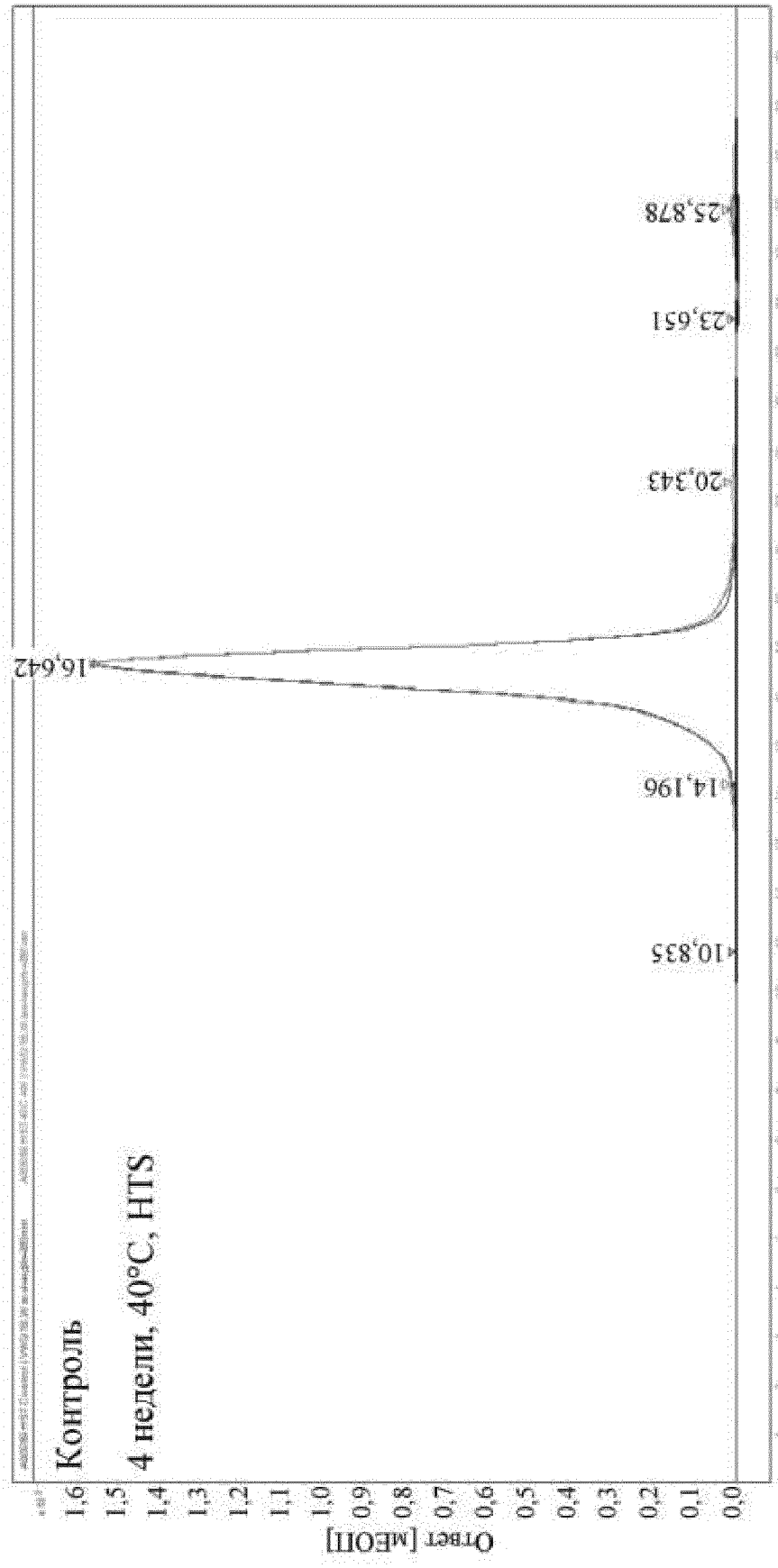
ФИГ. 157B



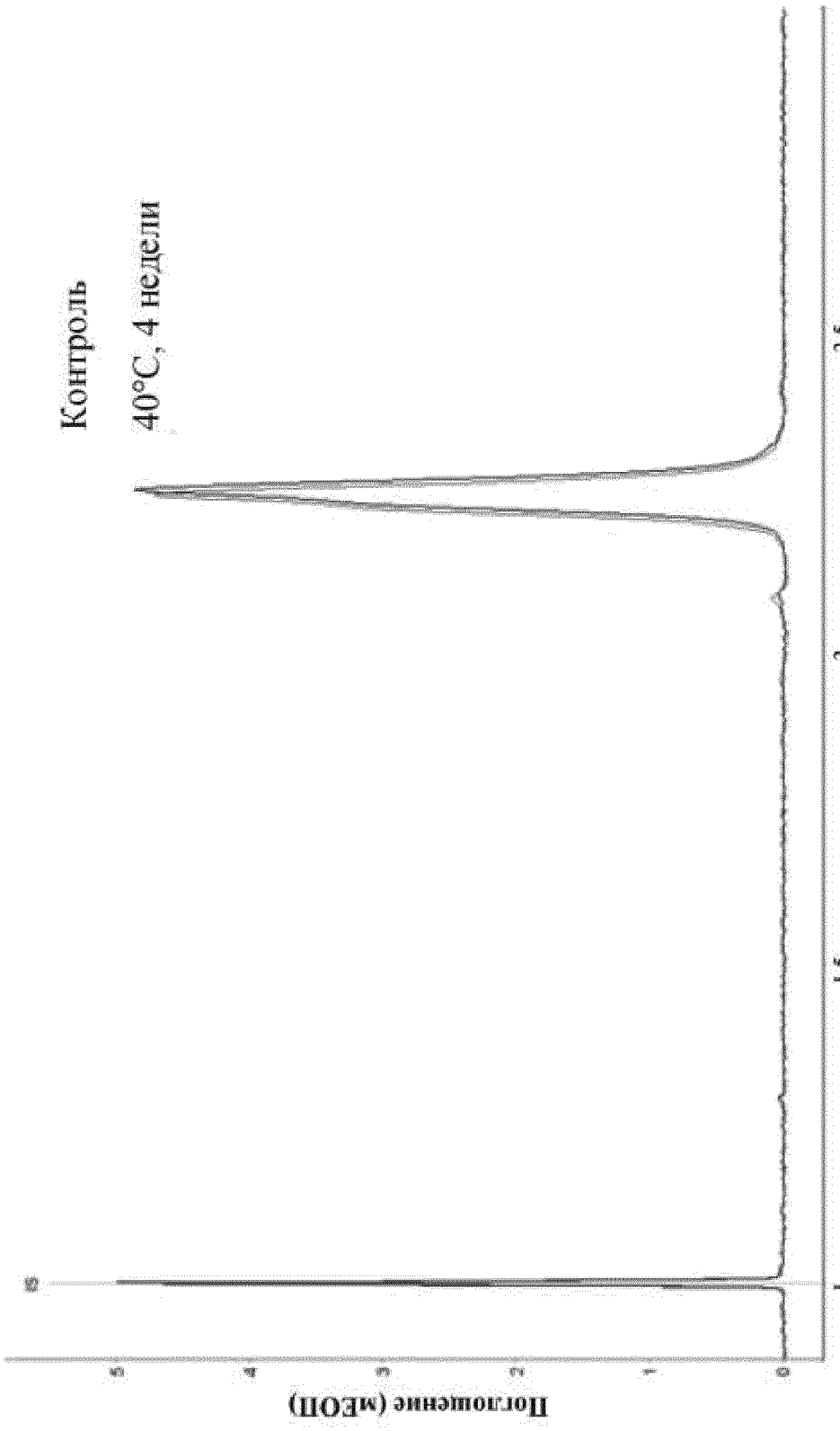

ФИГ. 157В продолжение

**ФИГ. 158**

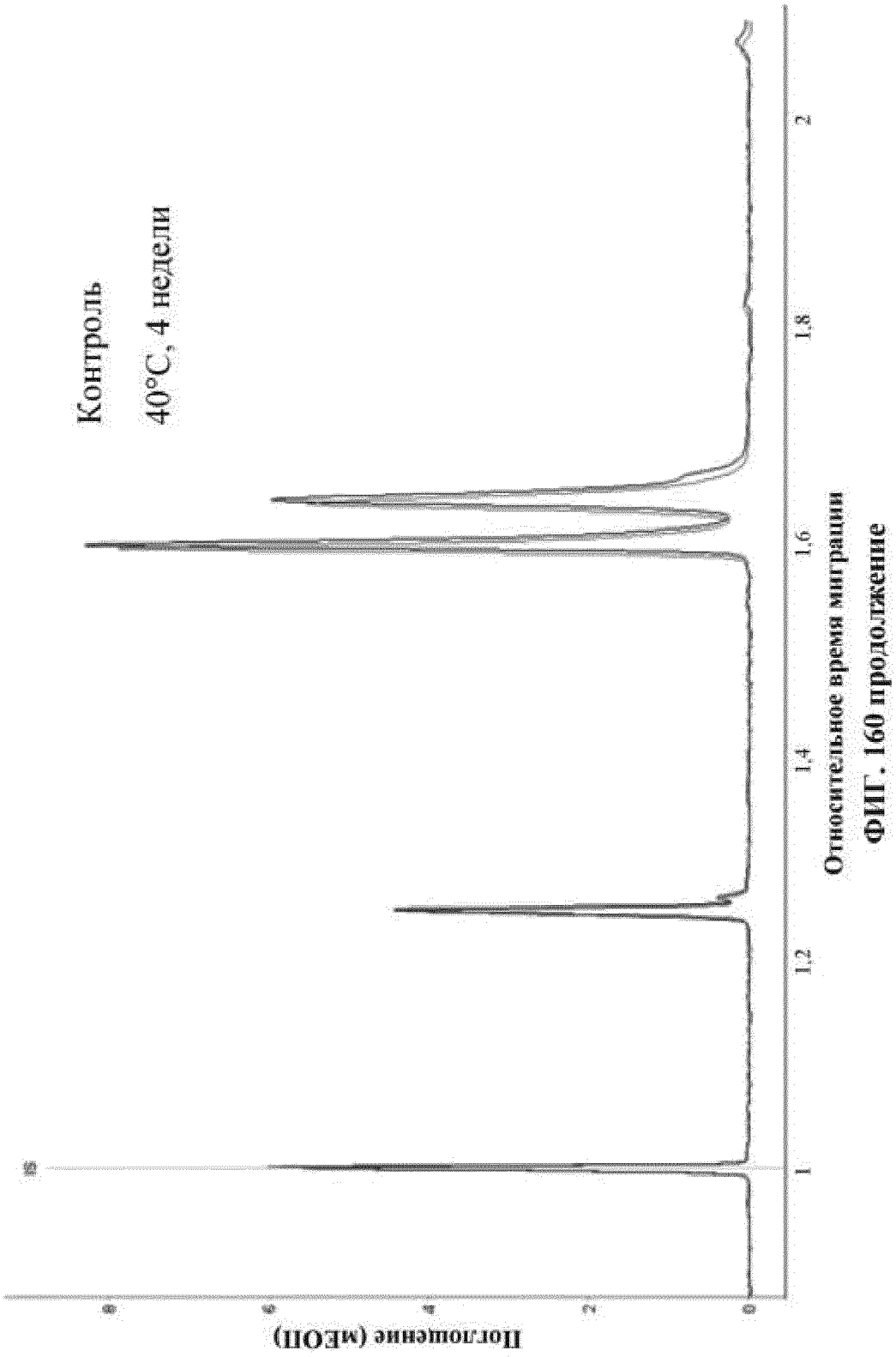

151
113,25
75,5
37,75
0
Z-показатель
3
6
10
14
18
22
Партнер по связыванию


Контроль
4 недели, 40°C, HTS
Ответ [мЕОП]
Время удерживания [мин]
16,642
14,196
10,835
20,343
23,651
25,878

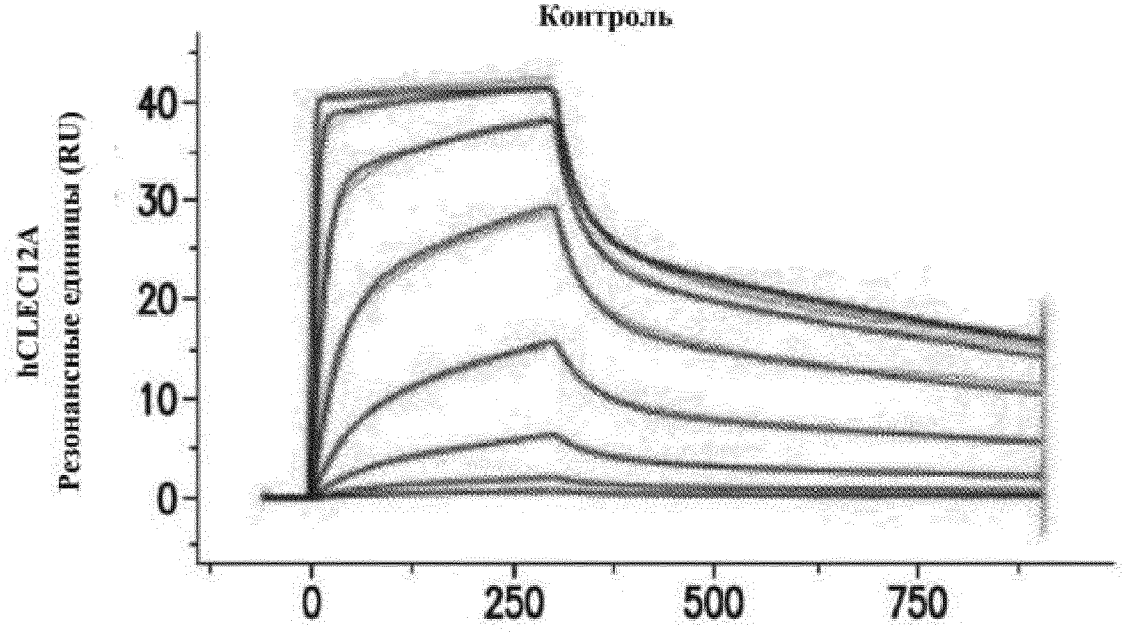
ФИГ. 159


Контроль
40°C, 4 недели
Поглощение (mEOП)
Относительное время миграции
1
1.5
2
2.5

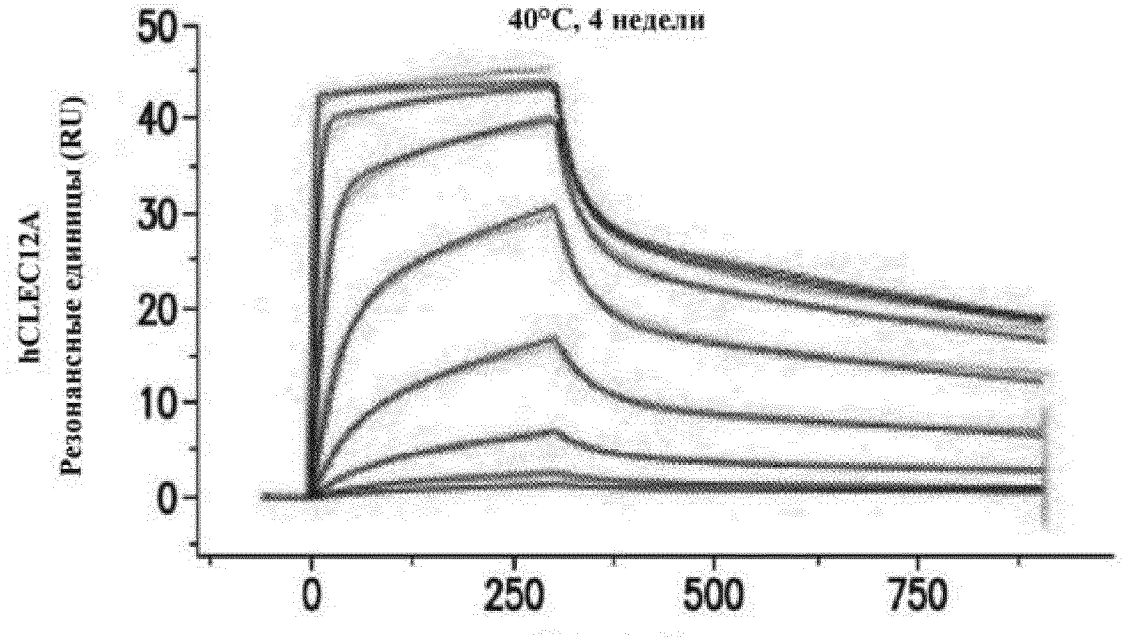
ФИГ. 160




ФИГ. 160 продолжение

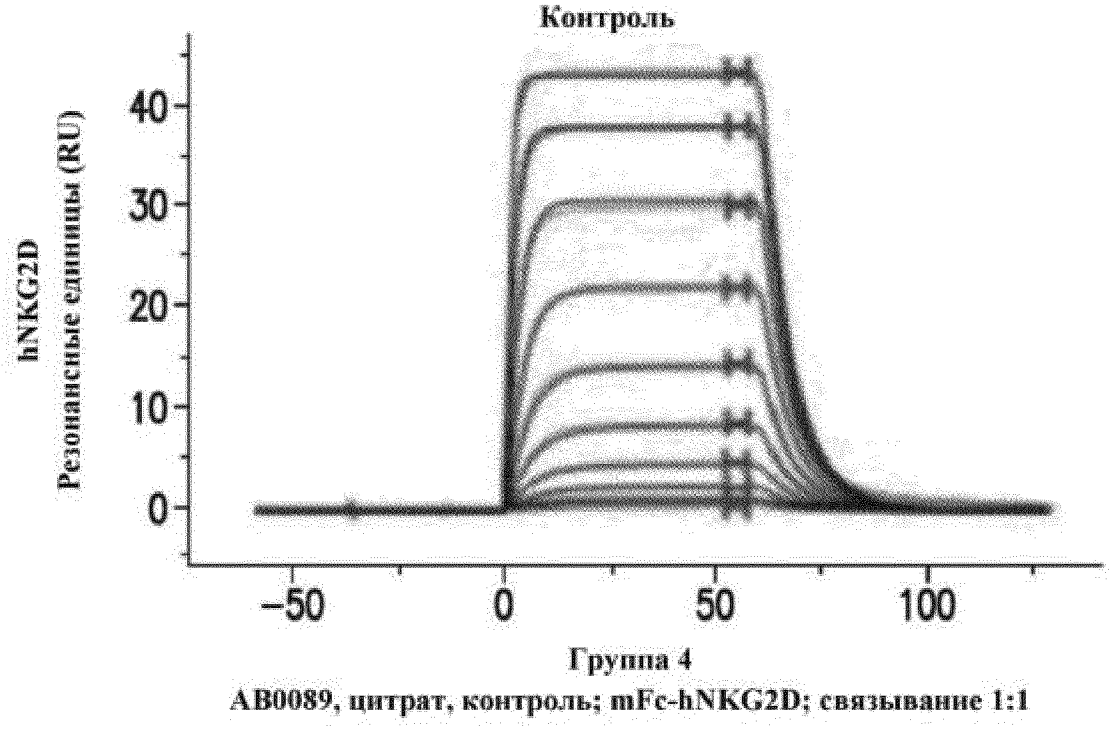



Группа 4
hCLEC12A-His; AB0089, цитрат, контроль; модель с двумя состояниями

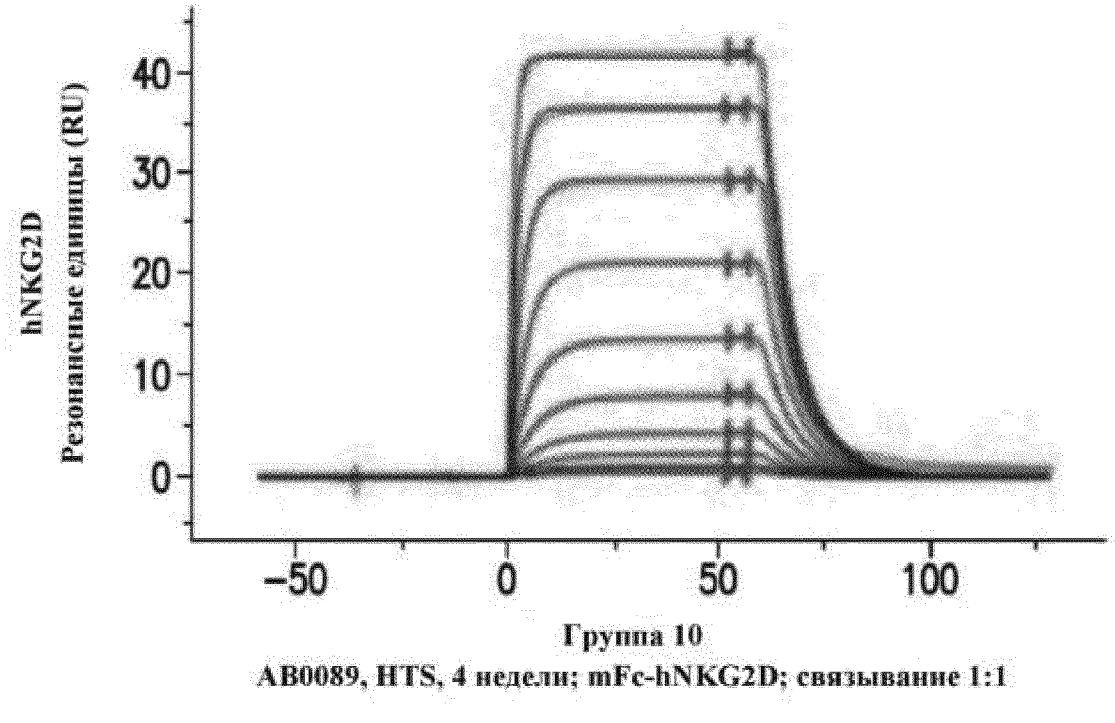



Группа 10
hCLEC12A-His; AB0089, HTS, 40C, 4 недели; модель с двумя состояниями

ФИГ. 161A

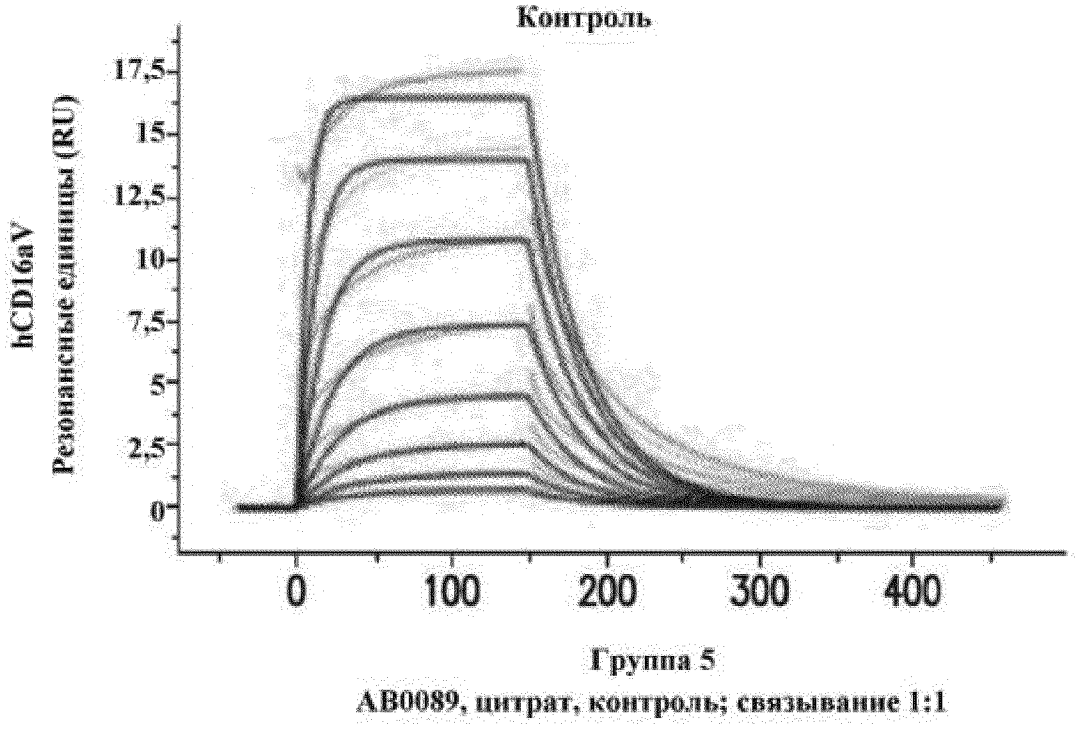



Группа 4
AB0089, цитрат, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

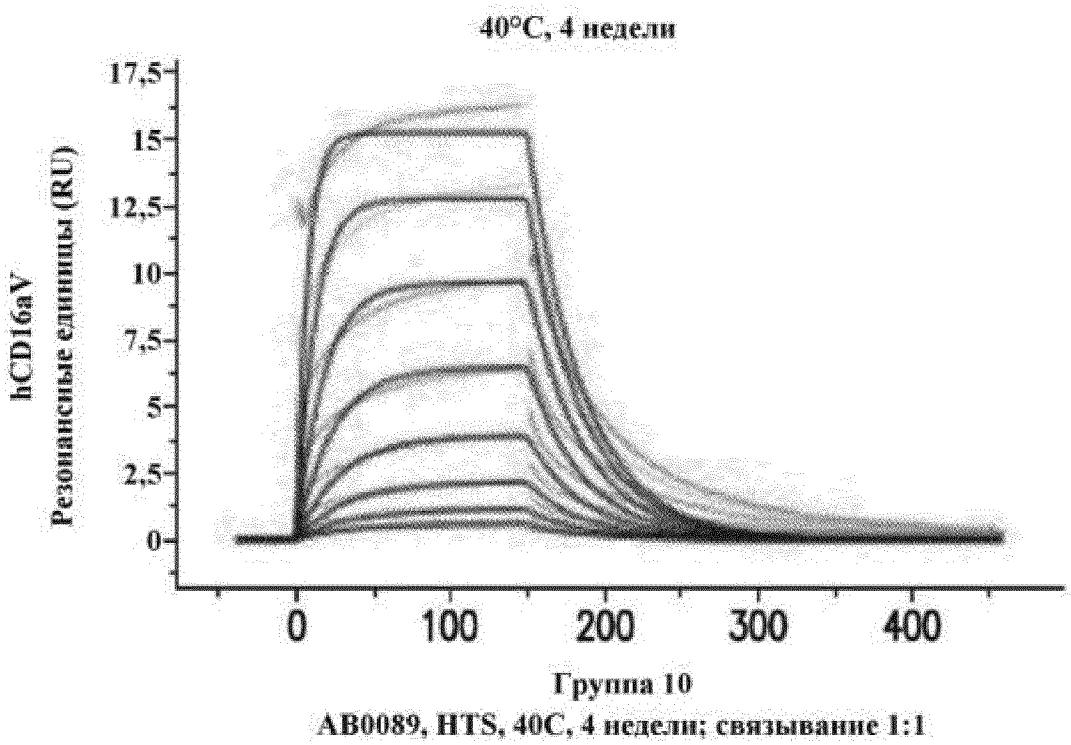



Группа 10
AB0089, HTS, 4 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 161B



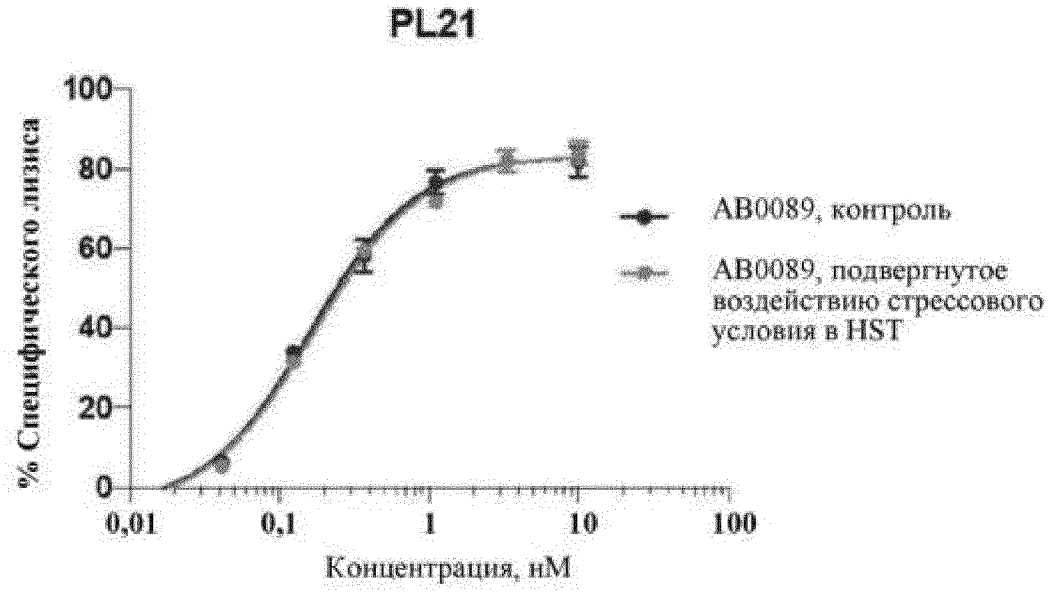

Группа 5
AB0089, цитрат, контроль; связывание 1:1

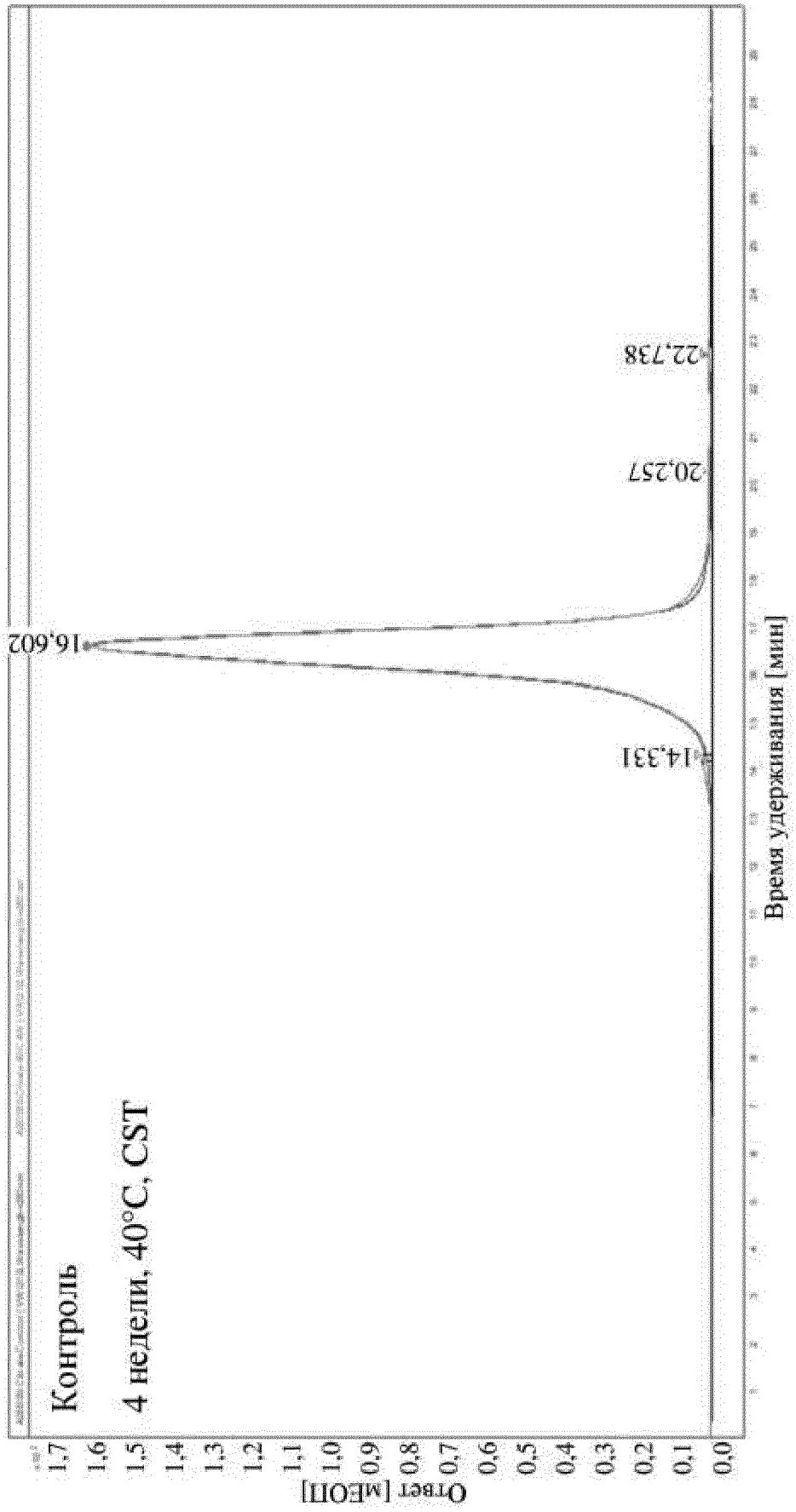



Группа 10
AB0089, HTS, 40C, 4 недели; связывание 1:1

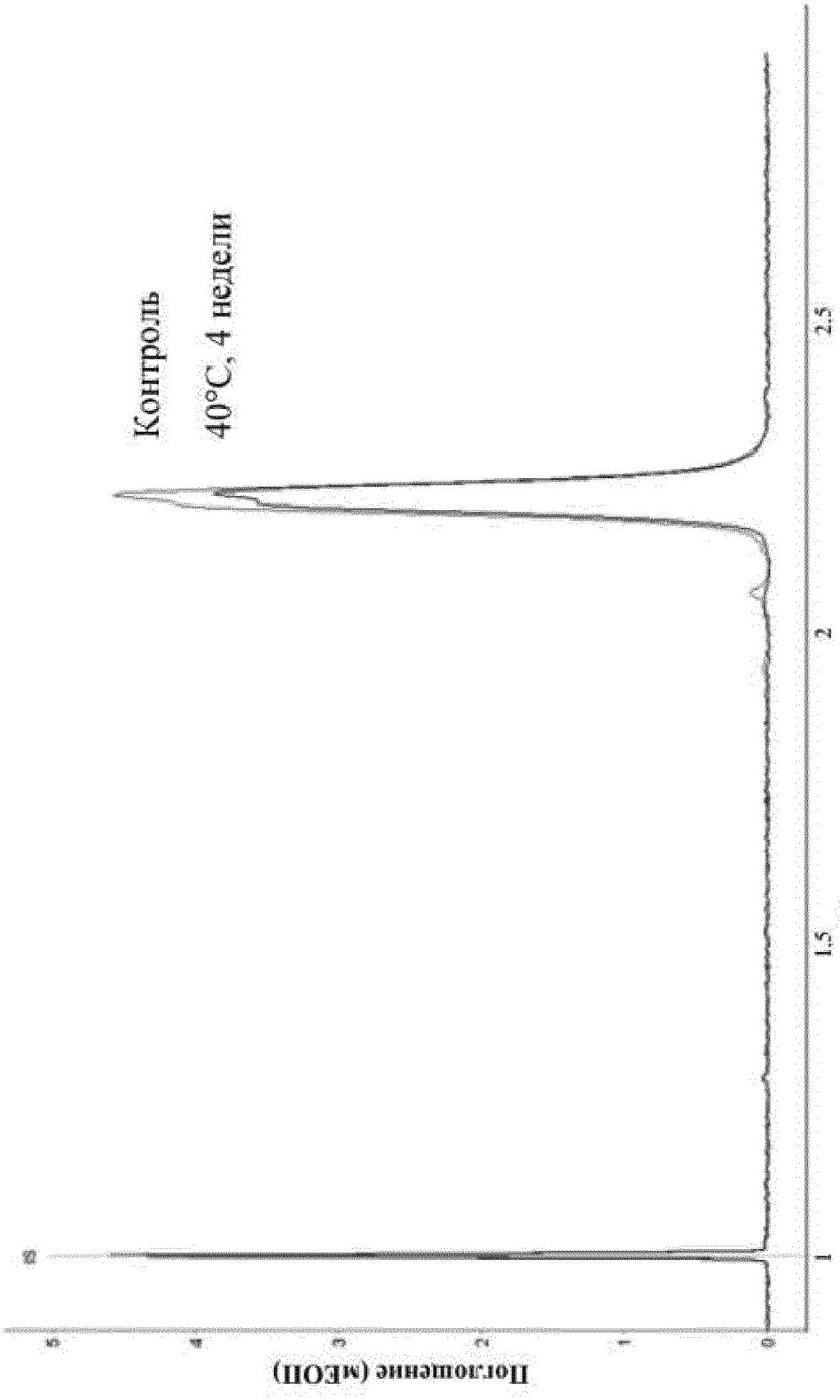
ФИГ. 161C

ФИГ. 162

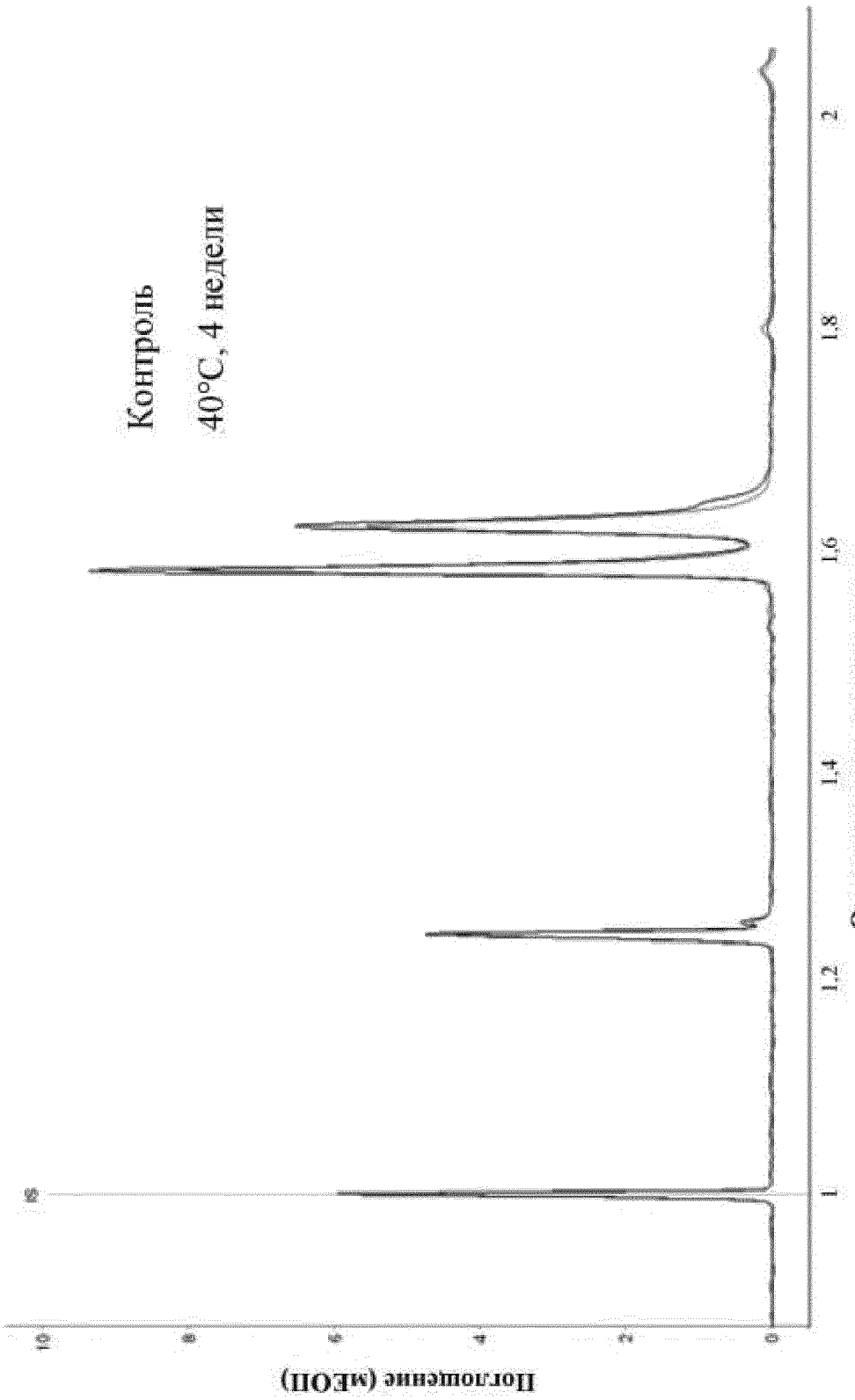

PL21
% Специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0089, контроль
AB0089, подвергнутое воздействию стрессового условия в HST


Контроль
4 недели, 40°C, CST
Ответ [mEOU]
Время удерживания [мин]
14,331
16,602
20,257
22,738

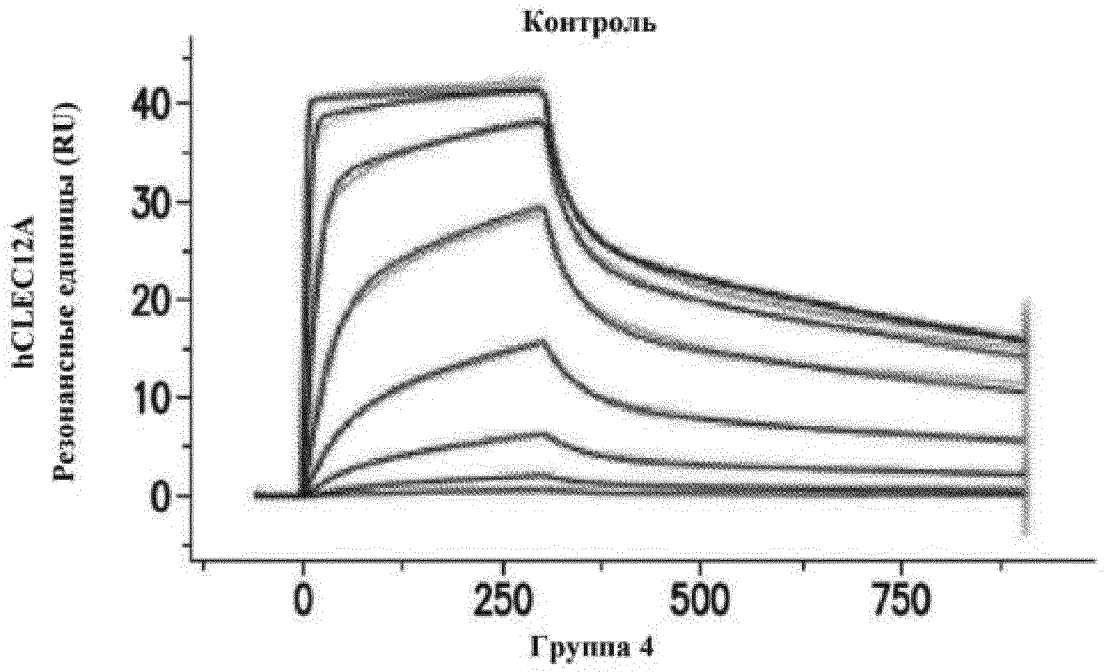
ФИГ. 163


Контроль
40°C, 4 недели
Поглощение (мЕОП)
Относительное время миграции
1
1.5
2
2.5

ФИГ. 164

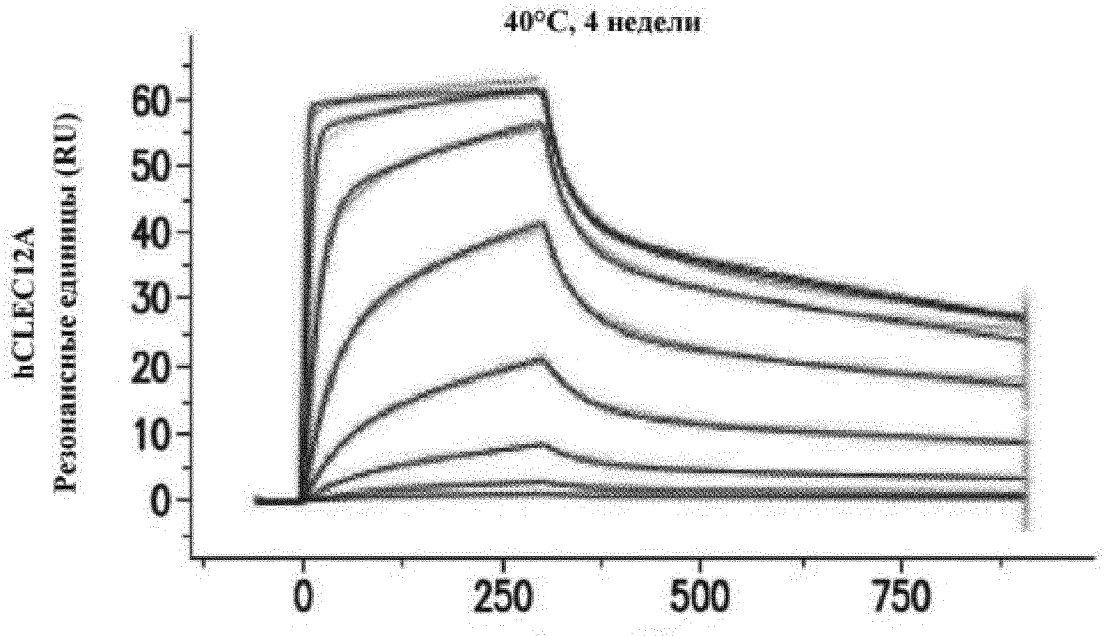



ФИГ. 164 продолжение




Группа 4

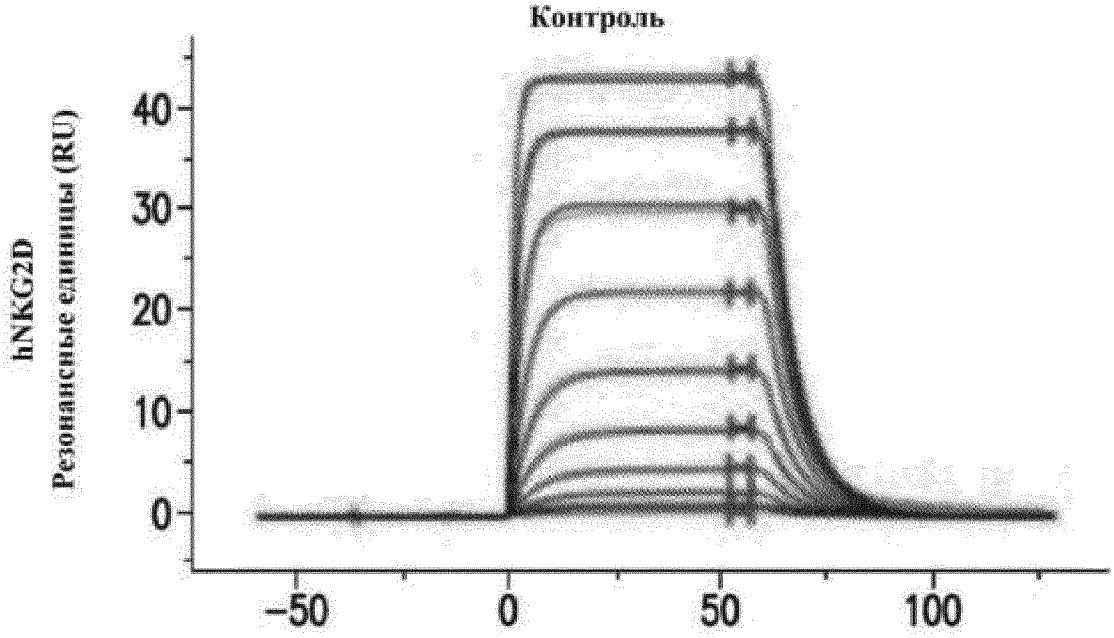
hCLEC12A-His; AB0089, цитрат, контроль; модель с двумя состояниями



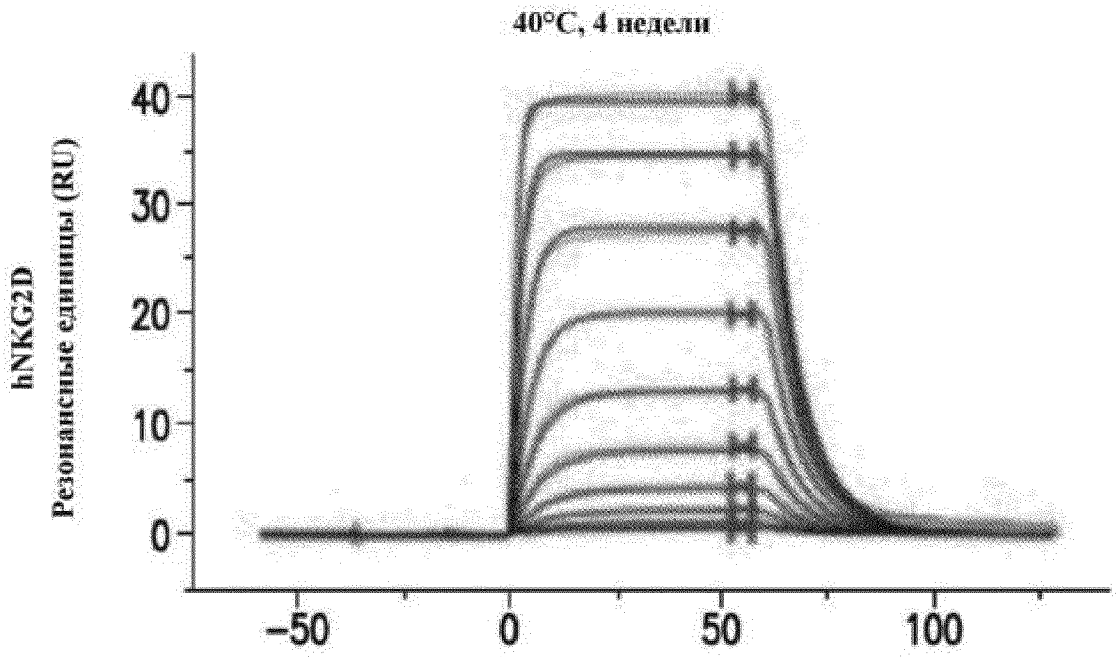

Группа 10

hCLEC12A-His; AB0089, цитрат, 40C, 4 недели; модель с двумя состояниями

ФИГ. 165А

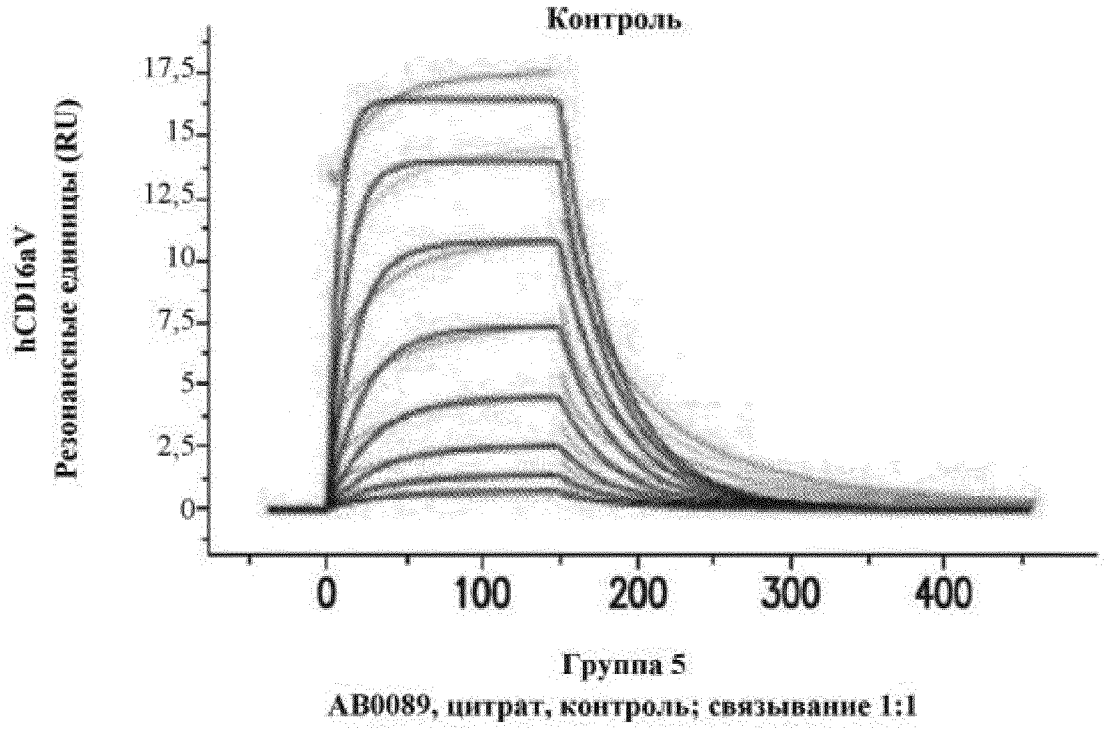



Группа 4
AB0089, цитрат, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

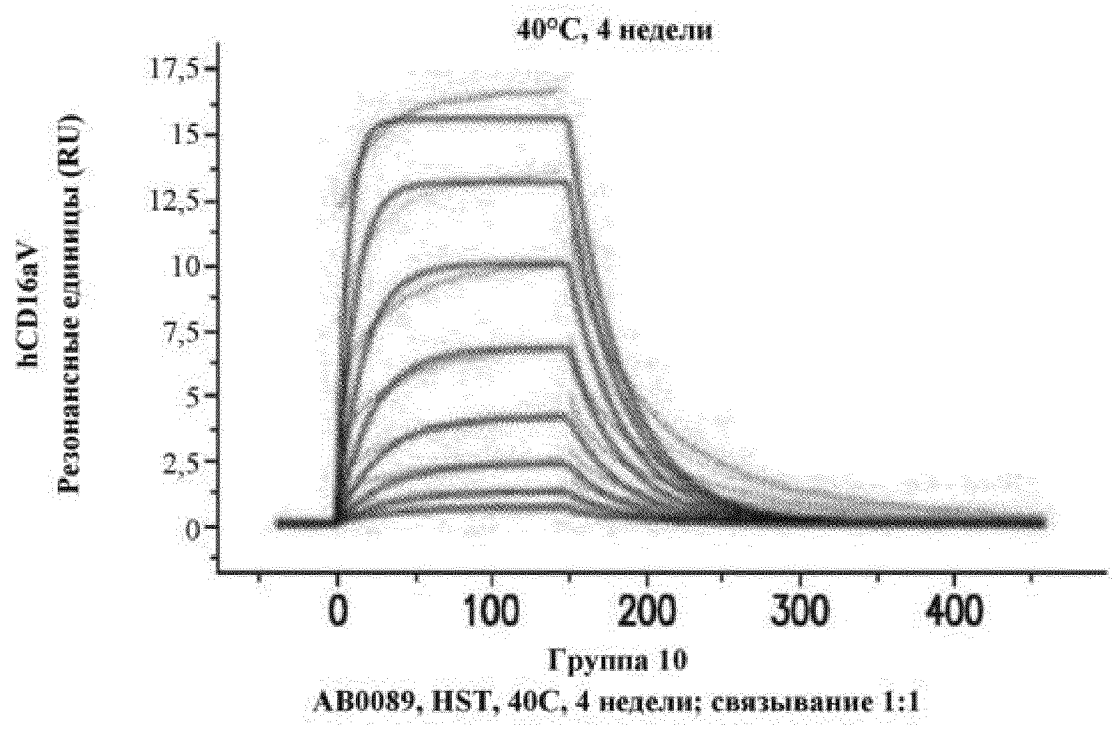



Группа 1
AB0089, цитрат, 4 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 165B



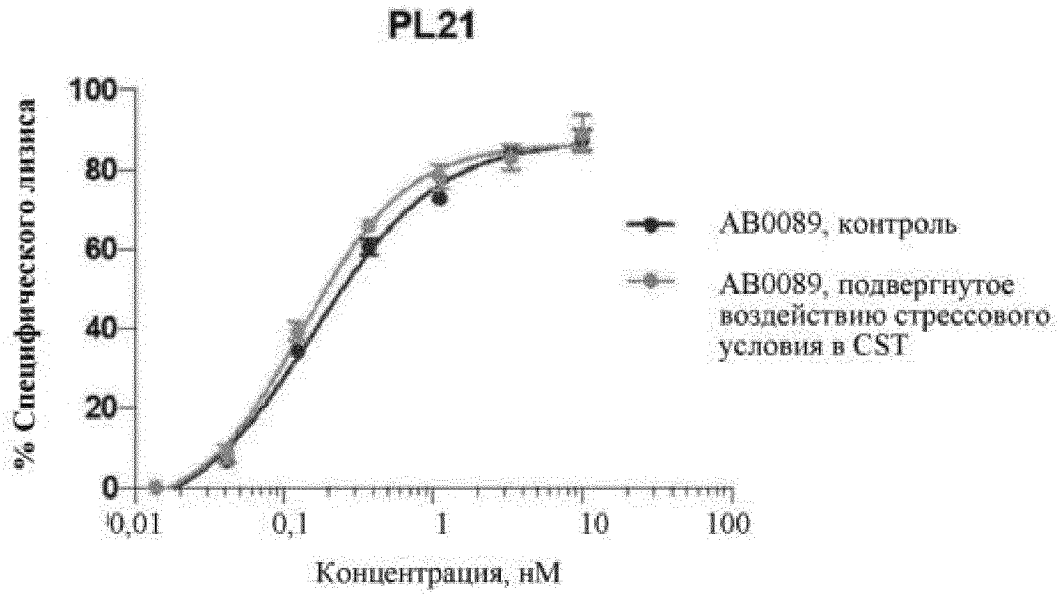

Группа 5
AB0089, цитрат, контроль; связывание 1:1

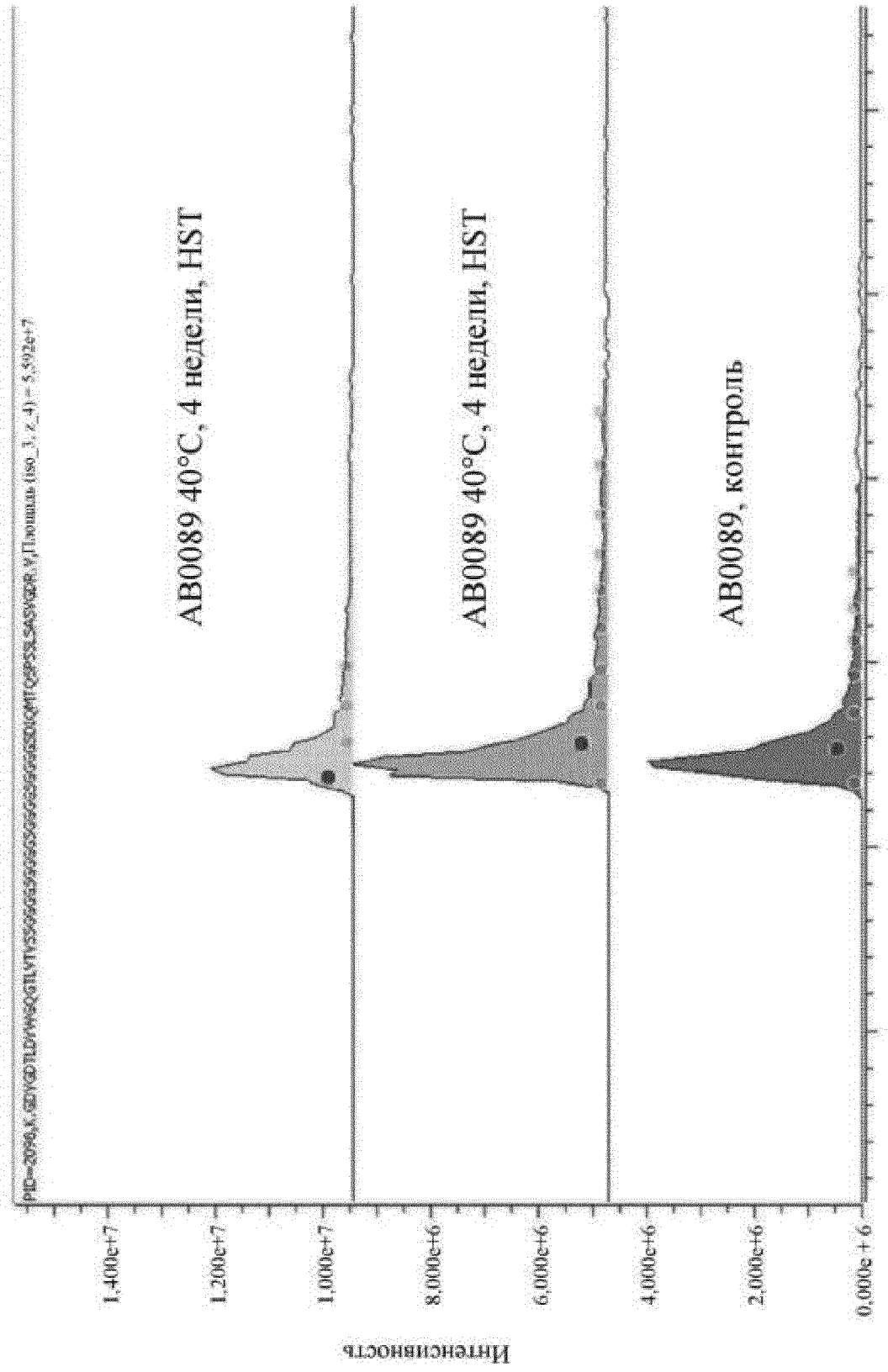



Группа 10
AB0089, HST, 40C, 4 недели; связывание 1:1

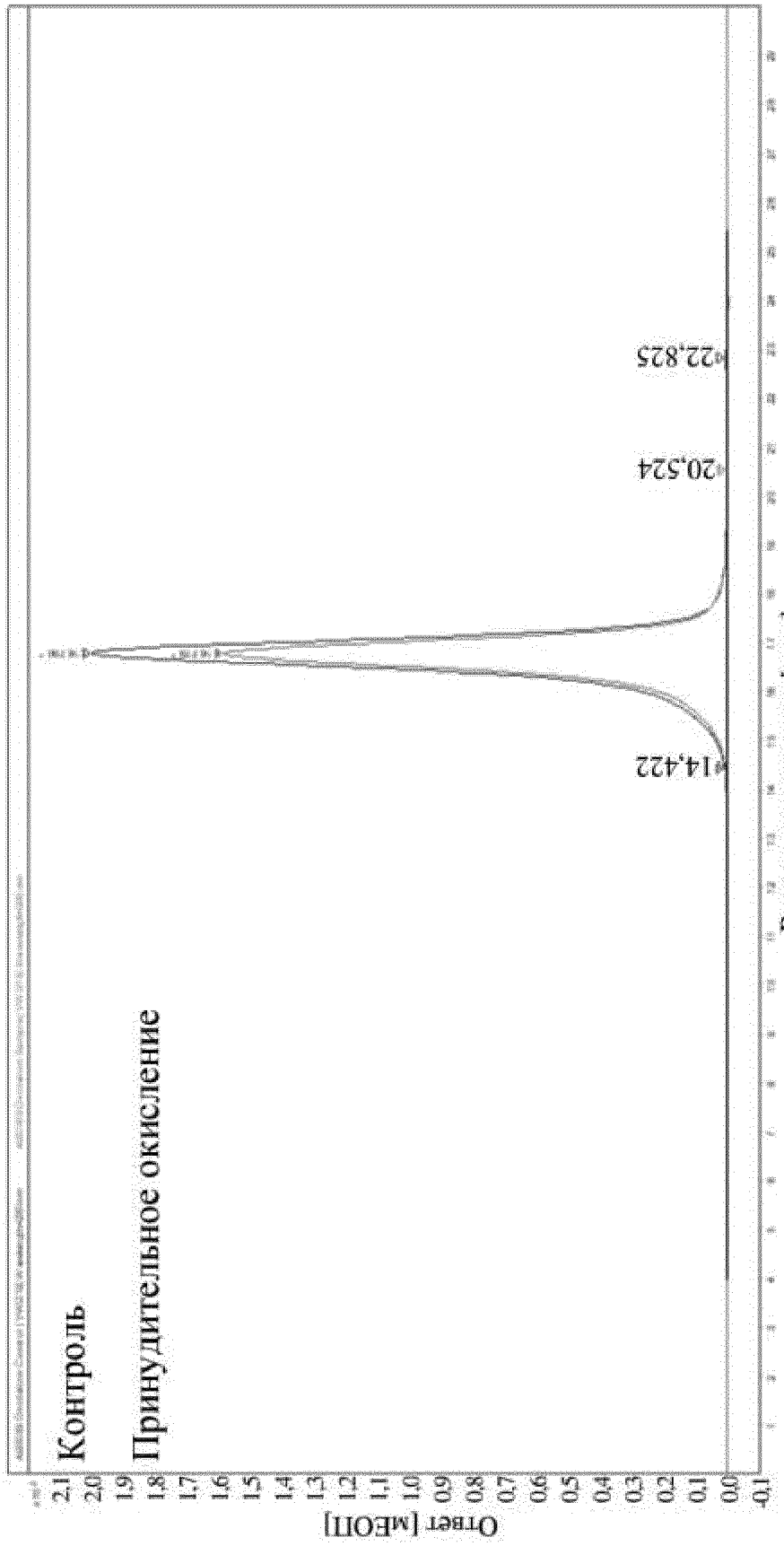
ФИГ. 165C

ФИГ. 166

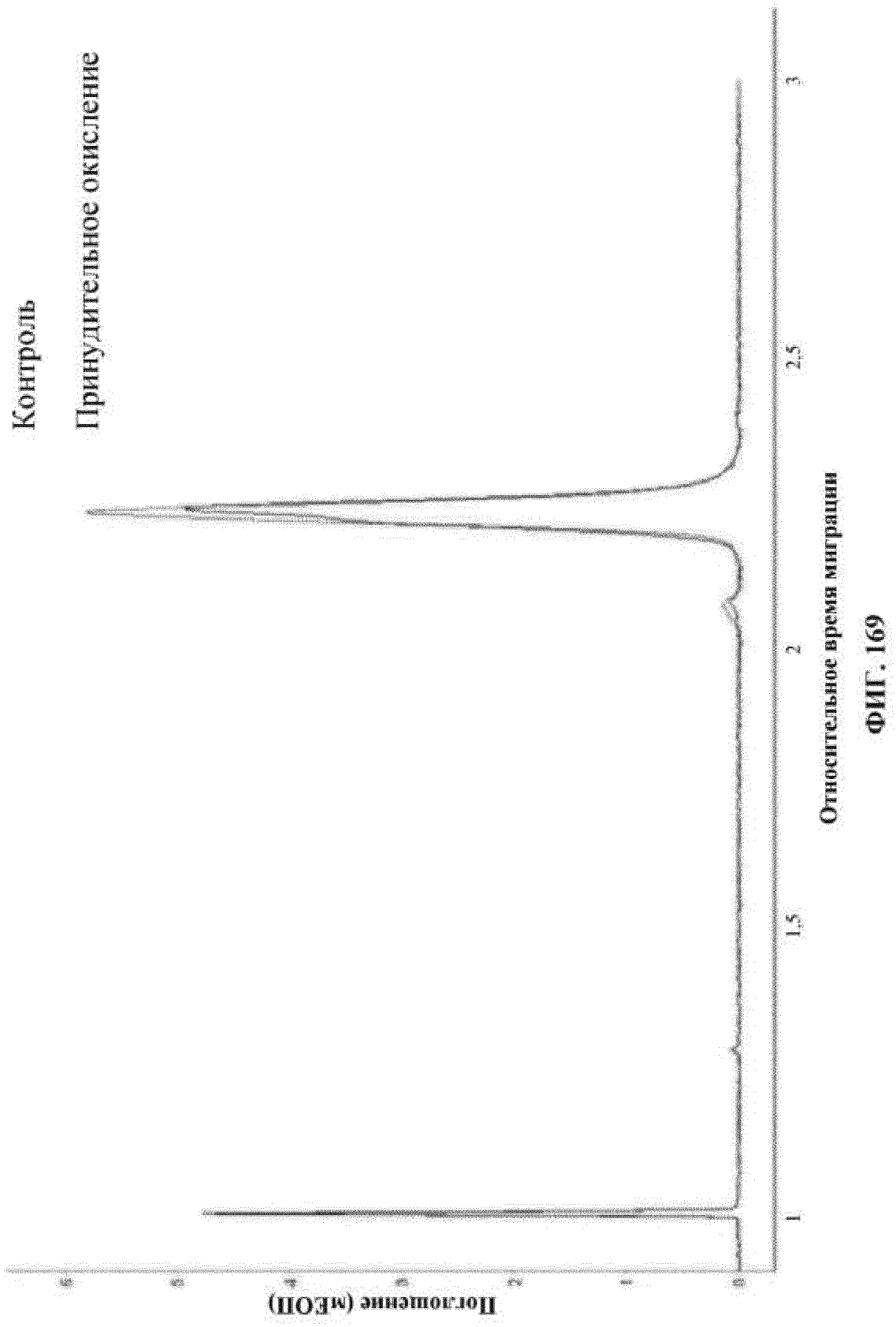

PL21
% Специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0089, контроль
AB0089, подвергнутое воздействию стрессового условия в CST


AB0089 40°C, 4 недели, HST
AB0089 40°C, 4 недели, HST
AB0089, контроль
Интенсивность
1,400e+7
1,200e+7
1,000e+7
8,000e+6
6,000e+6
4,000e+6
2,000e+6
0,000e + 6

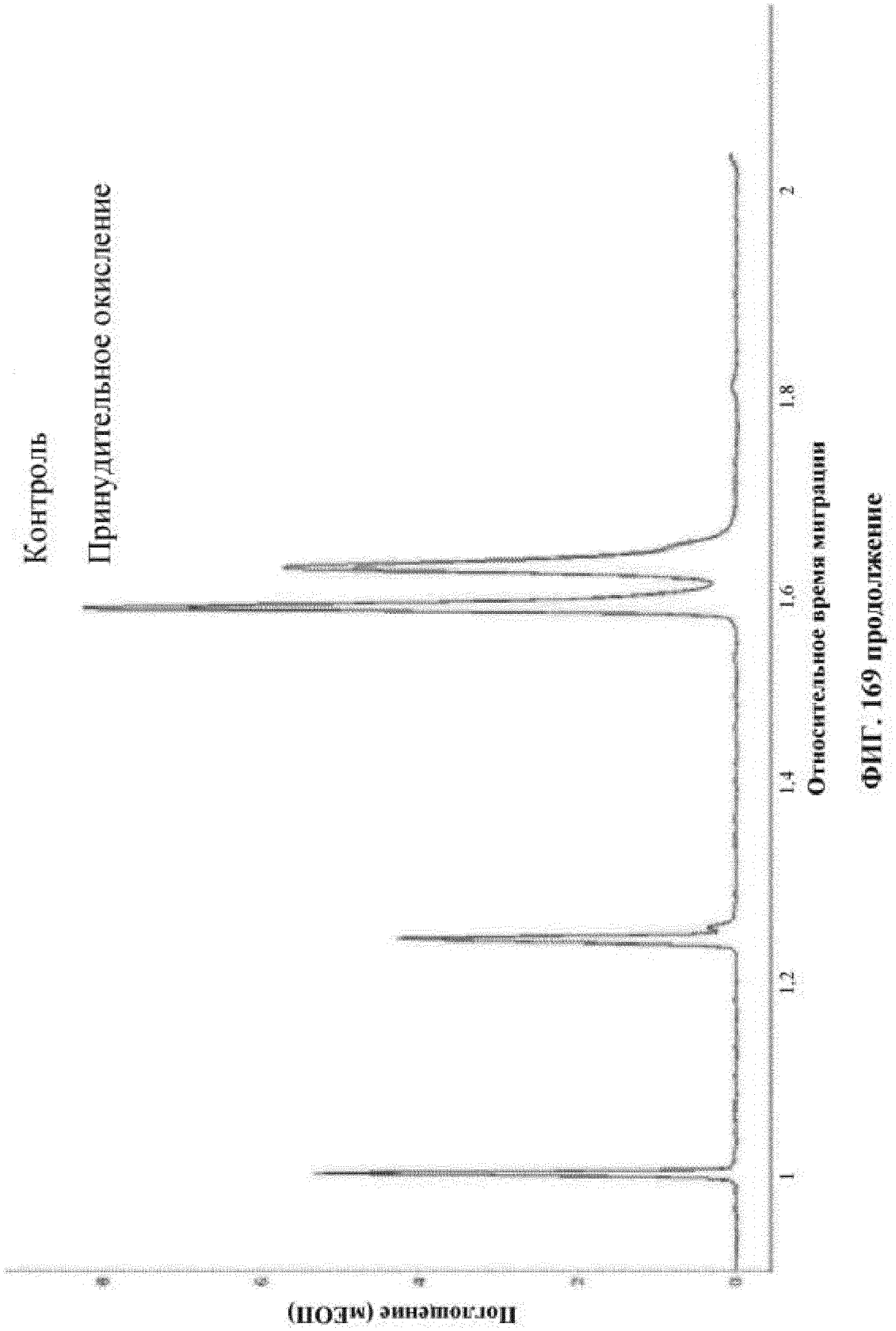
ФИГ. 167


Ответ [мЕОП]
2,1
2,0
1,9
1,8
1,7
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
-0,1
Контроль
Принудительное окисление
14,422
20,524
22,825
Время удерживания [мин]

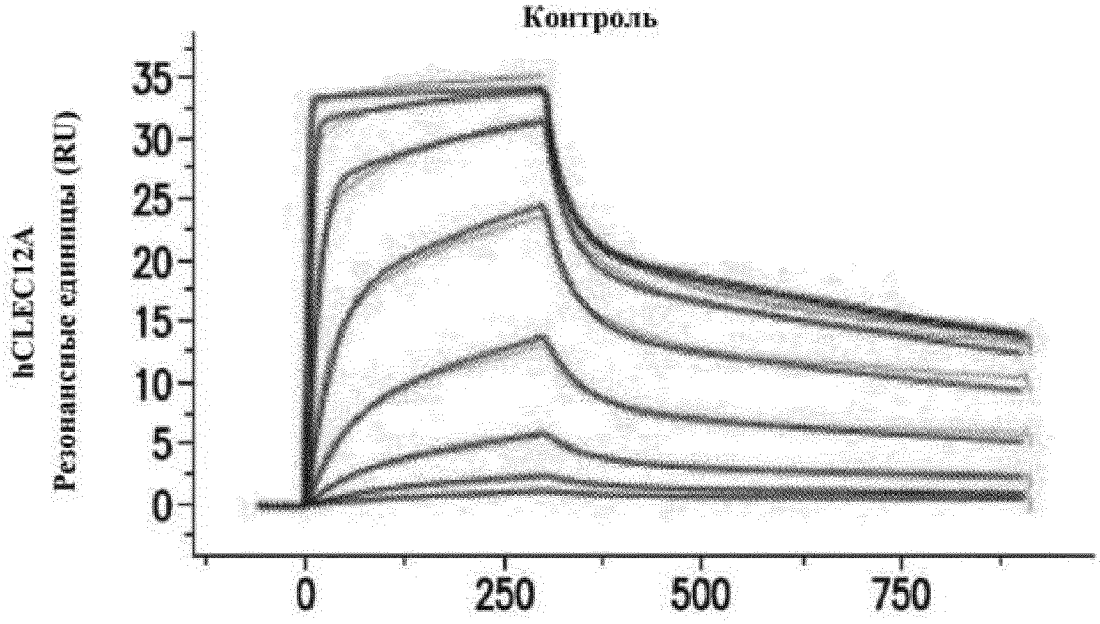
**ФИГ. 168**


Контроль
Принудительное окисление
Поглощение (mEOD)
Относительное время миграции
1
1,5
2
2,5
3

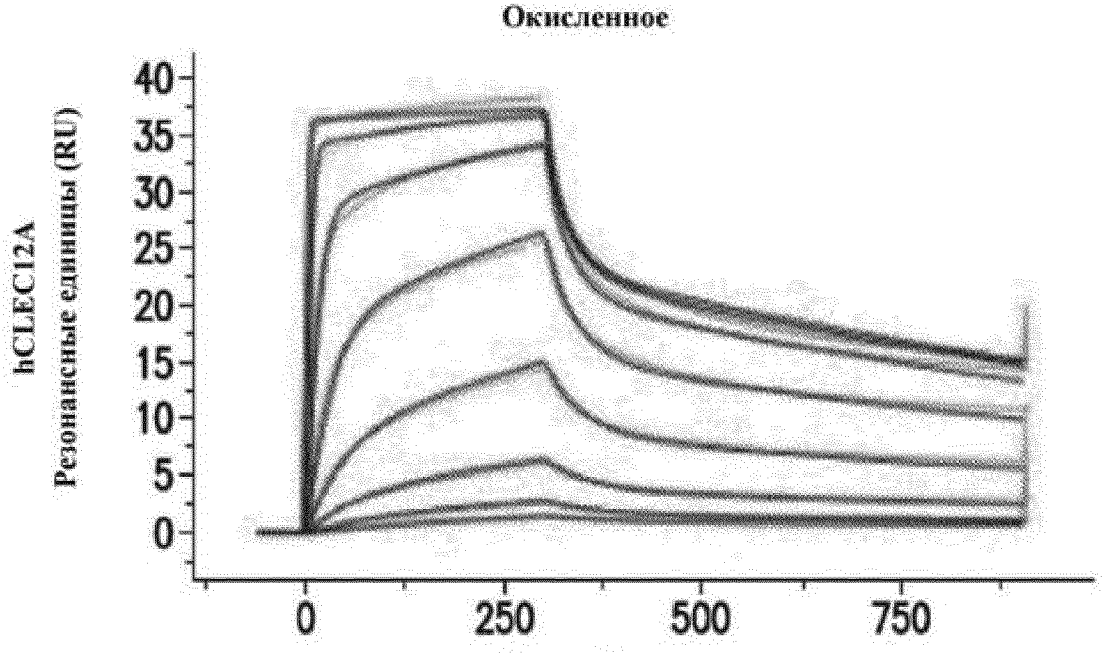
ФИГ. 169




ФИГ. 169 продолжение

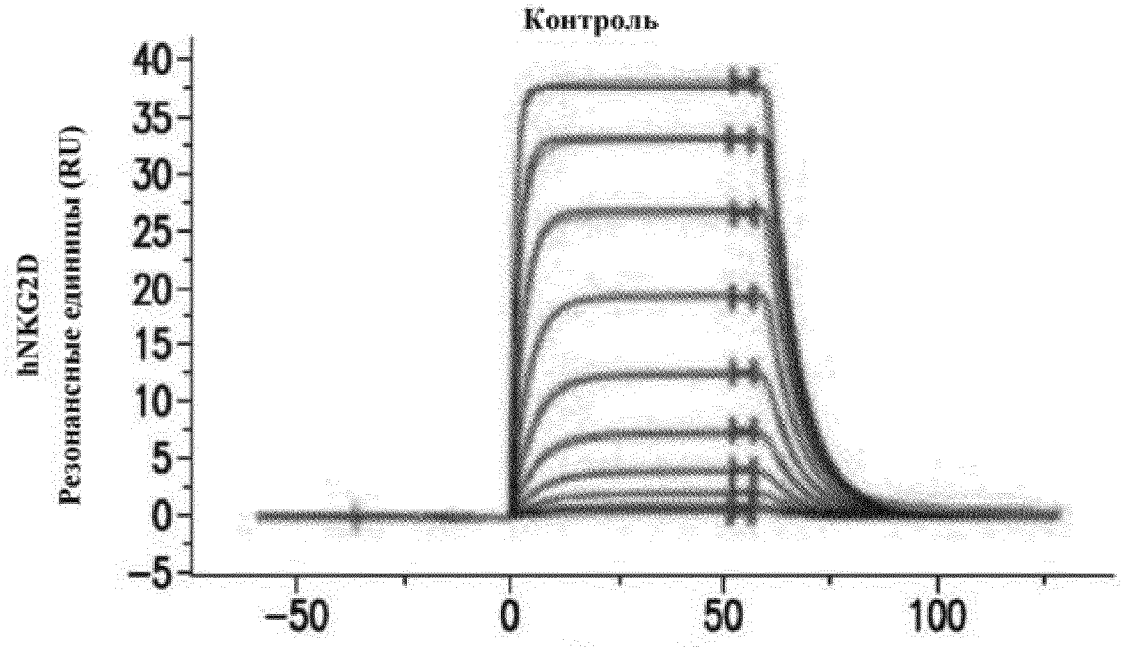



Группа 13
hCLEC1A-His; AB0089, окисление, контроль; модель с двумя состояниями



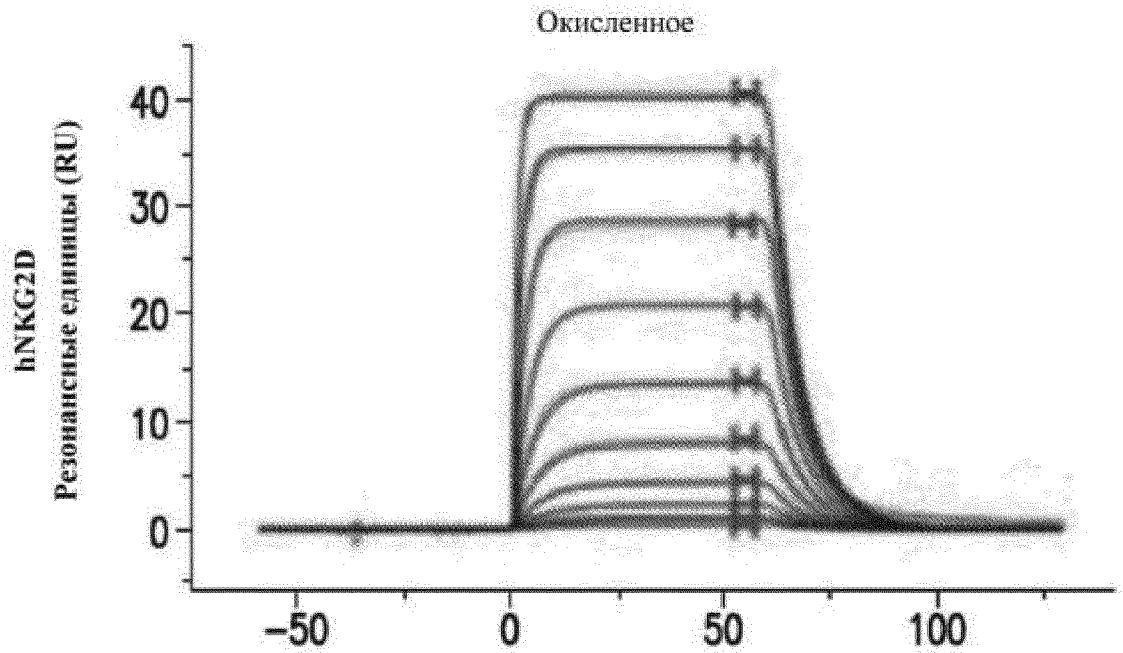

Группа 7
hCLEC1A-His; AB0089, принудительное окисление; модель с двумя состояниями

ФИГ. 170А




Группа 13

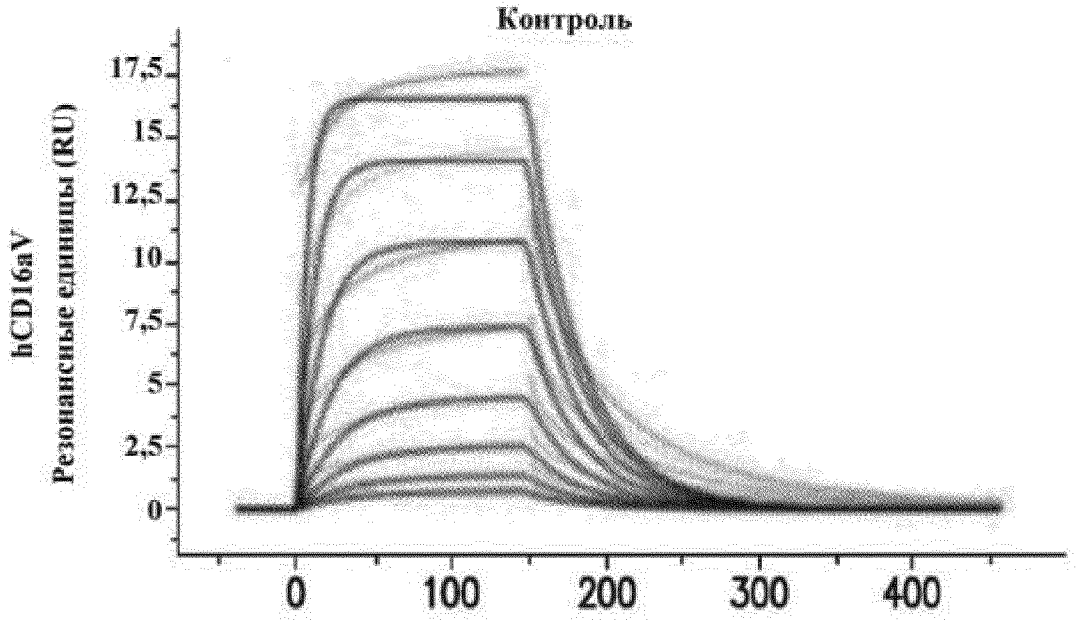
AB0089, окисление, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1



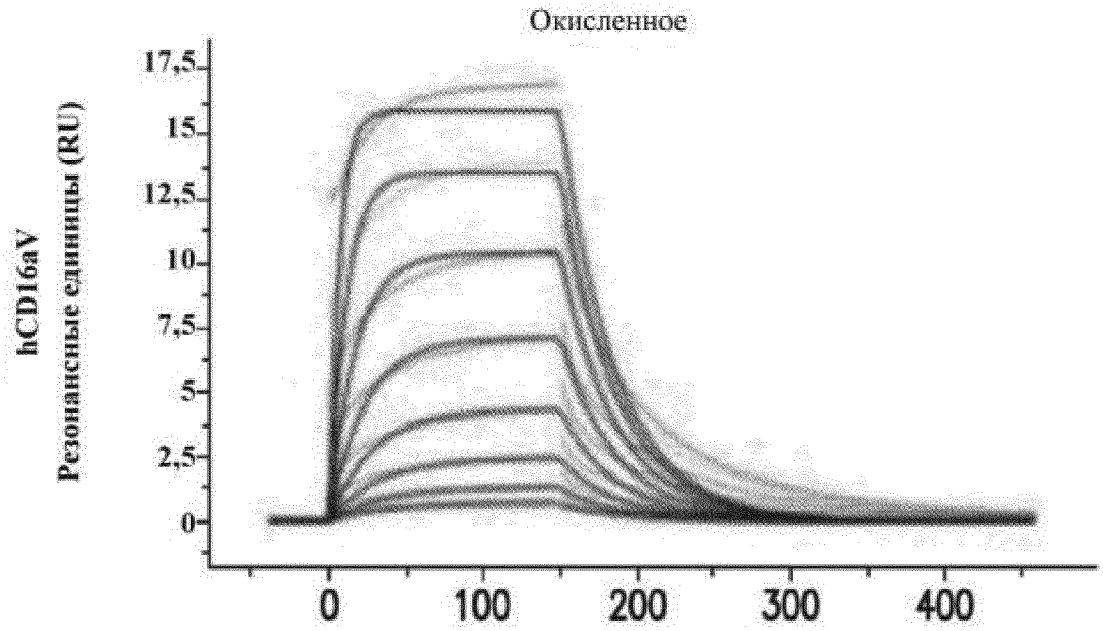

Группа 7

AB0089, принудительное окисление; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 170B



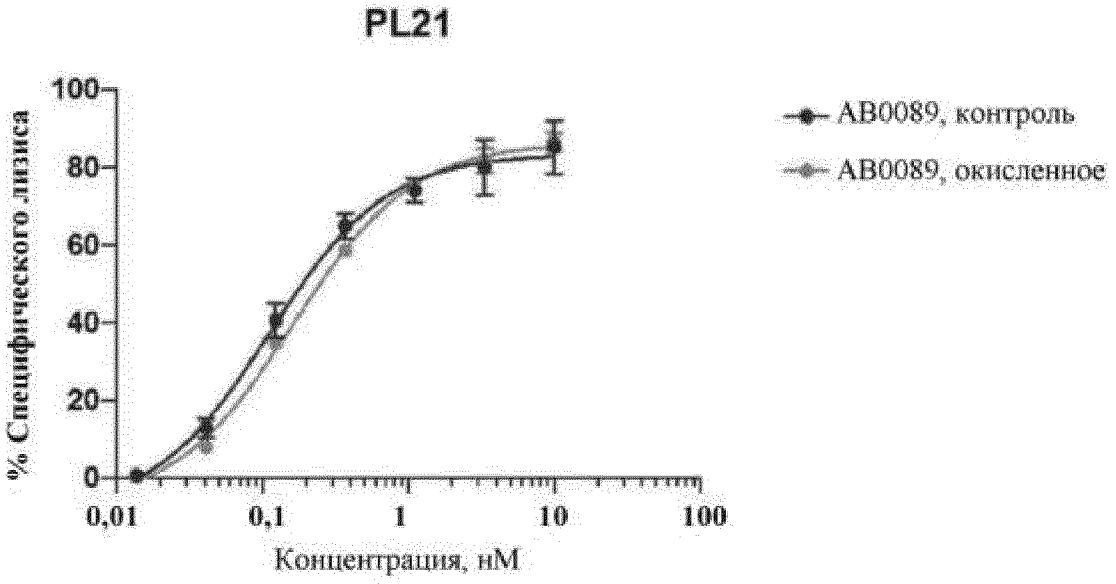

Группа 13
AB0089, окисление, контроль; связывание 1:1

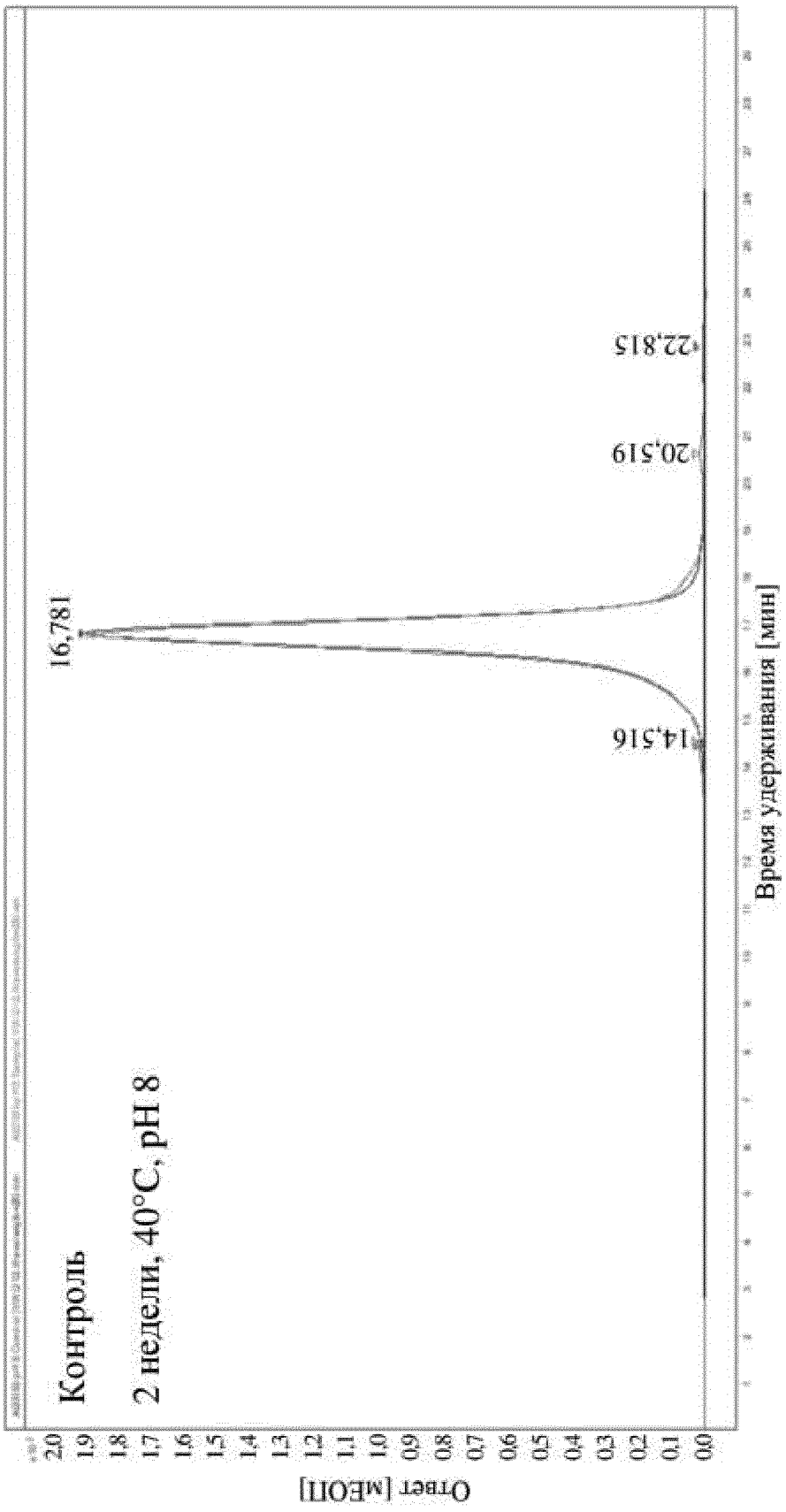



Группа 7
AB0089, принудительное окисление; связывание 1:1

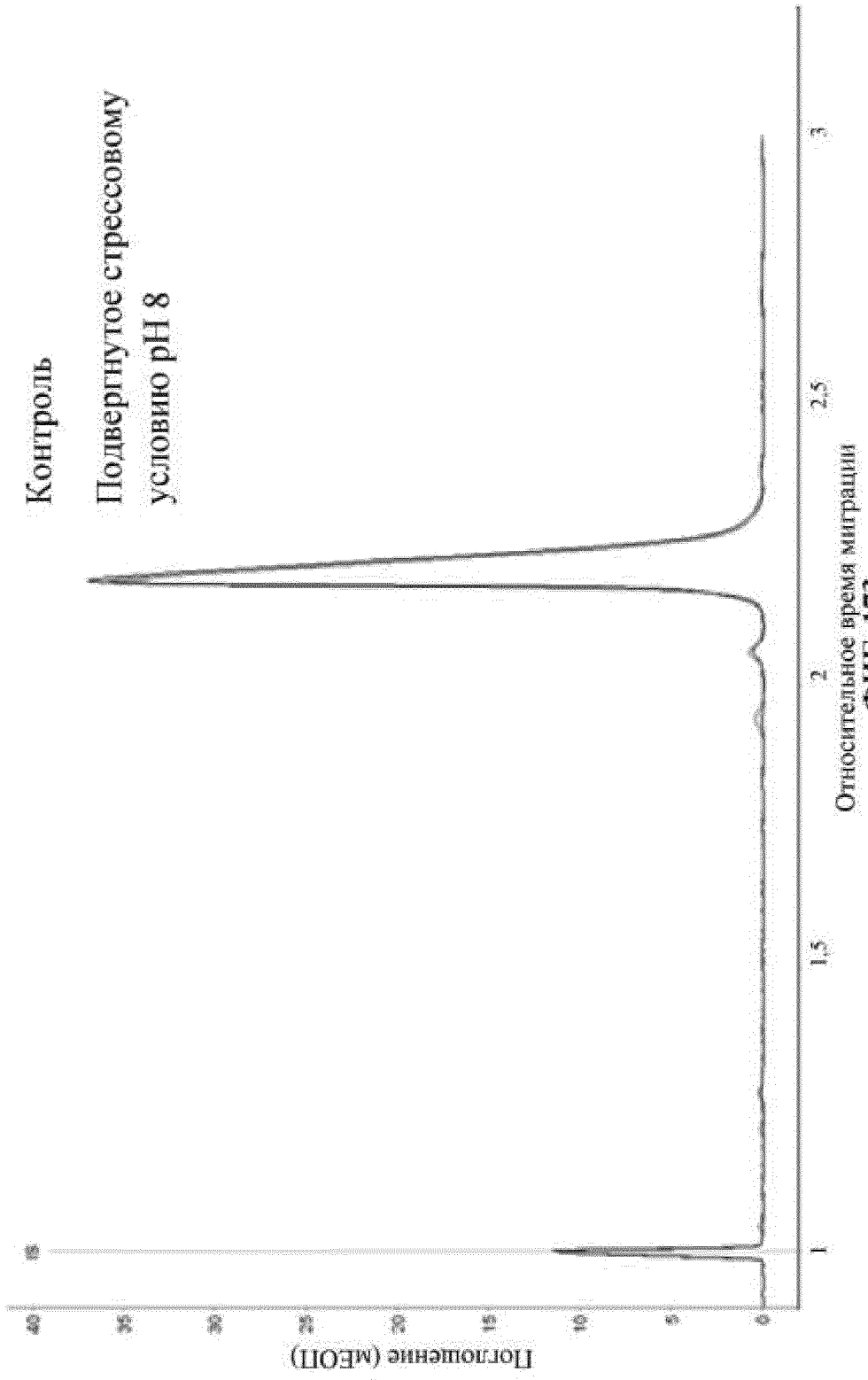
ФИГ. 170С

ФИГ. 171

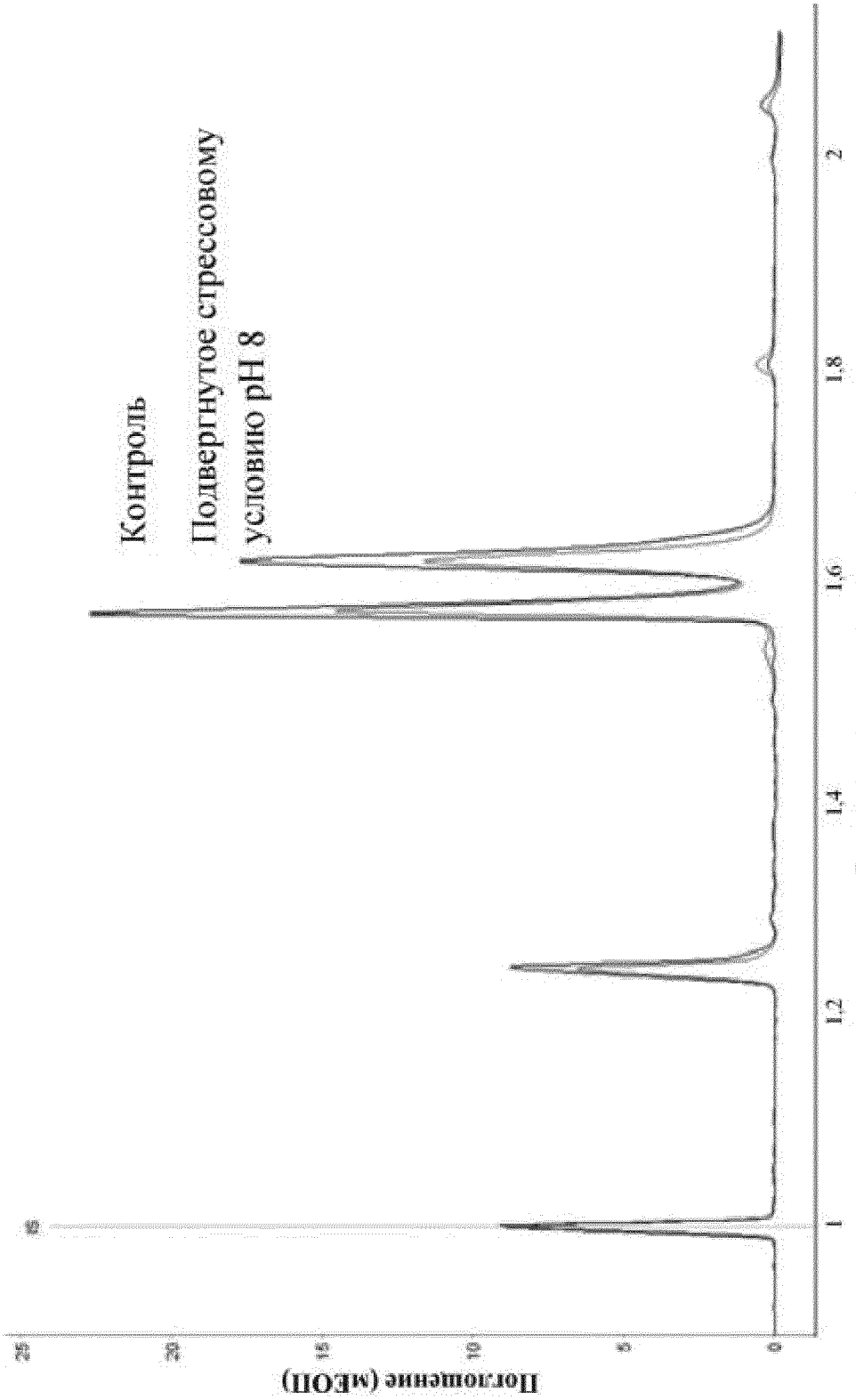

PL21
% Специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0089, контроль
AB0089, окисленное


Контроль
2 недели, 40°C, pH 8
16,781
14,516
20,519
22,815
Ответ [мЕОП]
Время удерживания [мин]

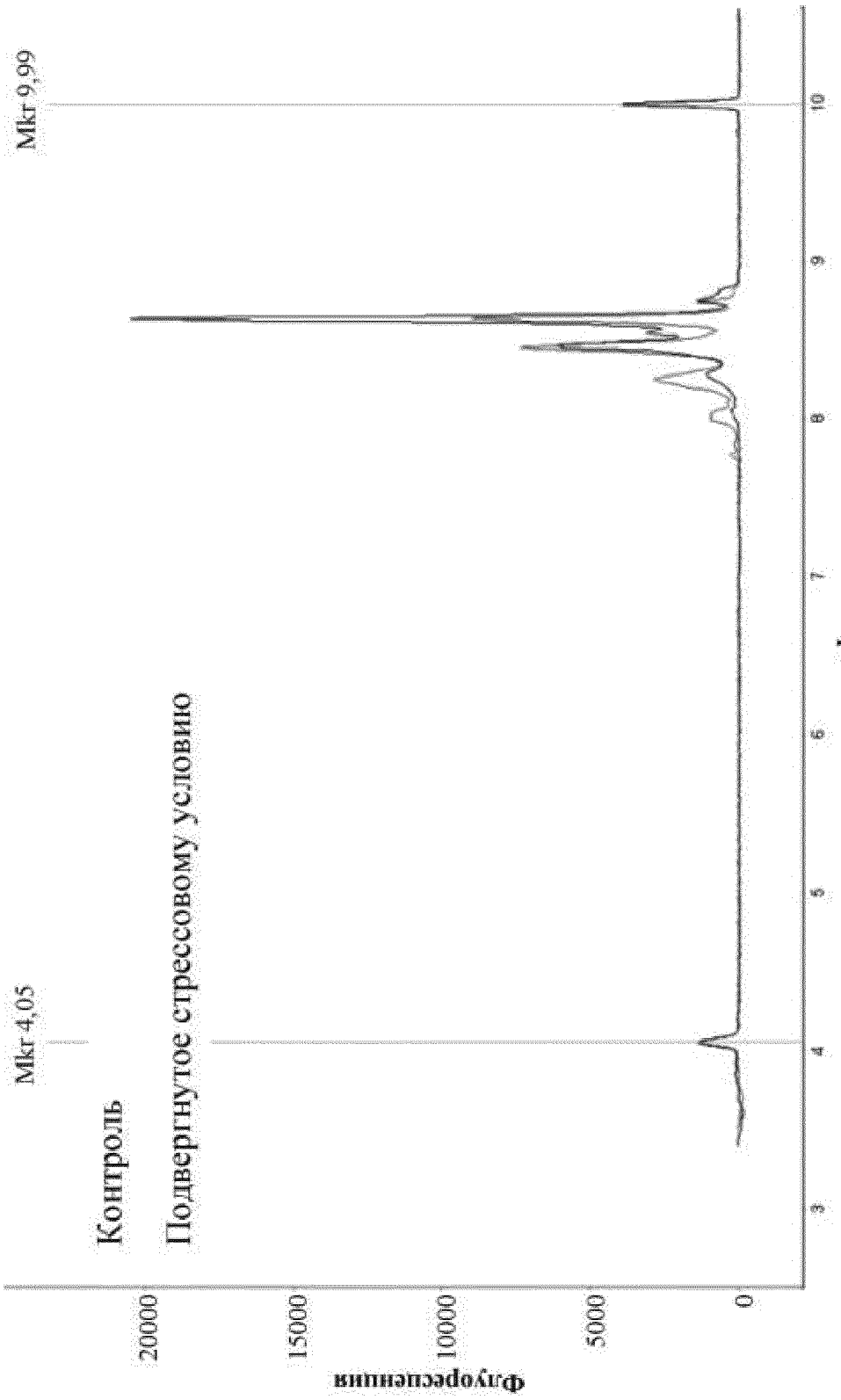
ФИГ. 172


Контроль
Подвергнутое стрессовому условию pH 8
Поглощение (mEOD)
Относительное время миграции
0
5
10
15
20
25
30
35
40
1
1,5
2
2,5
3

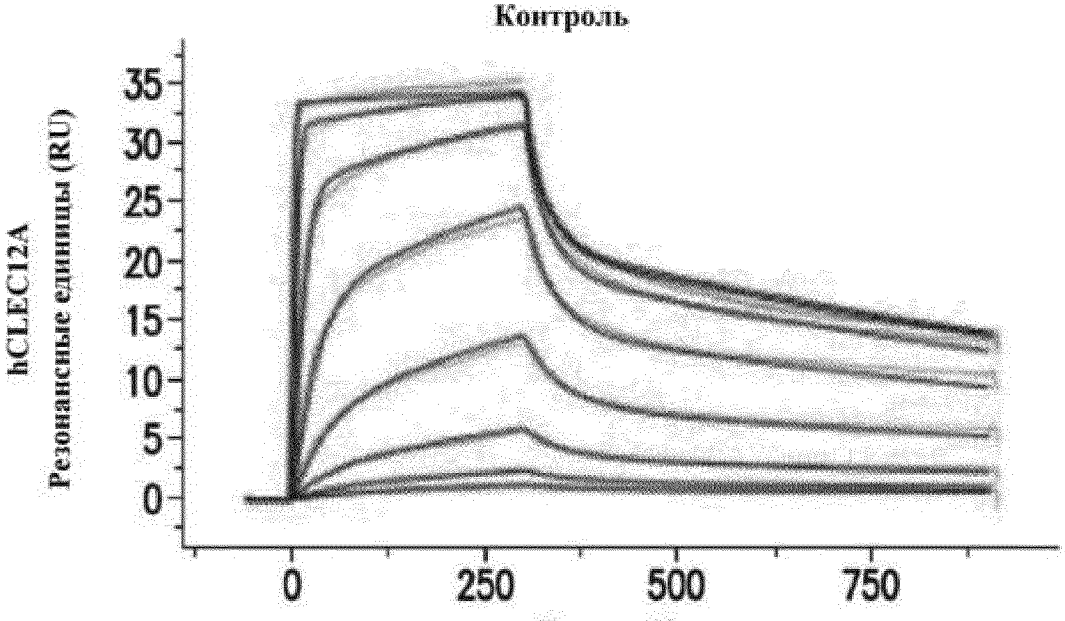
ФИГ. 173



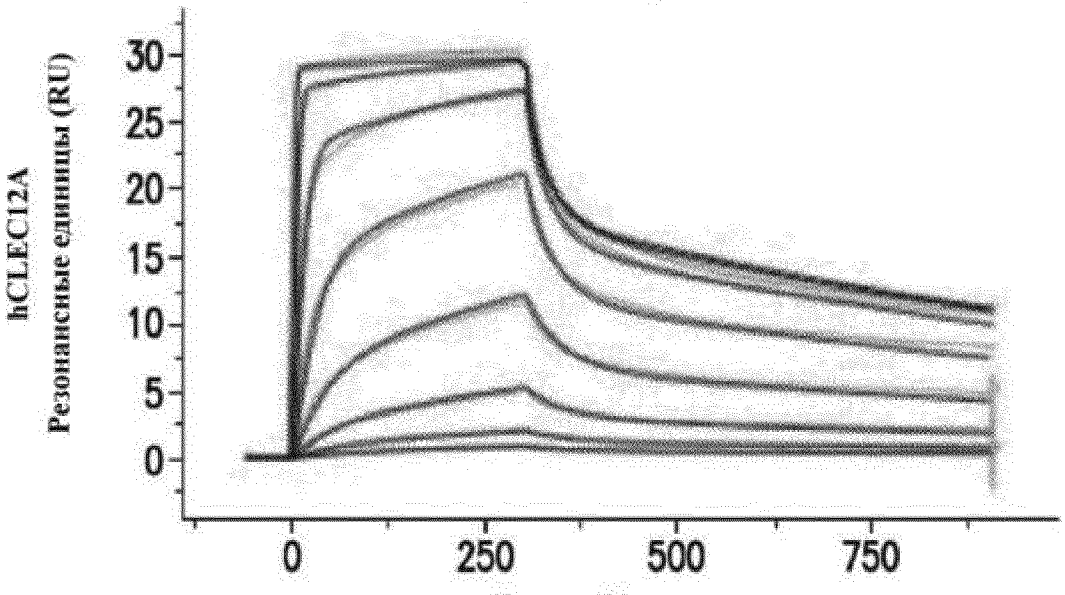

ФИГ. 173 продолжение


Мкг 9,99
Мкг 4,05
Контроль
Подвергнутое стрессовому условию
Флуоресценция
20000
15000
10000
5000
0
3
4
5
6
7
8
9
10
pI

ФИГ. 174

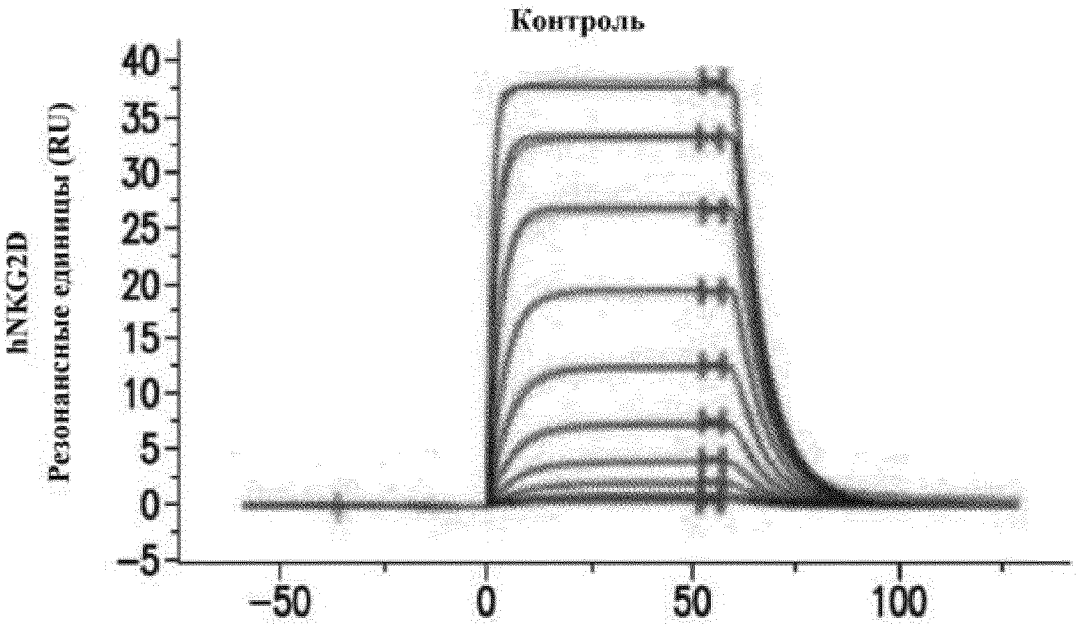



Группа 13
hCLEC12A-His; AB0089, окисление, контроль; модель с двумя состояниями

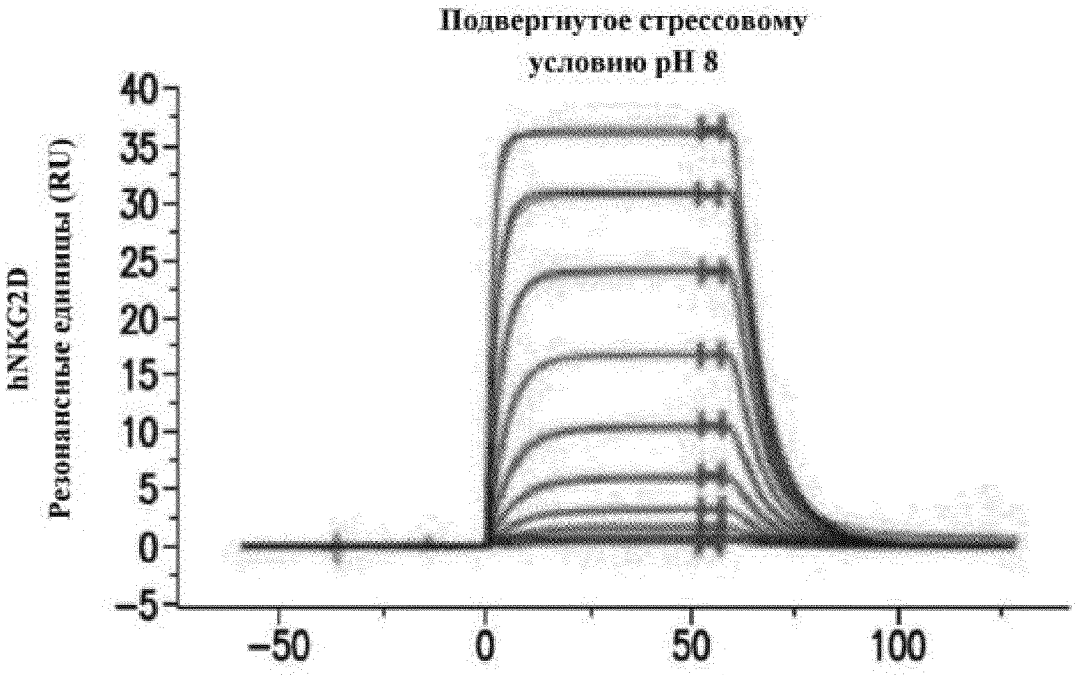



Группа 19
hCLEC12A-His; AB0089, pH 8, 40C, 2 недели; модель с двумя состояниями

ФИГ. 175А

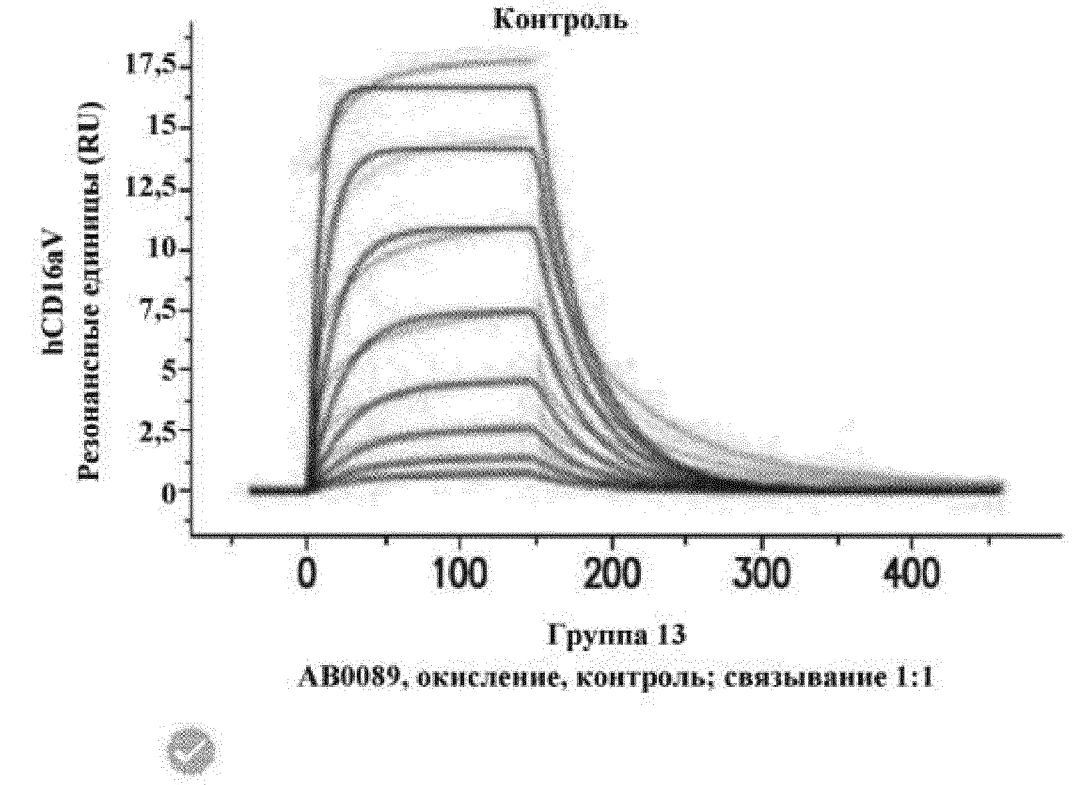



Группа 13
AB0089, окисление, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

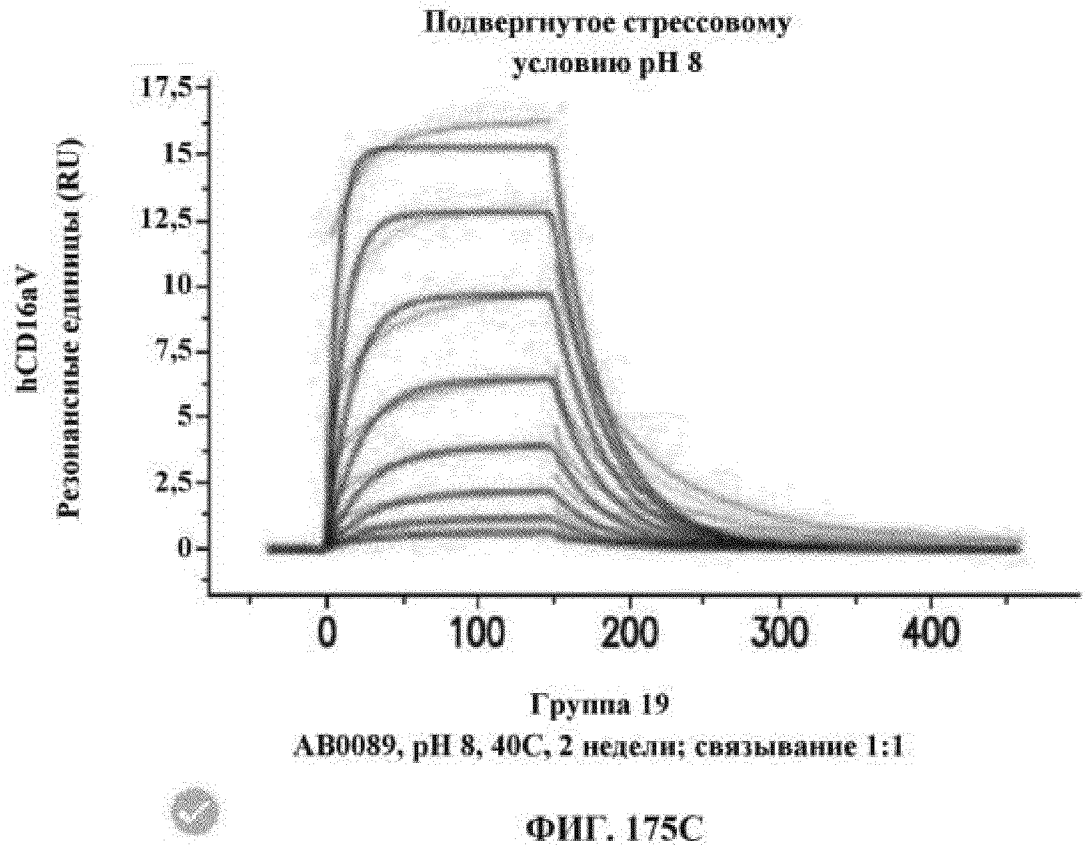



Группа 18
AB0089, pH 8, 2 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 175B



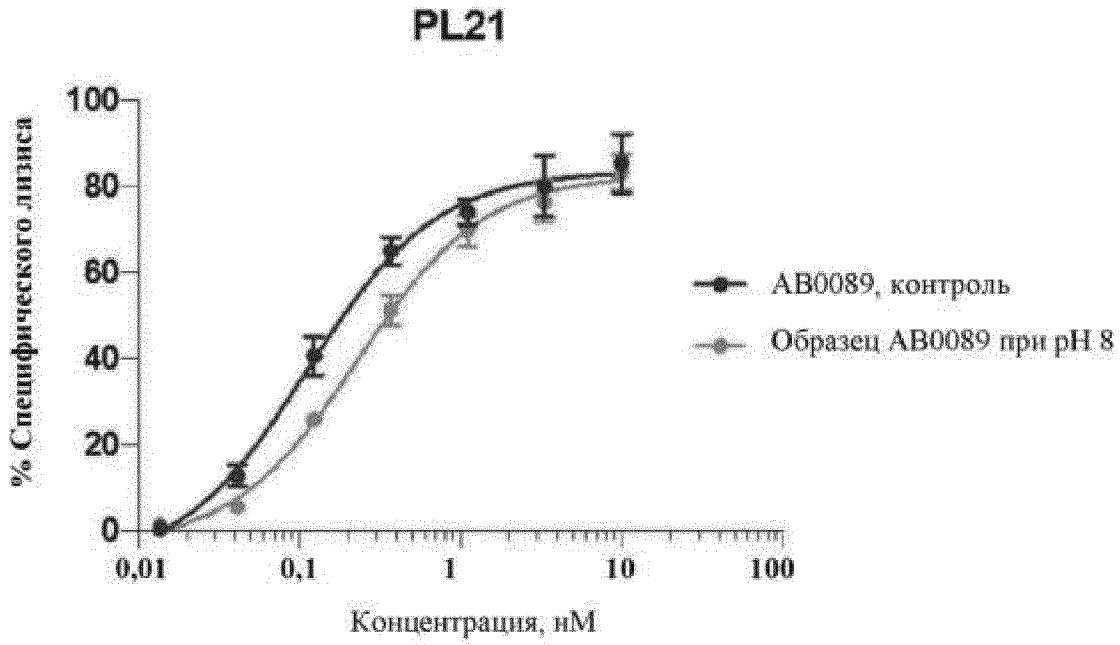

Группа 13
AB0089, окисление, контроль; связывание 1:1

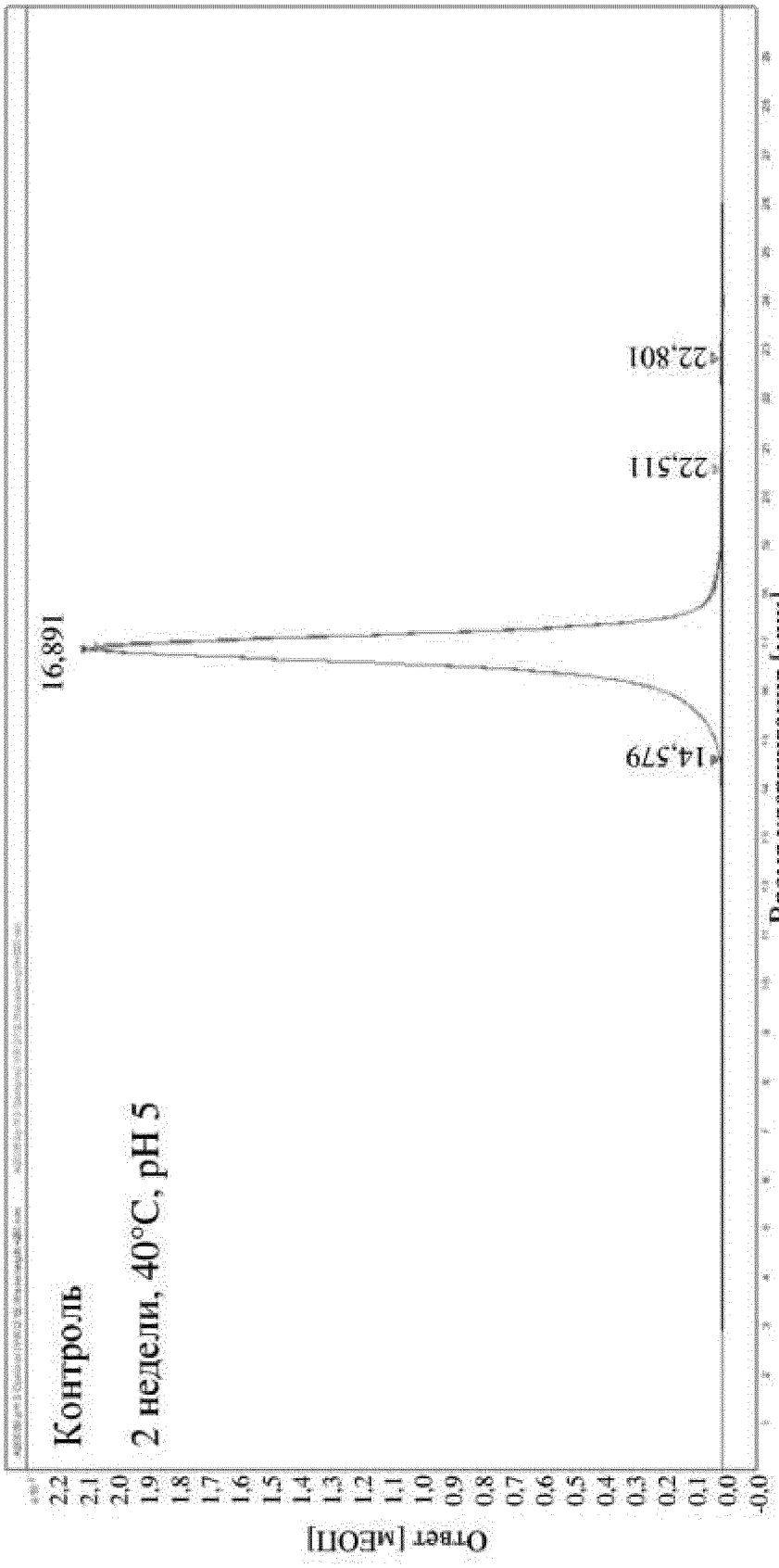



Группа 19
AB0089, pH 8, 40C, 2 недели; связывание 1:1

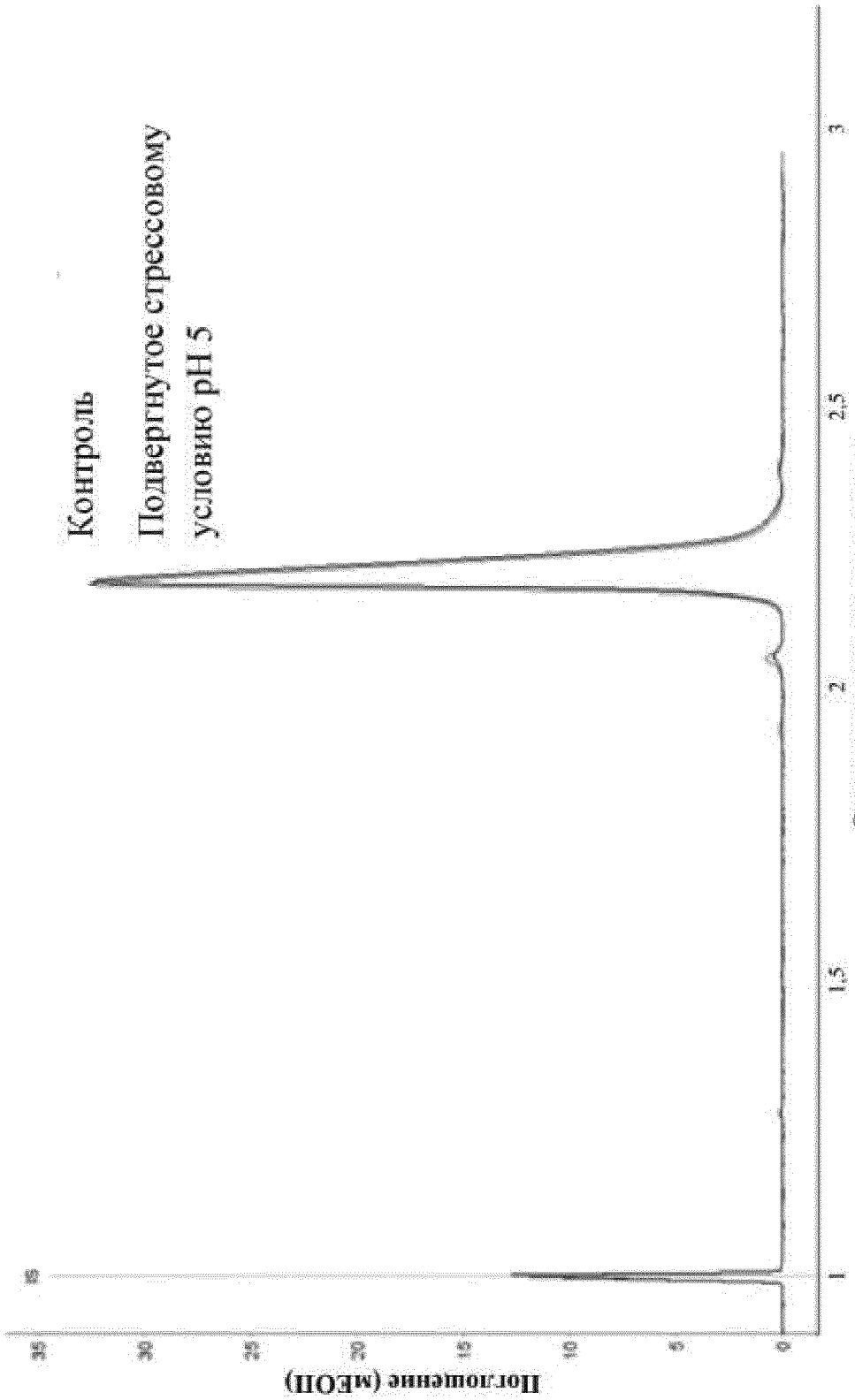
ФИГ. 175C

ФИГ. 176

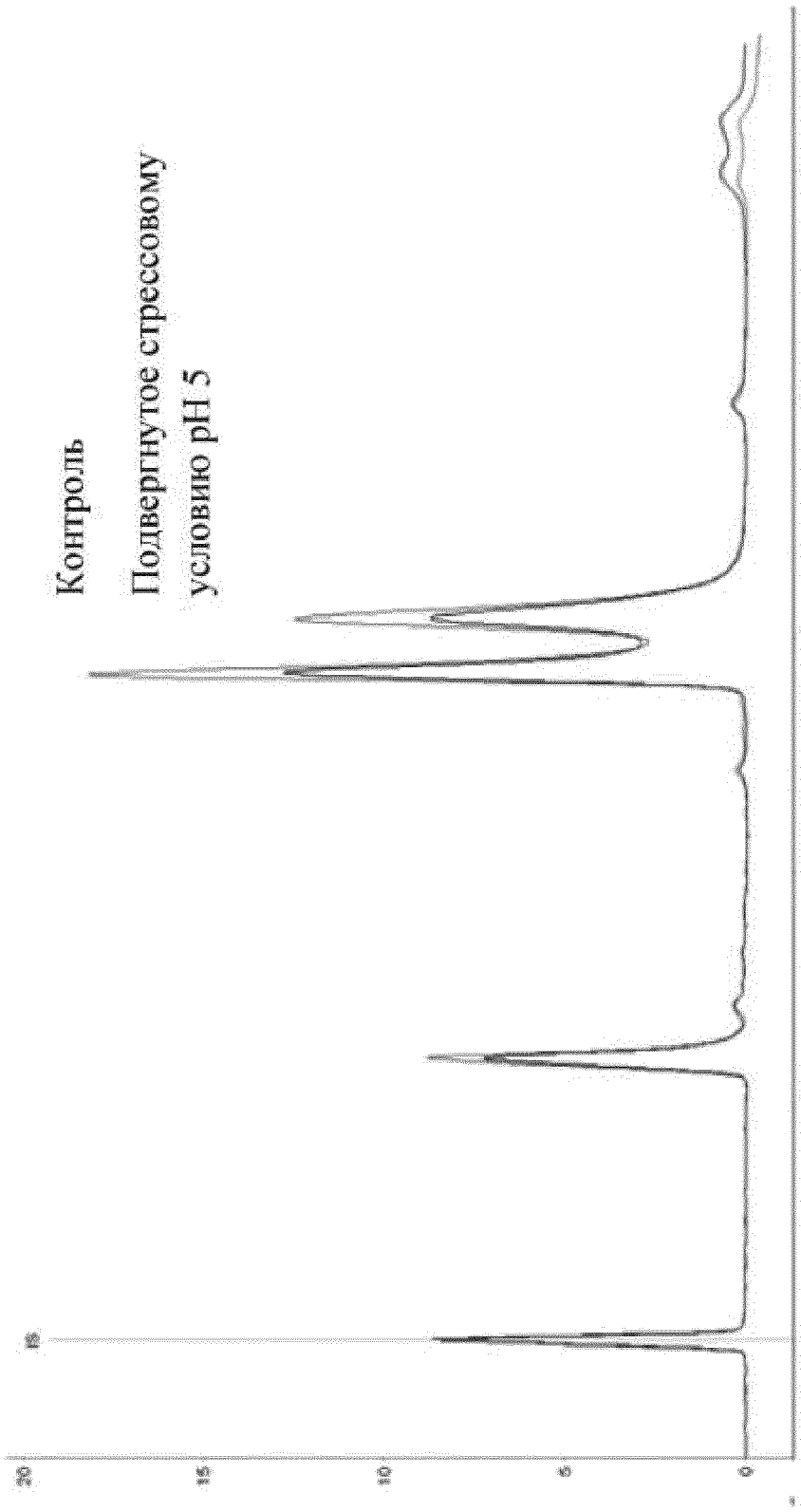

PL21
% Специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0089, контроль
Образец AB0089 при pH 8


Контроль
2 недели, 40°C, pH 5
16,891
14,579
22,511
22,801
Ответ [мЕОП]
Время удерживания [мин]

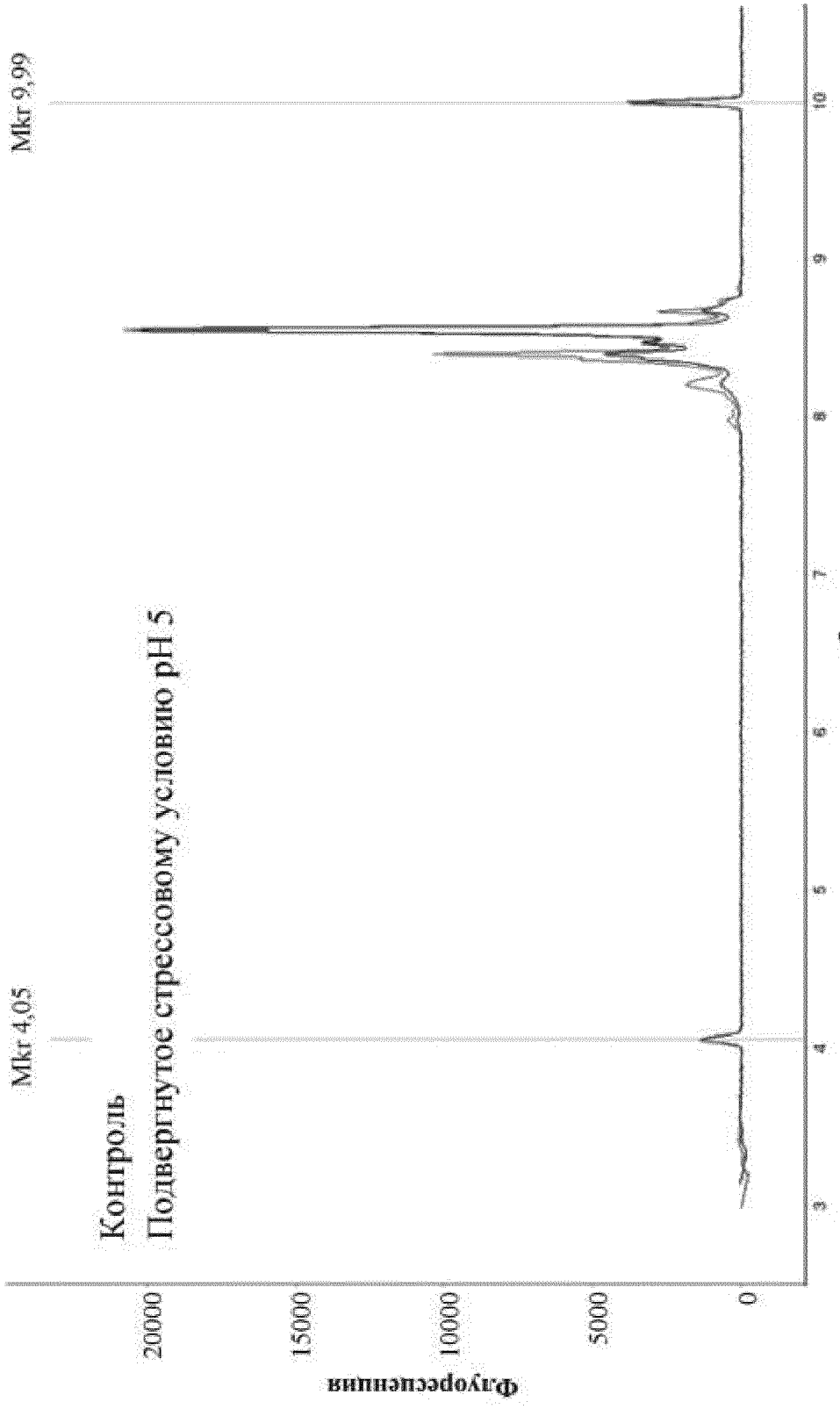
ФИГ. 177


Контроль
Подвергнутое стрессовому условию pH 5
Поглощение (mEOП)
Относительное время миграции
1
1,5
2
2,5
3

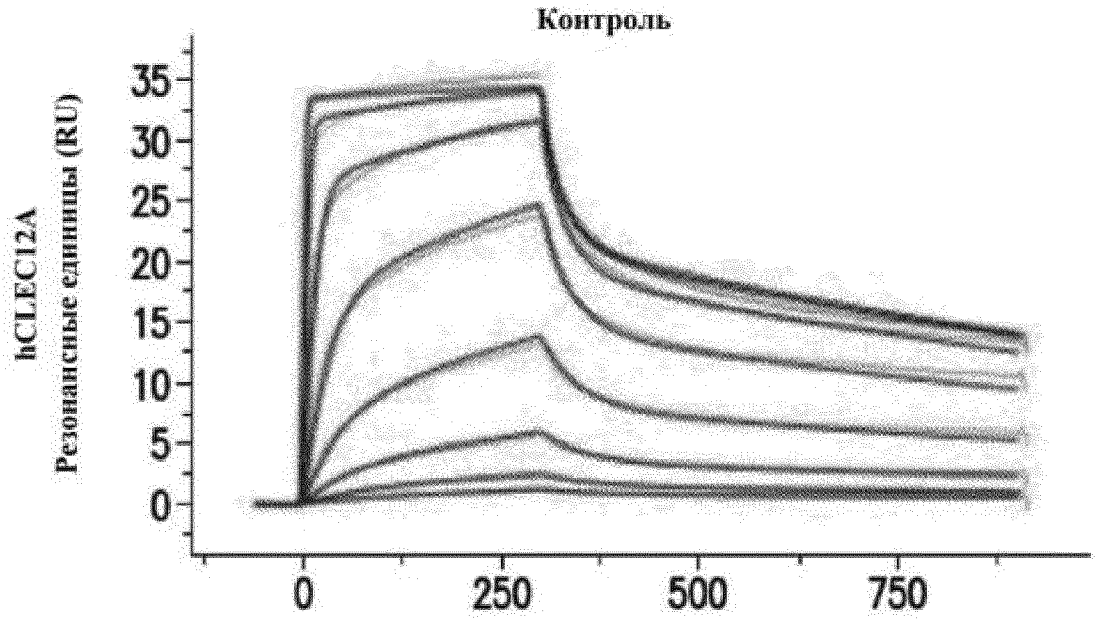
ФИГ. 178



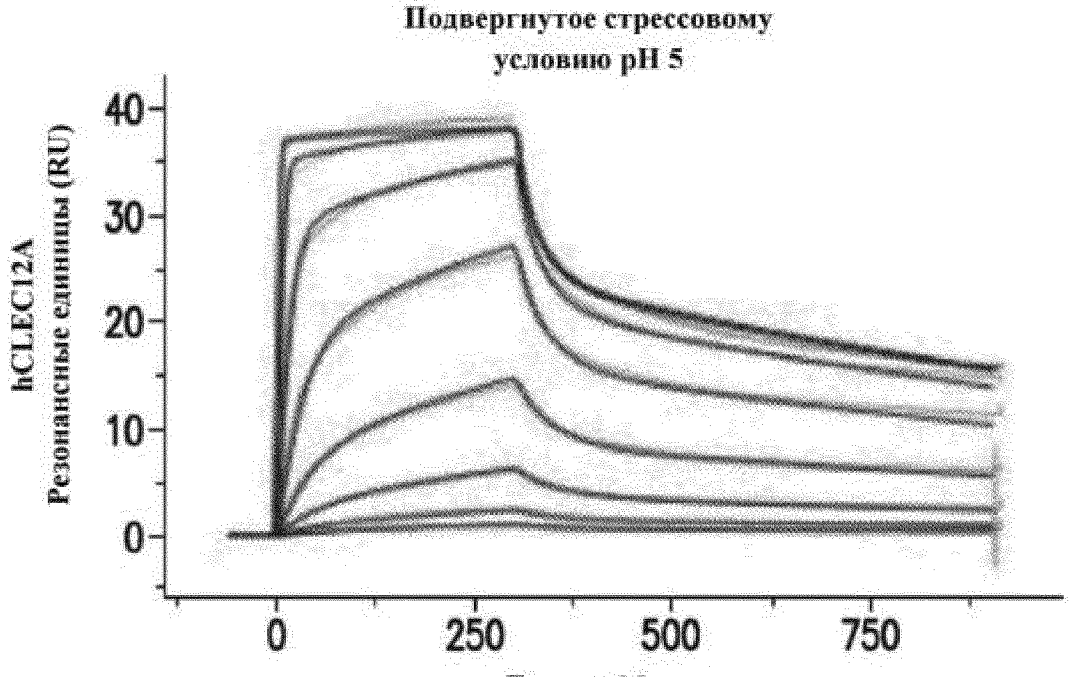

ФИГ. 178 продолжение


Mkr 9,99
Mkr 4,05
Контроль
Подвергнутое стрессовому условию pH 5
Флуоресценция
20000
15000
10000
5000
0
3
4
5
6
7
8
9
10
pI

ФИГ. 179

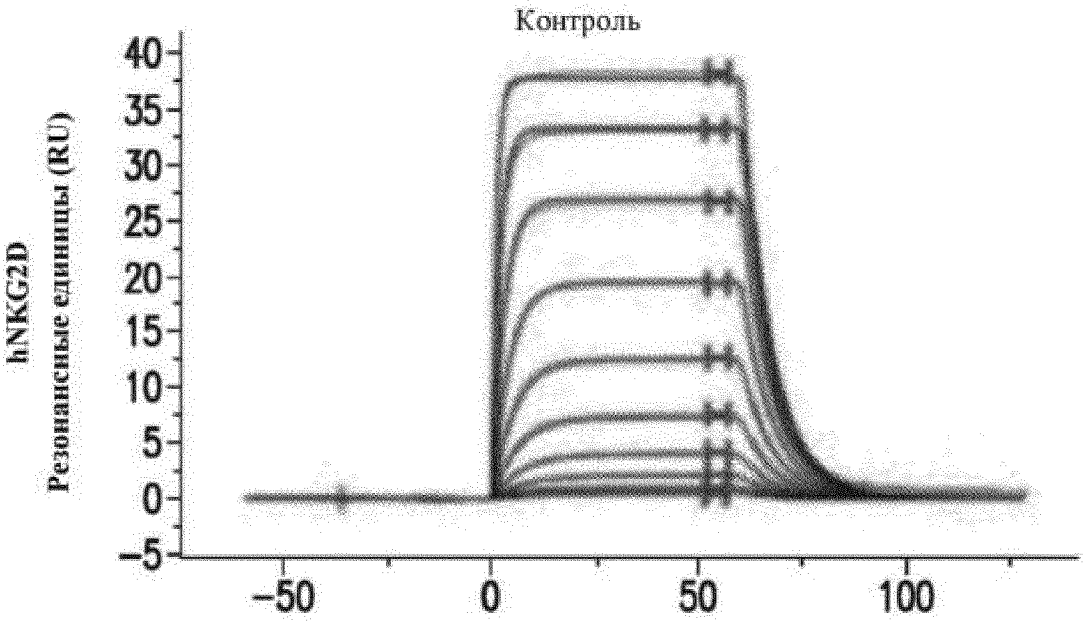



Группа 13
hCLEC12A-His; AB0089, окисление, контроль; модель с двумя состояниями



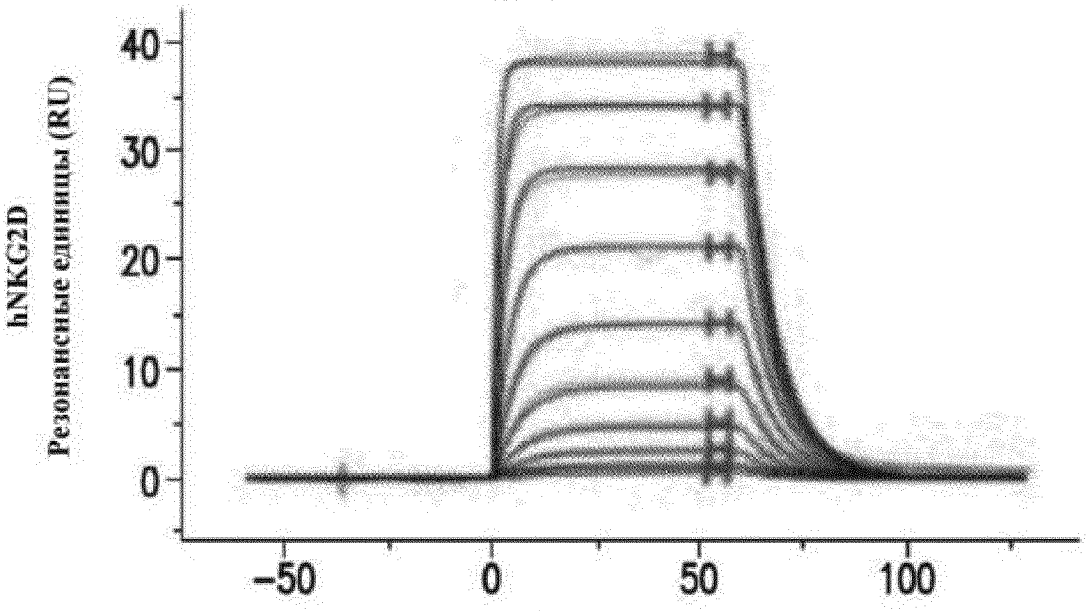

Группа 16
hCLEC12A-His; AB0089, pH 5, 40C, 2 недели; модель с двумя состояниями

ФИГ. 180



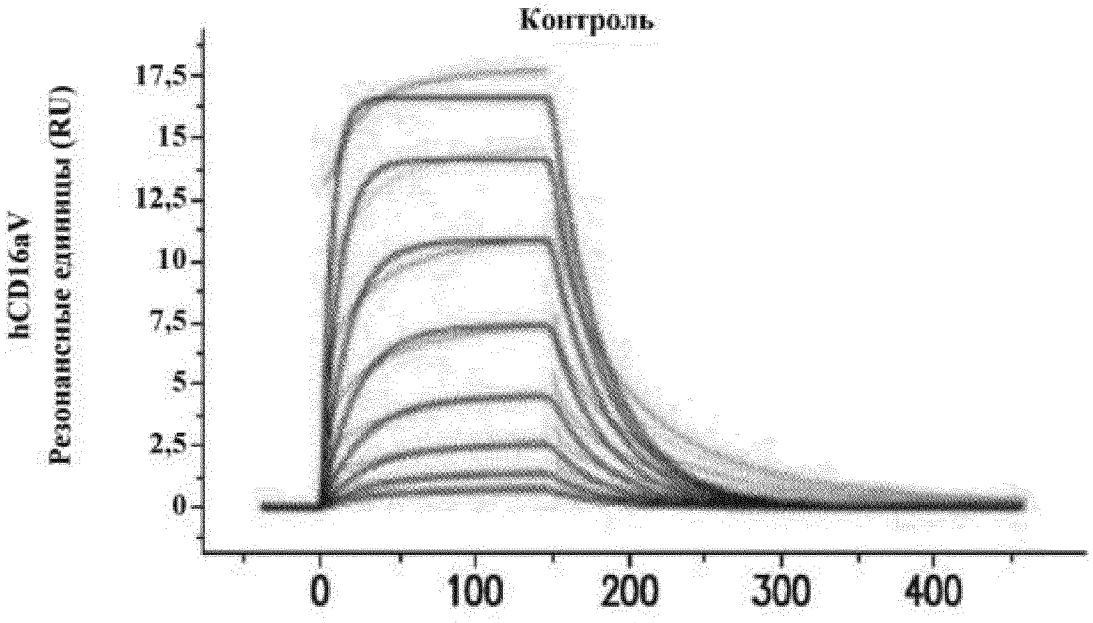

**Группа 13**
**AB0089, окисление, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1**

**Подвергнутое стрессовому условию pH 5**

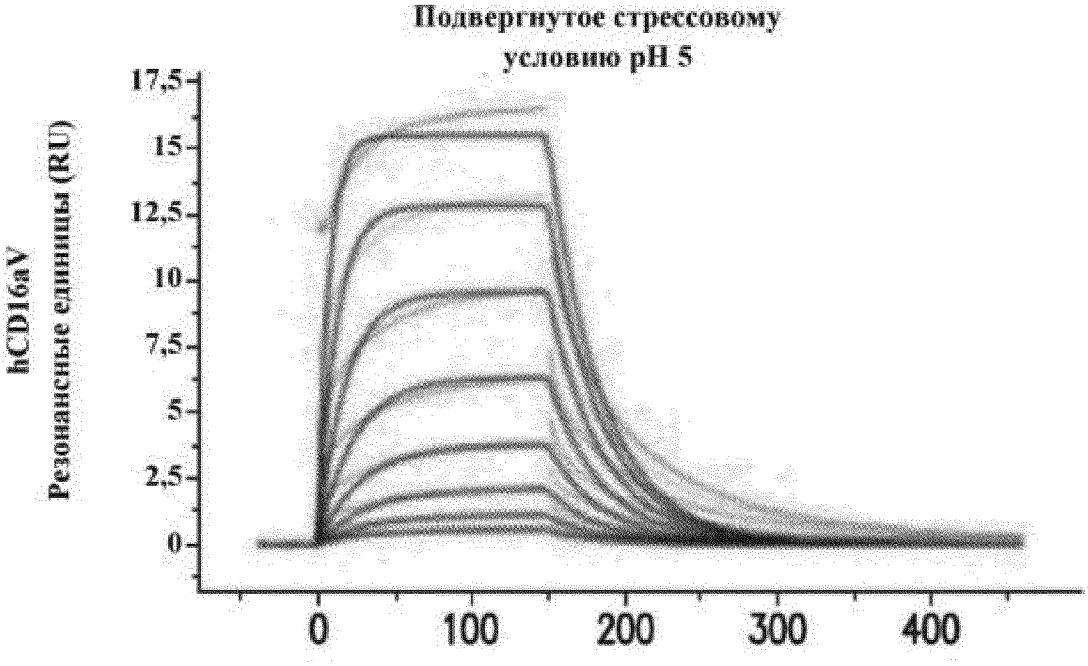



**Группа 16**
**AB0089, pH 5, 2 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1**

**ФИГ. 180 продолжение**



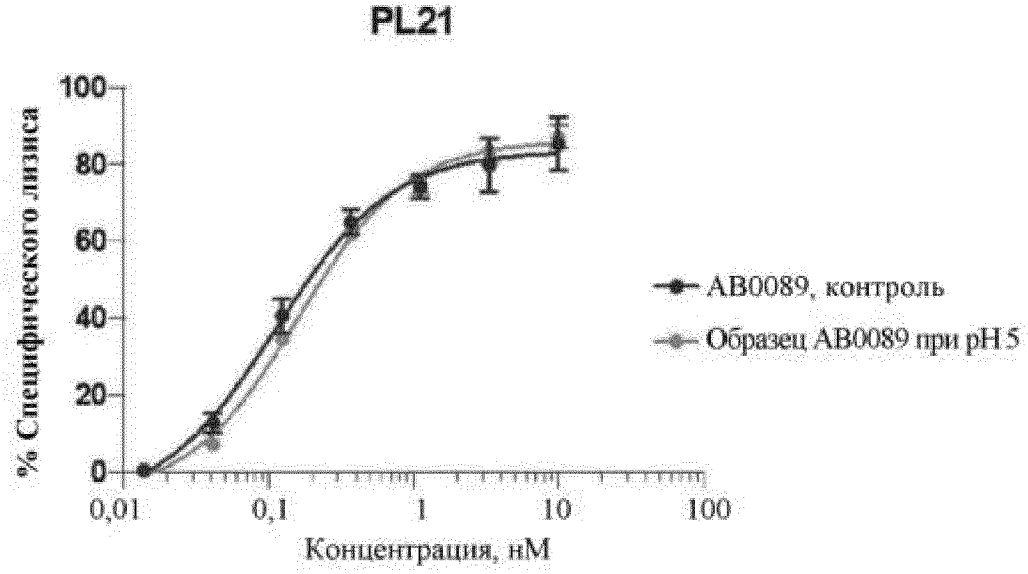

Группа 13
AB0089, окисление, контроль; связывание 1:1

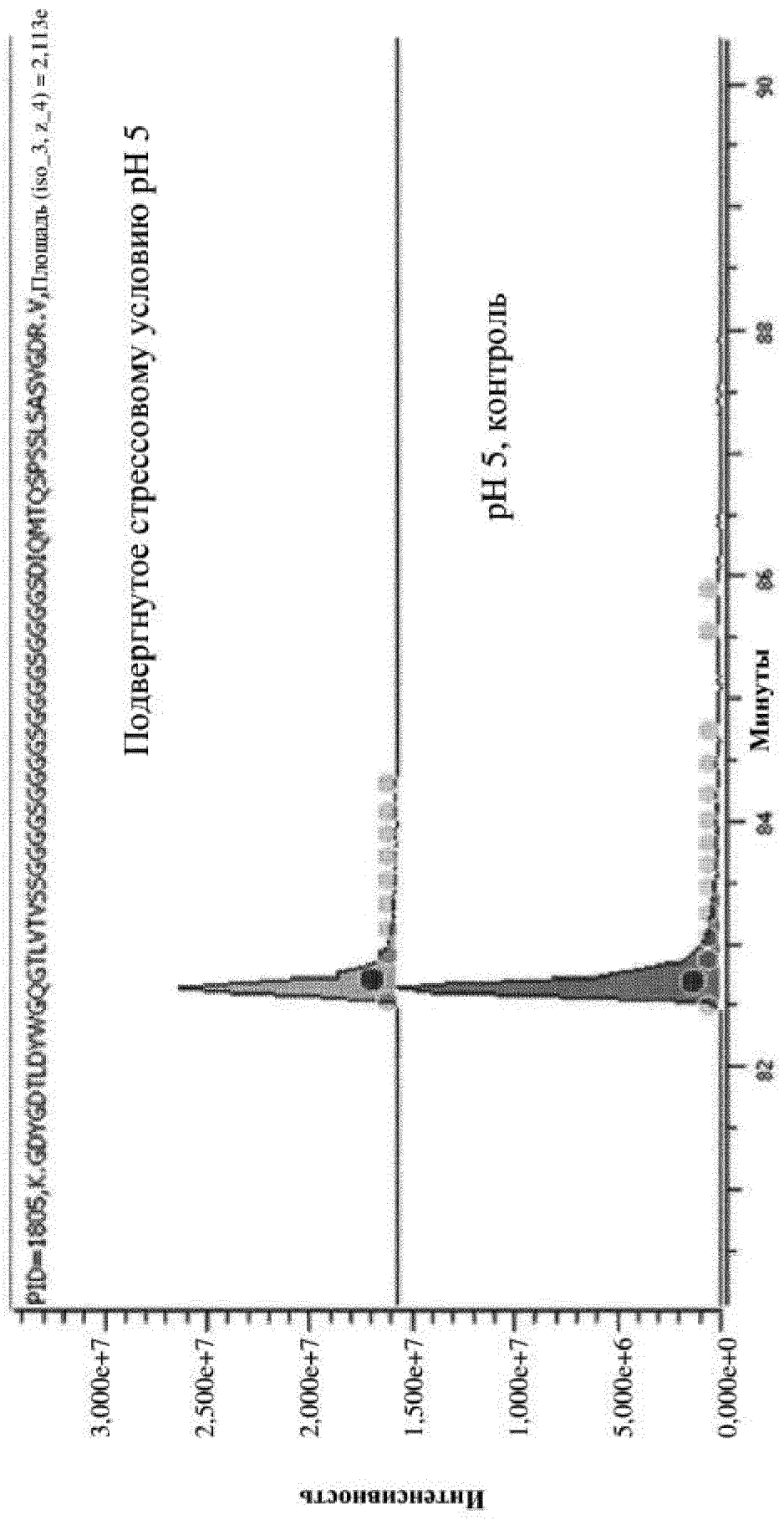



Группа 16
AB0089, pH 5, 40C, 2 недели; связывание 1:1

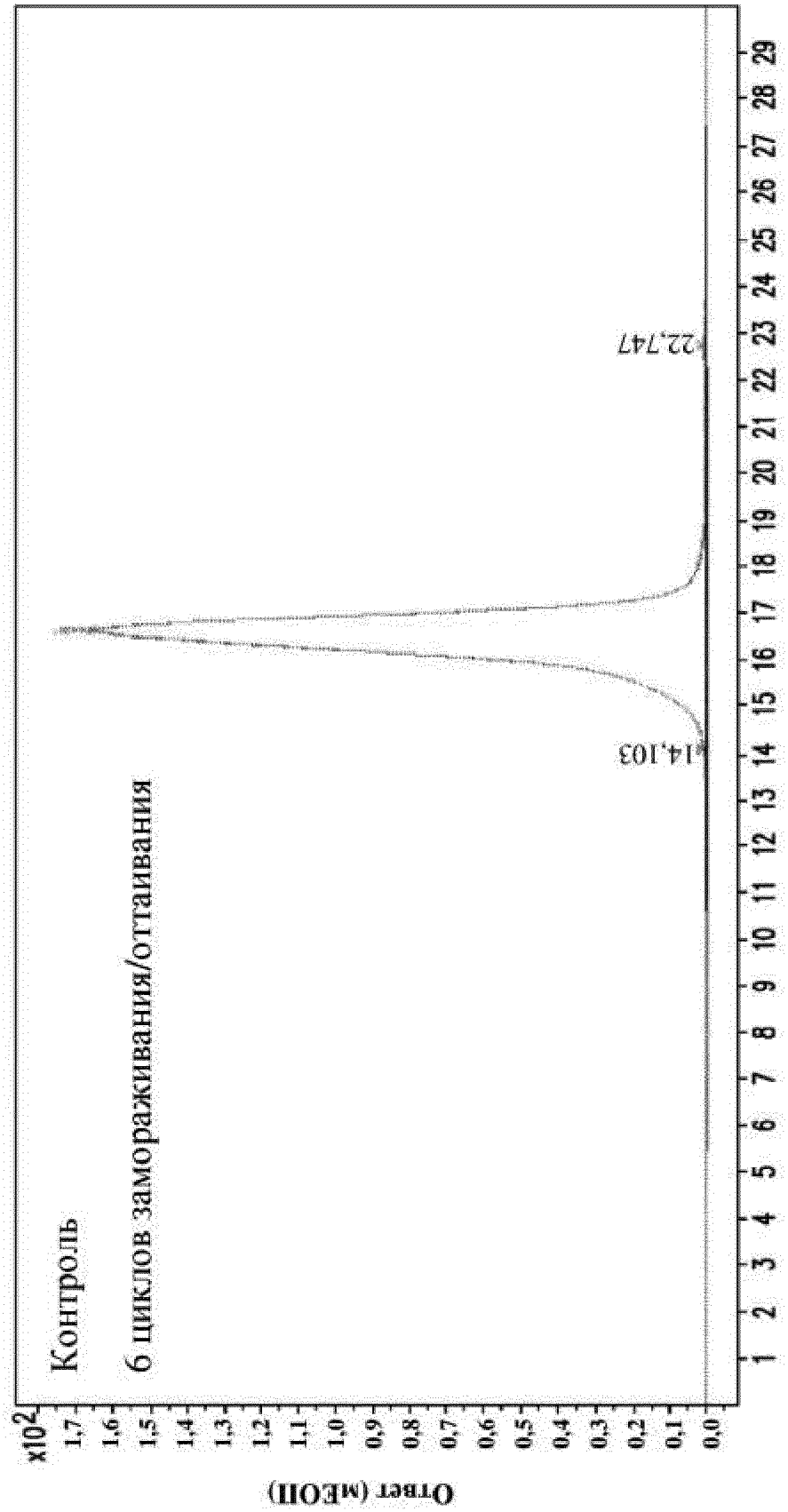
ФИГ. 180 продолжение

ФИГ. 181

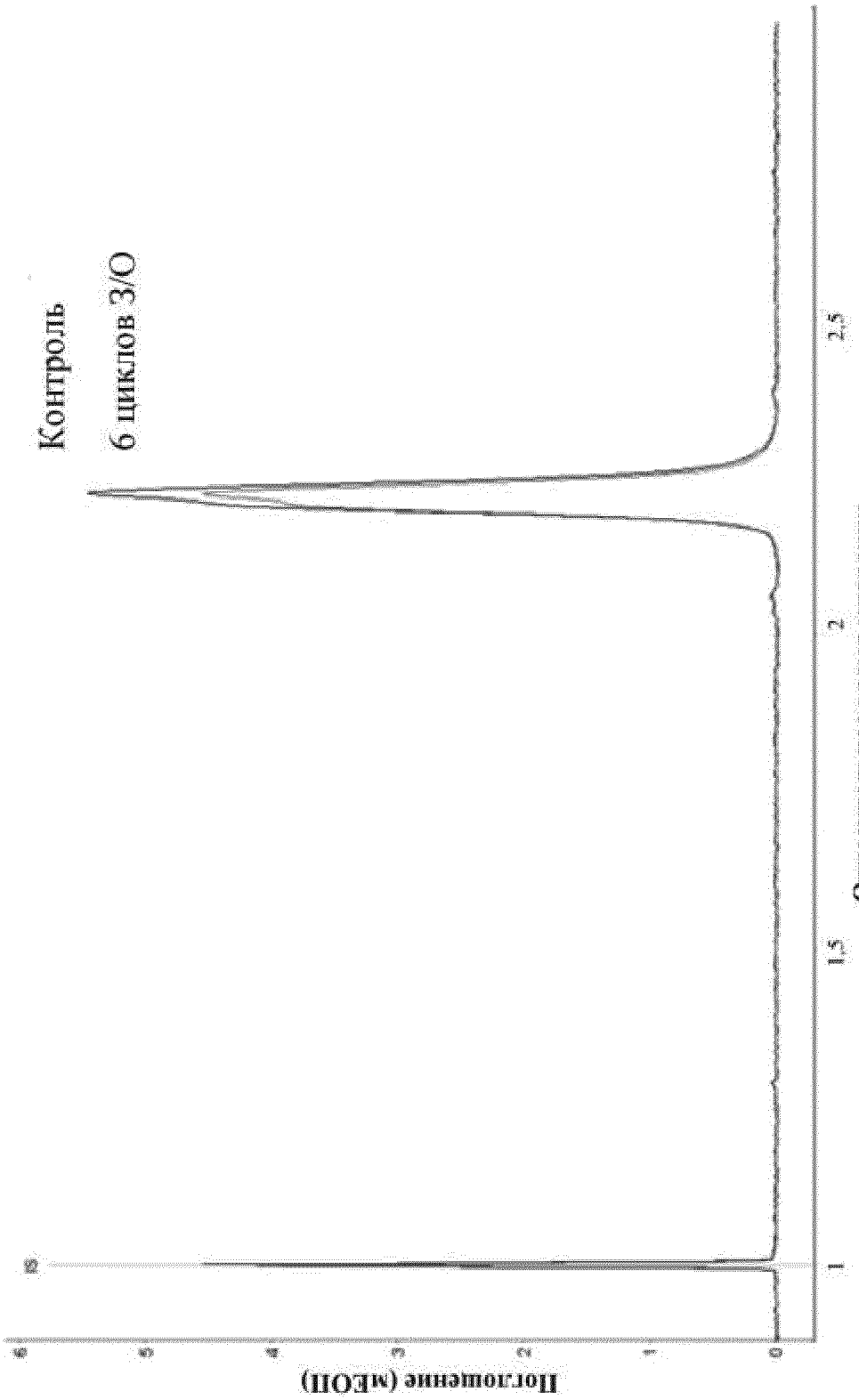

PL21
% Специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0089, контроль
Образец AB0089 при pH 5


PID=1805,K.GDYGDTLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR.Y,Площадь (iso_3, z_4) = 2,113e
Подвергнутое стрессовому условию pH 5
pH 5, контроль
Интенсивность
3,000e+7
2,500e+7
2,000e+7
1,500e+7
1,000e+7
5,000e+6
0,000e+0
82
84
86
88
90
Минуты

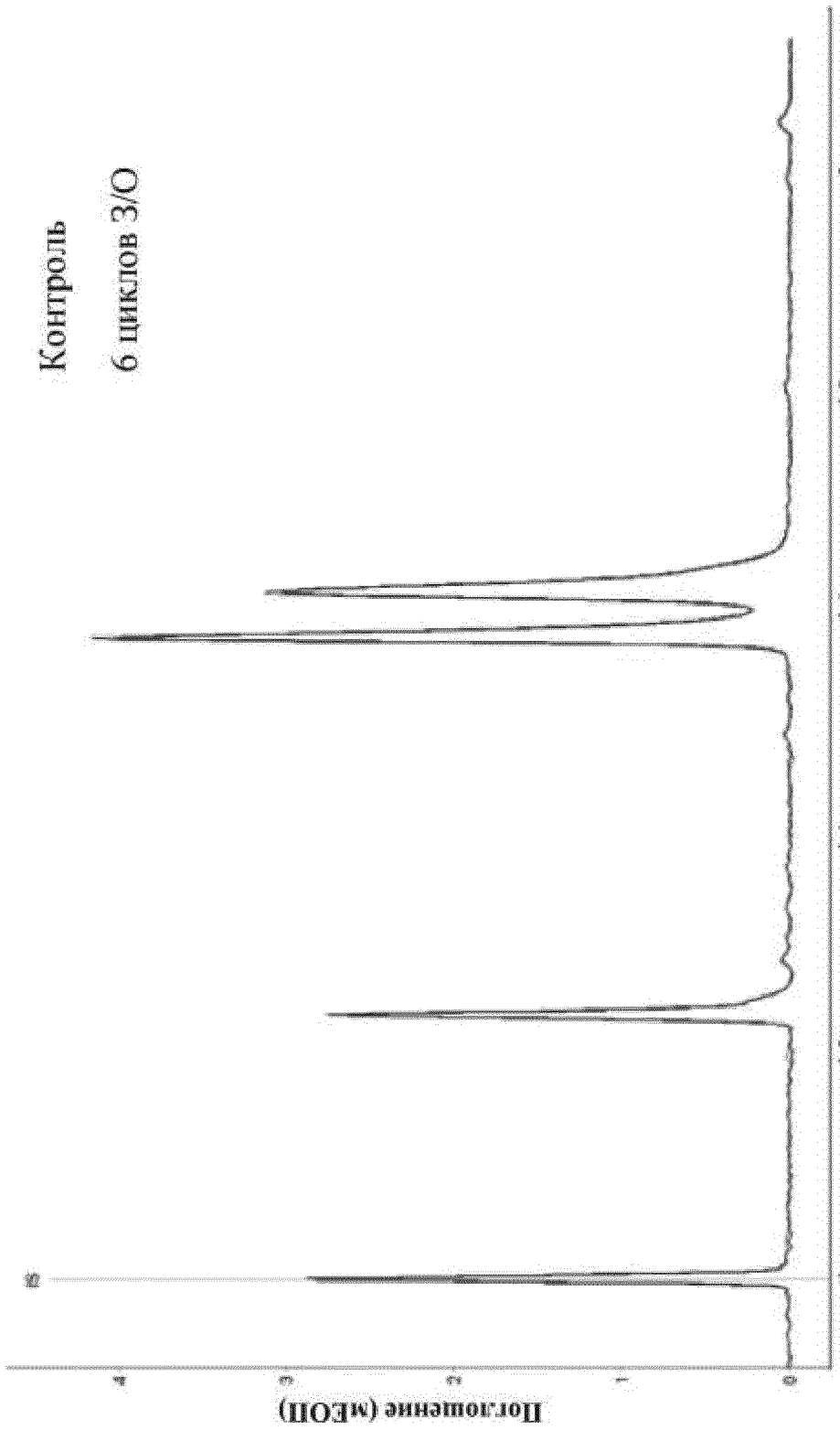
ФИГ. 182


Контроль
6 циклов замораживания/оттаивания
14,103
22,747
Ответ (mEOU)
x10^2
1,7
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

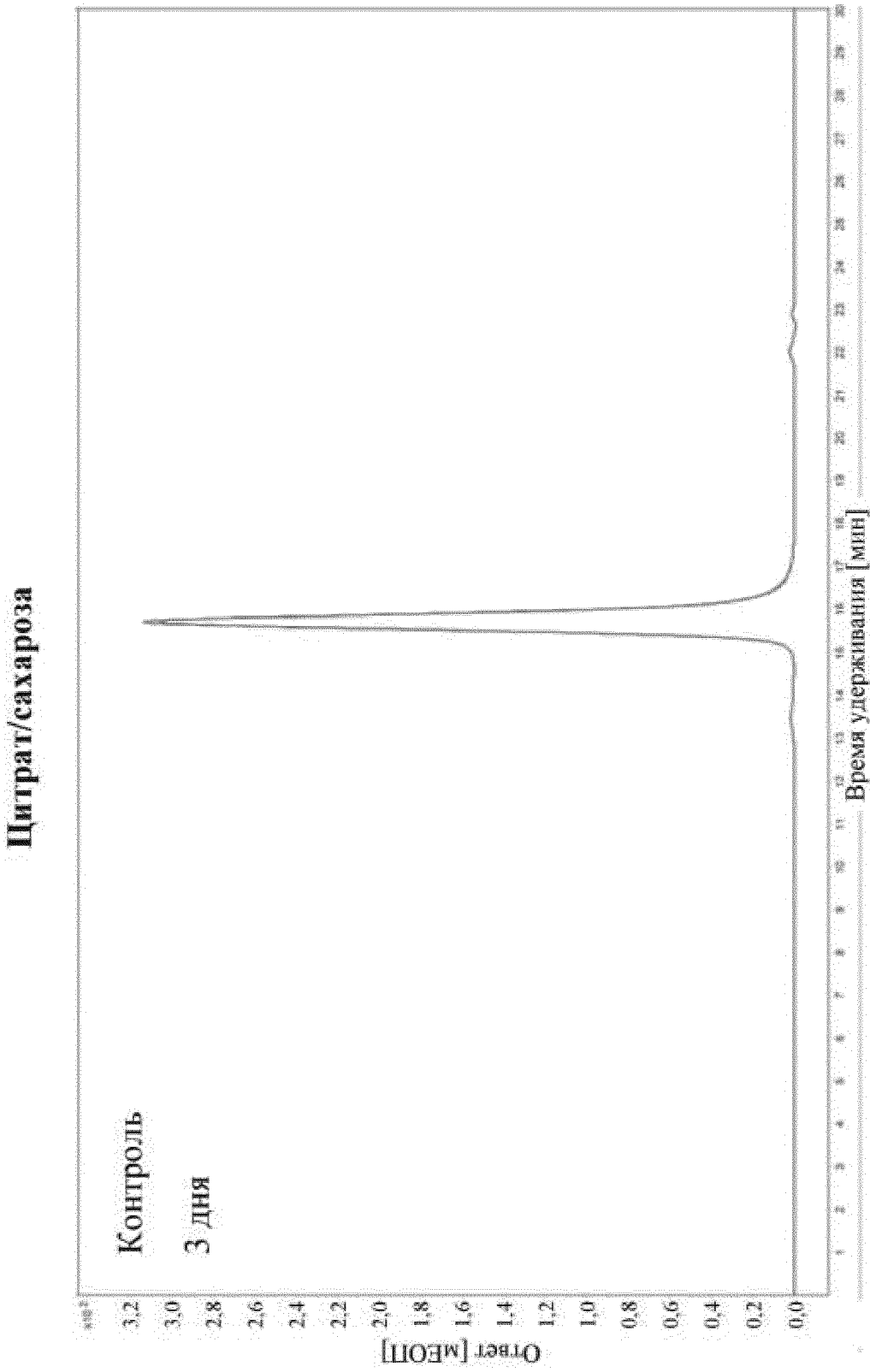
ФИГ. 183


Контроль
6 циклов З/О
Поглощение (mEOП)
Относительное время миграции
1
1,5
2
2,5

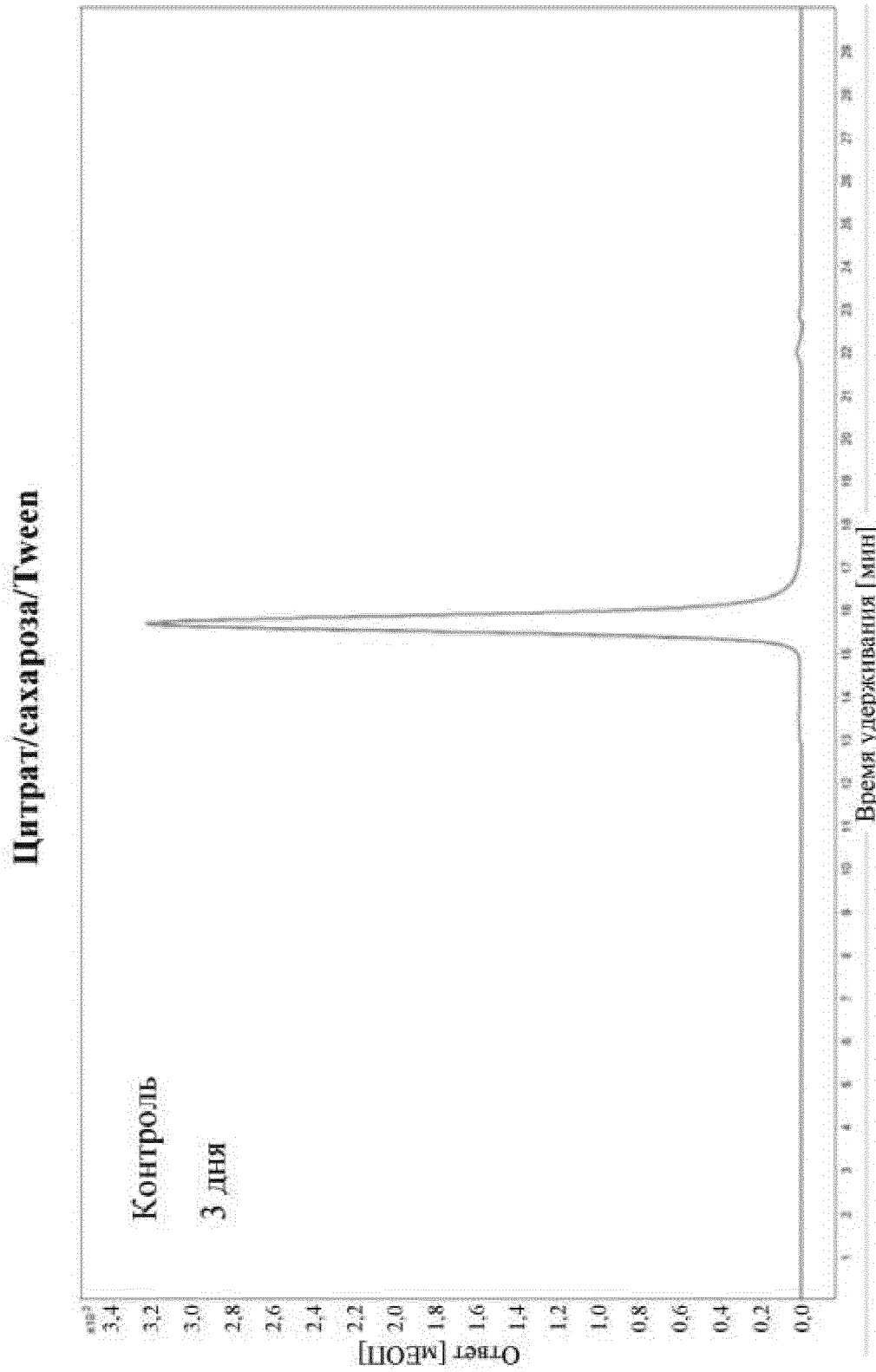
ФИГ. 184




ФИГ. 184 продолжение

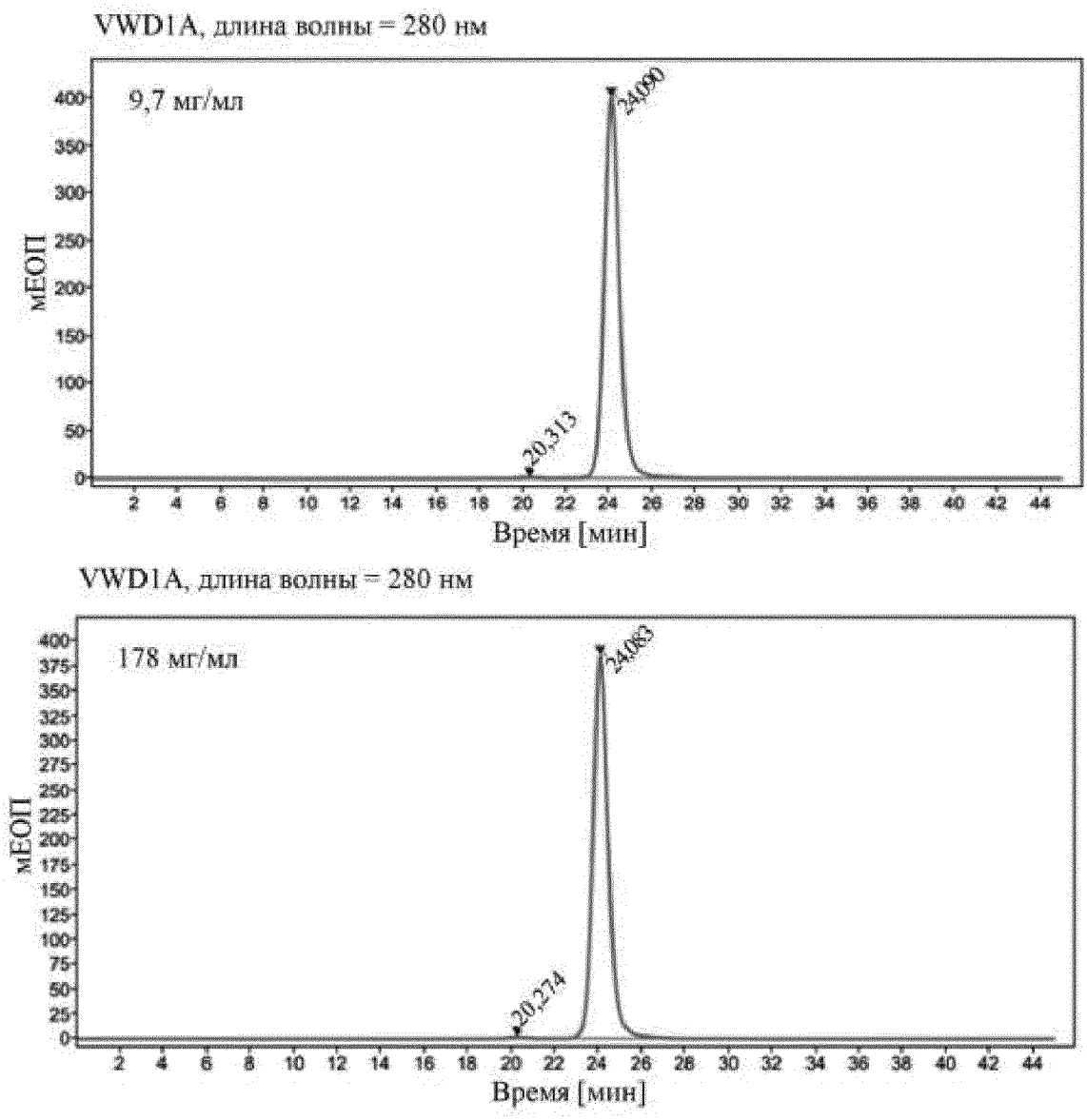

Цитрат/сахароза
Контроль
3 дня
Ответ [мЕОП]
Время удерживания [мин]

ФИГ. 185

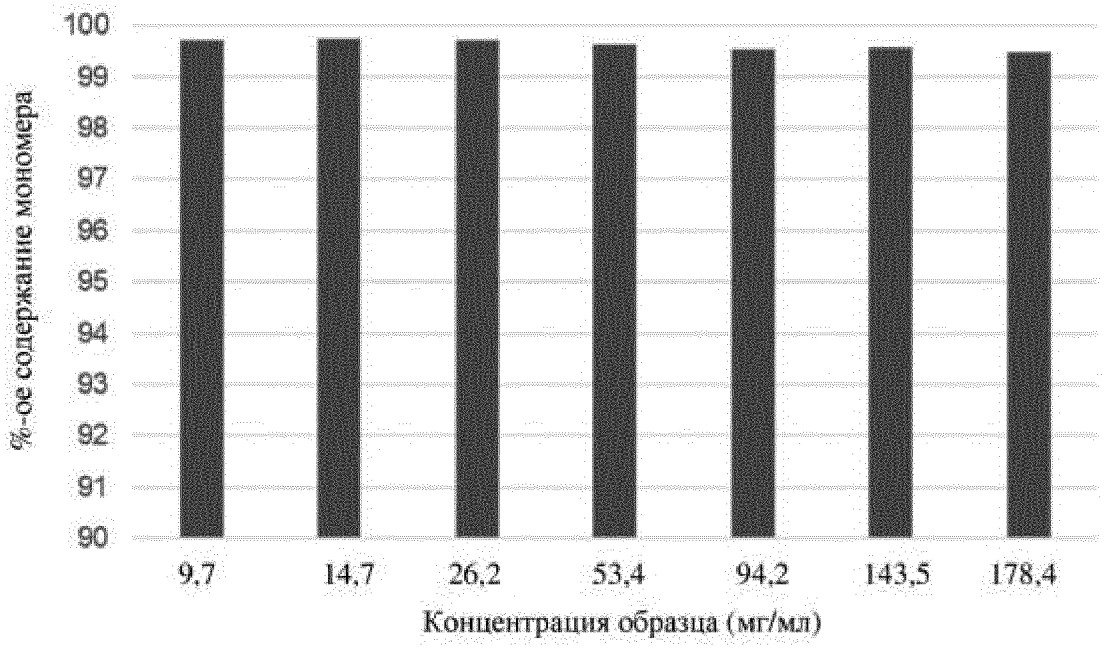



ФИГ. 185 продолжение

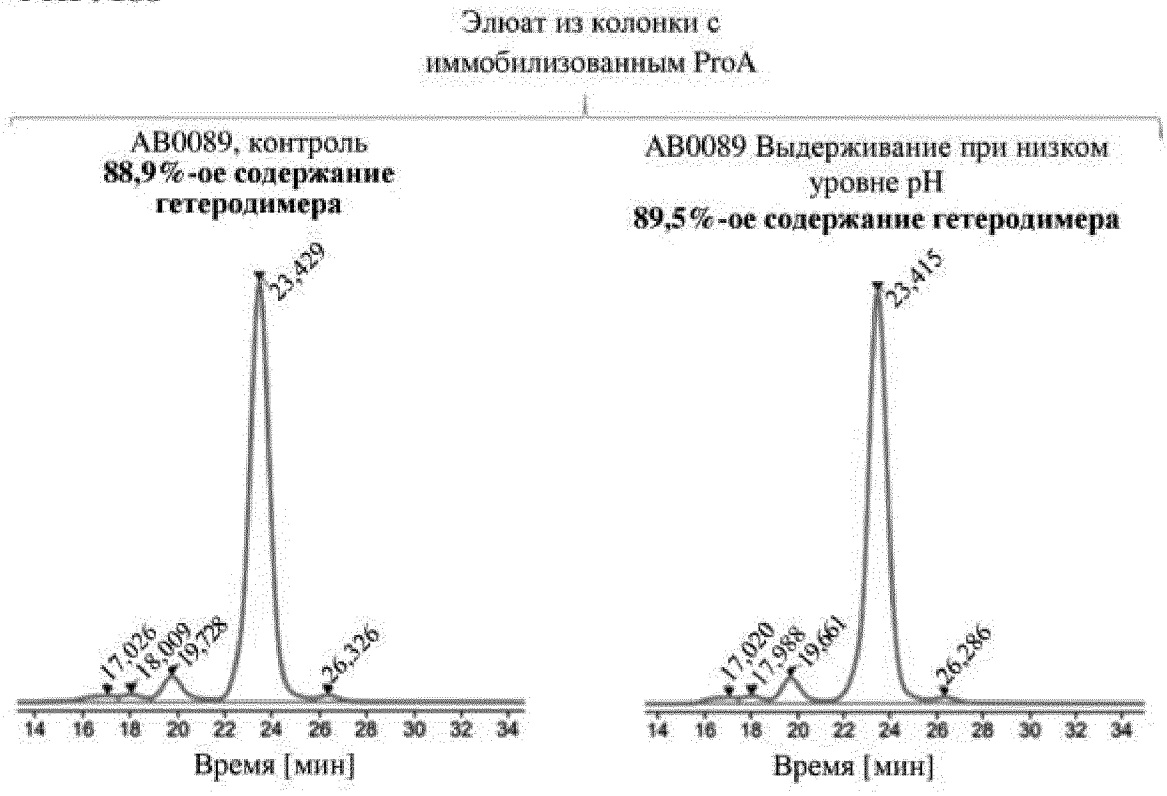
**ФИГ. 186**

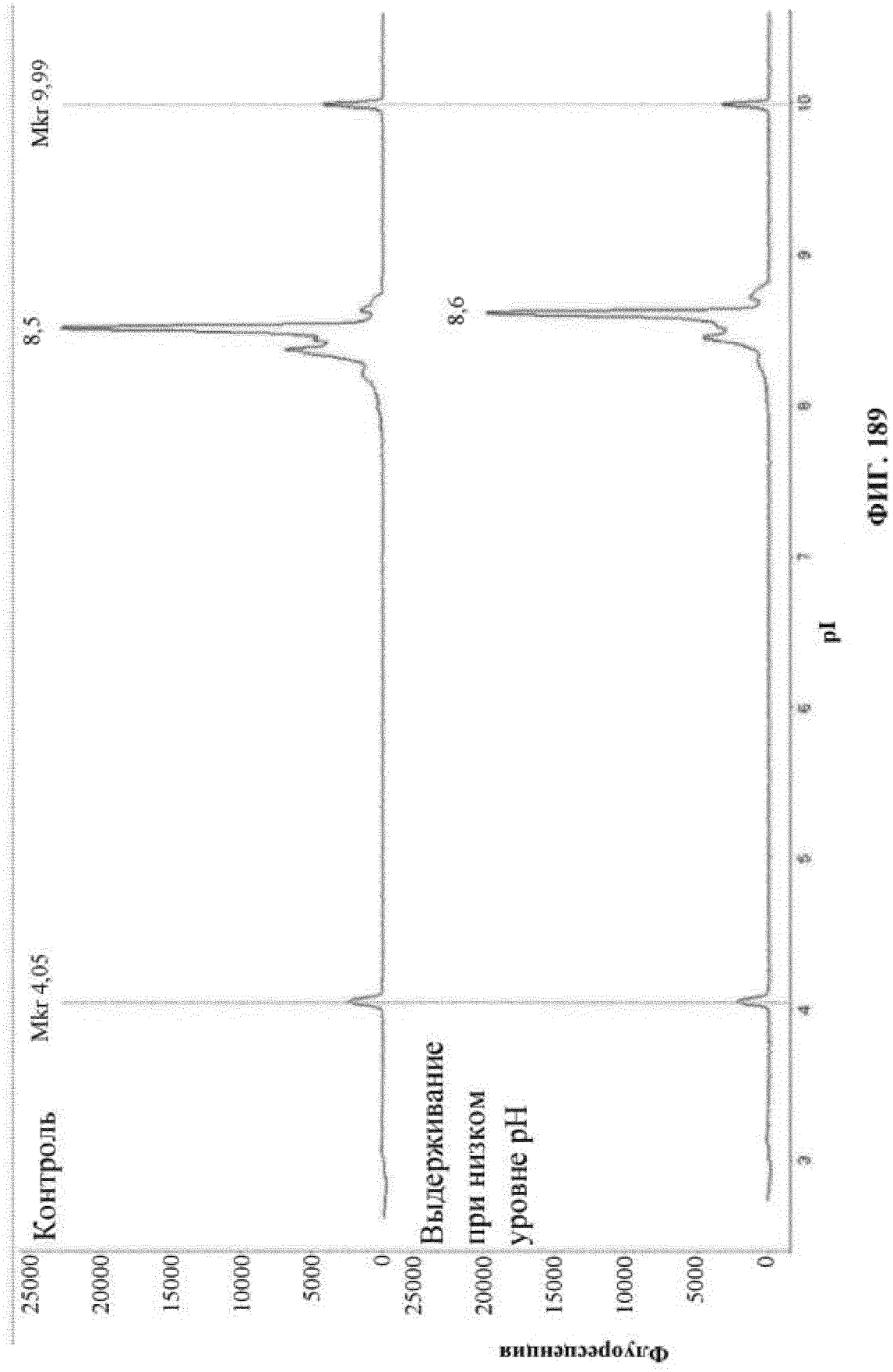

VWD1A, длина волны = 280 нм
9,7 мг/мл
24,090
20,313
мЕОП
Время [мин]
VWD1A, длина волны = 280 нм
178 мг/мл
24,083
20,274
мЕОП
Время [мин]

**ФИГ. 187**

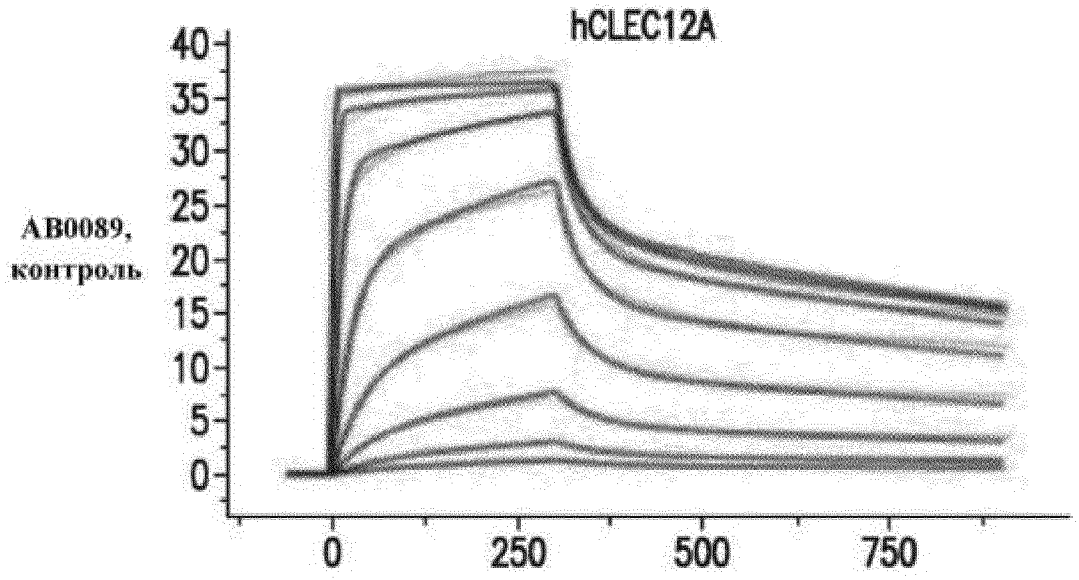



**ФИГ. 188**

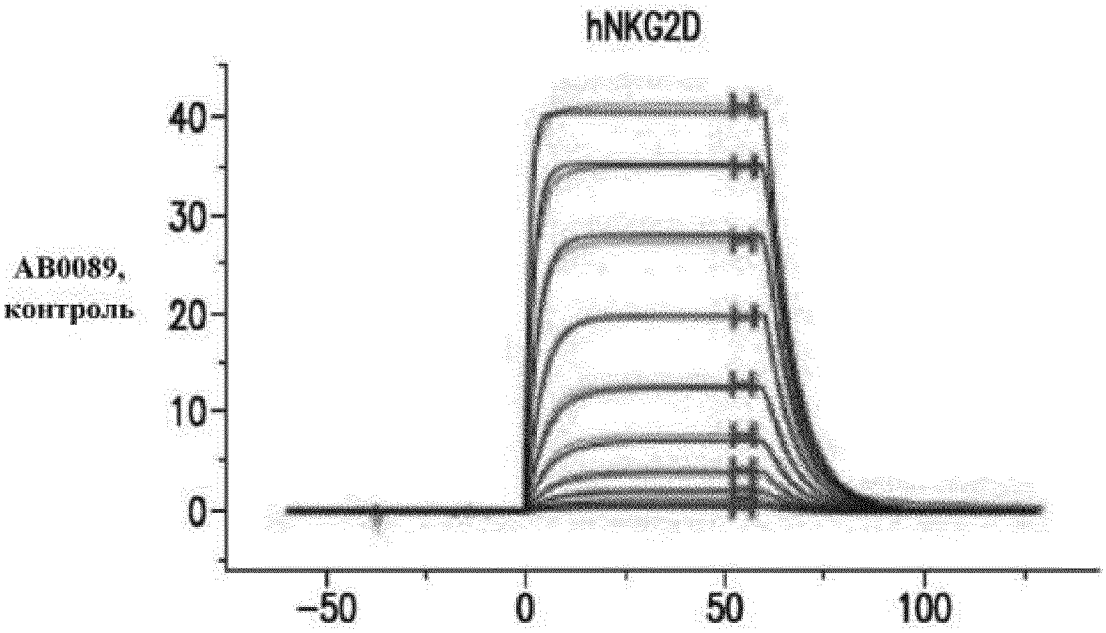



Контроль
Mkr 4,05
Mkr 9,99
8,5
Выдерживание при низком уровне pH
8,6
Флуоресценция
pI
25000
20000
15000
10000
5000
0
3
4
5
6
7
8
9
10

ФИГ. 189

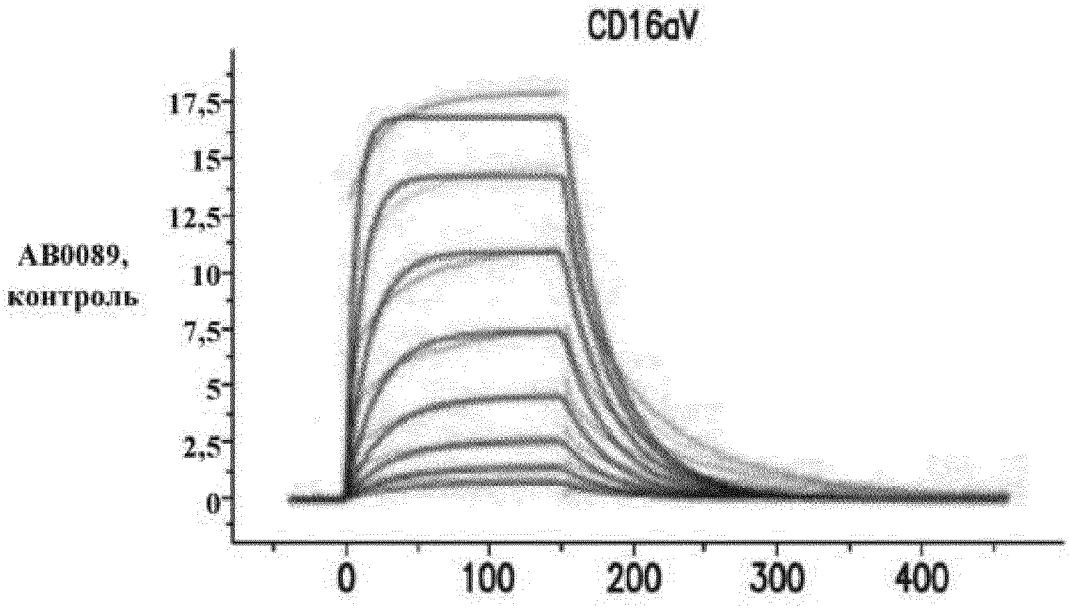



Группа 1
hCLEC12A-His; AB0089-002; модель с двумя состояниями

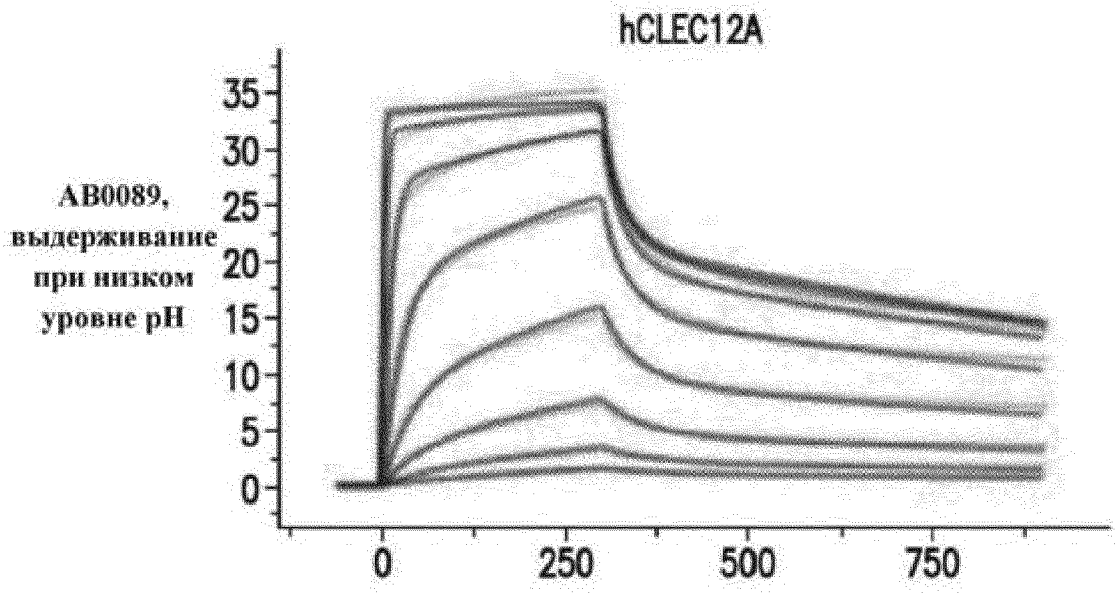



Группа 16
AB0089-002; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 190

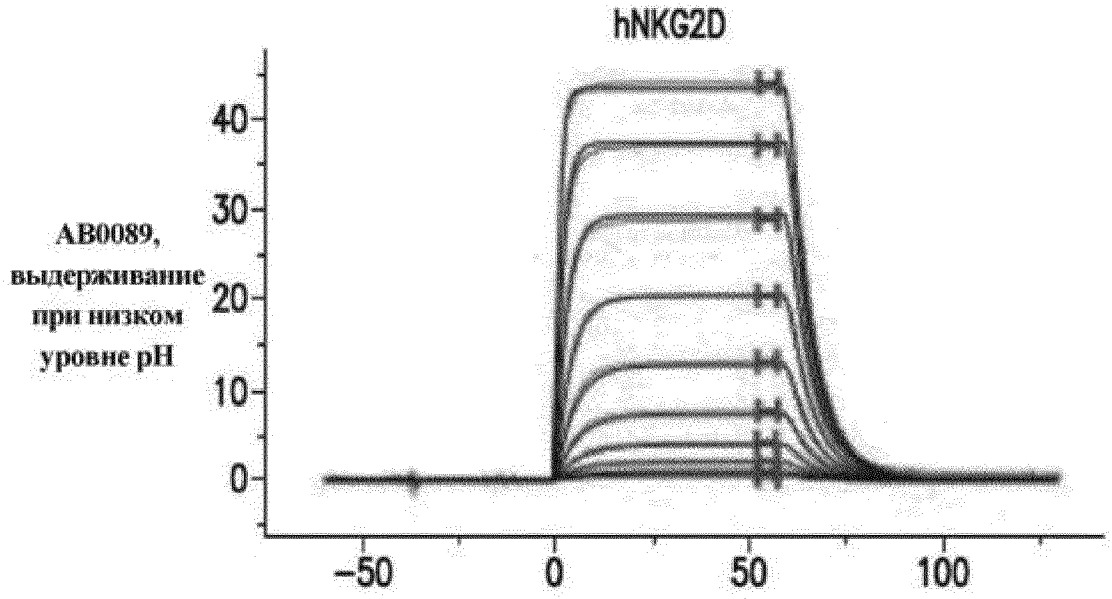



**Группа 1**
**AB0089-002; связывание 1:1**

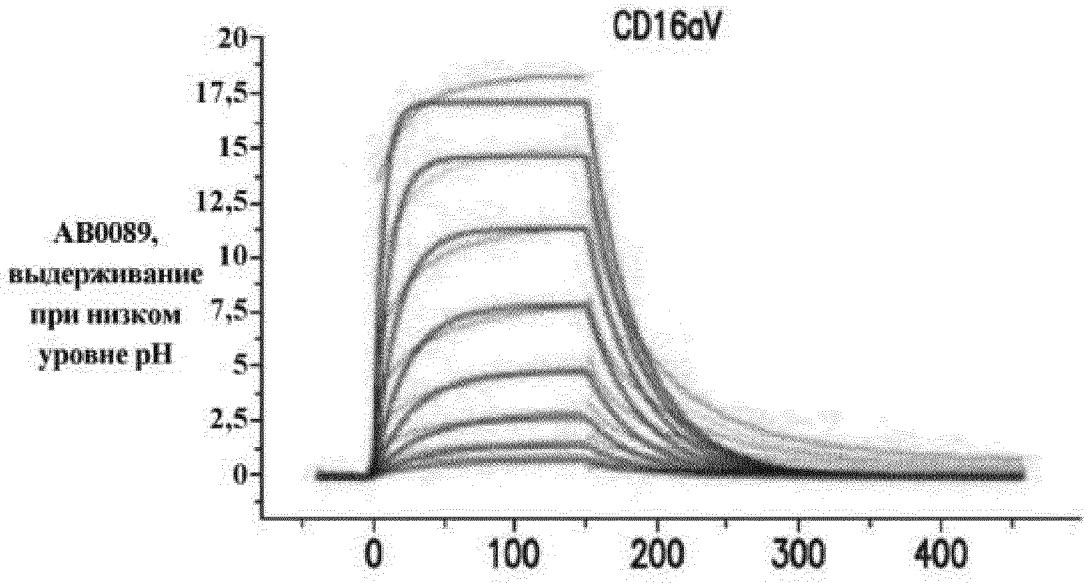



**Группа 5**
**hCLEC12A-His; AB0089-003; модель с двумя состояниями**

**ФИГ. 190 продолжение**



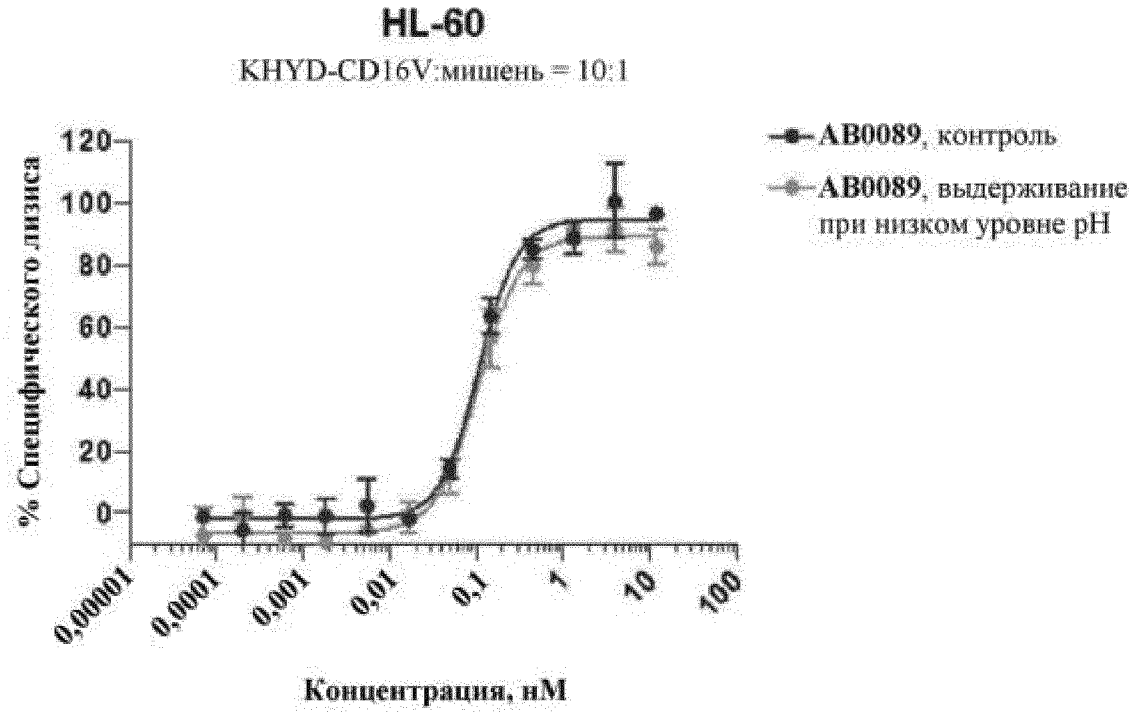

Группа 19
AB0089-003; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

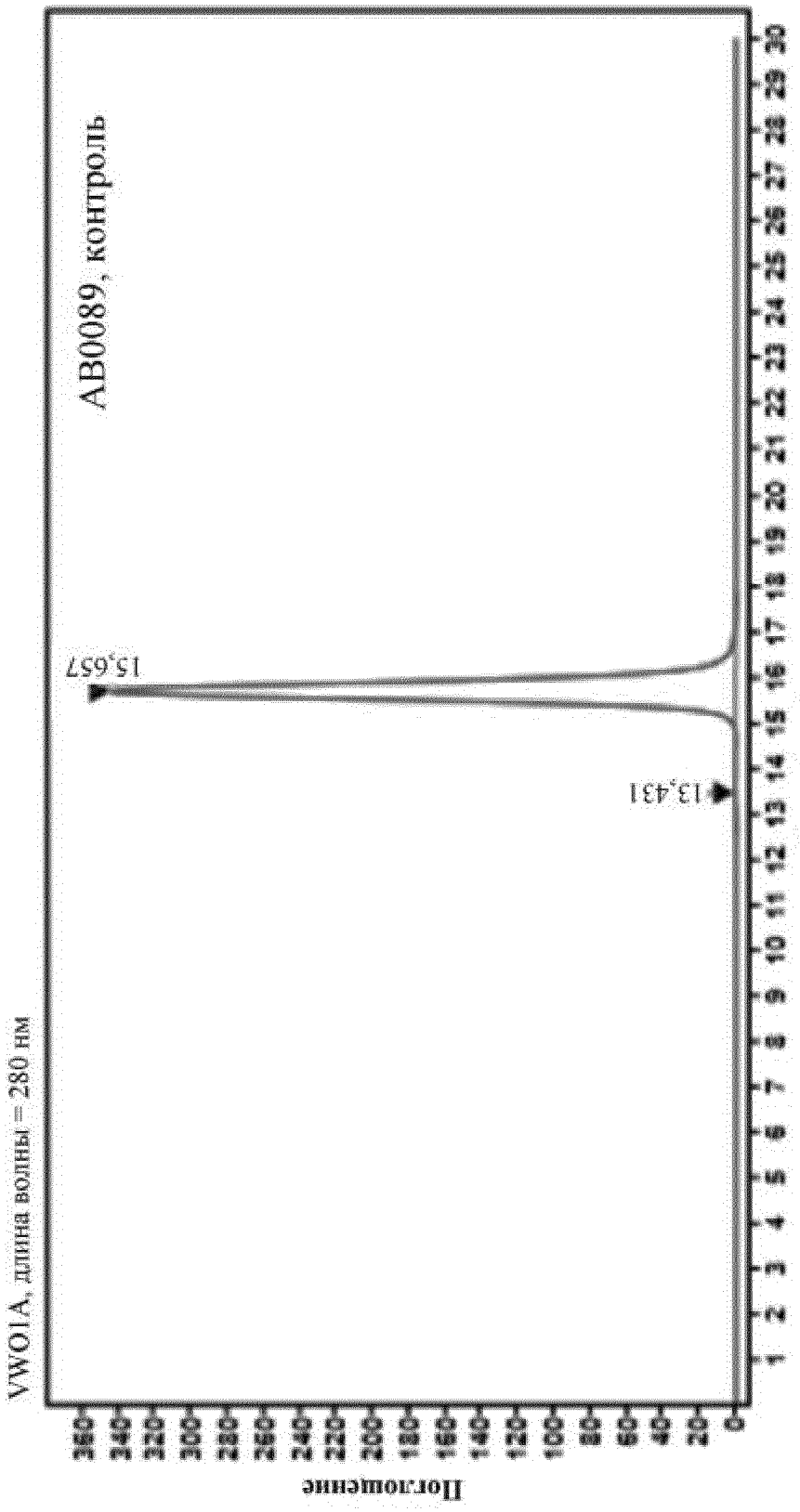



Группа 7
AB0089-003; связывание 1:1

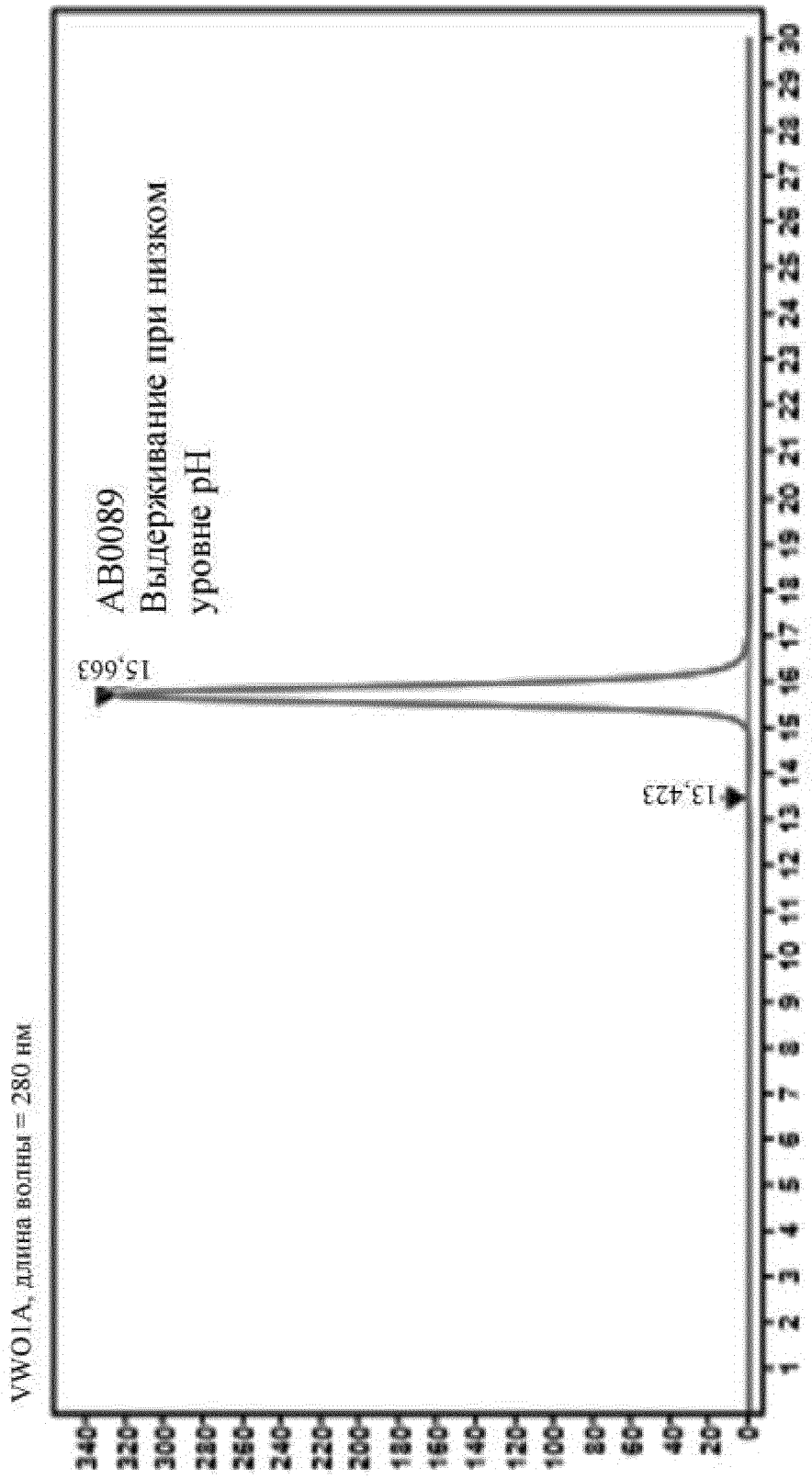
ФИГ. 190 продолжение

ФИГ. 191

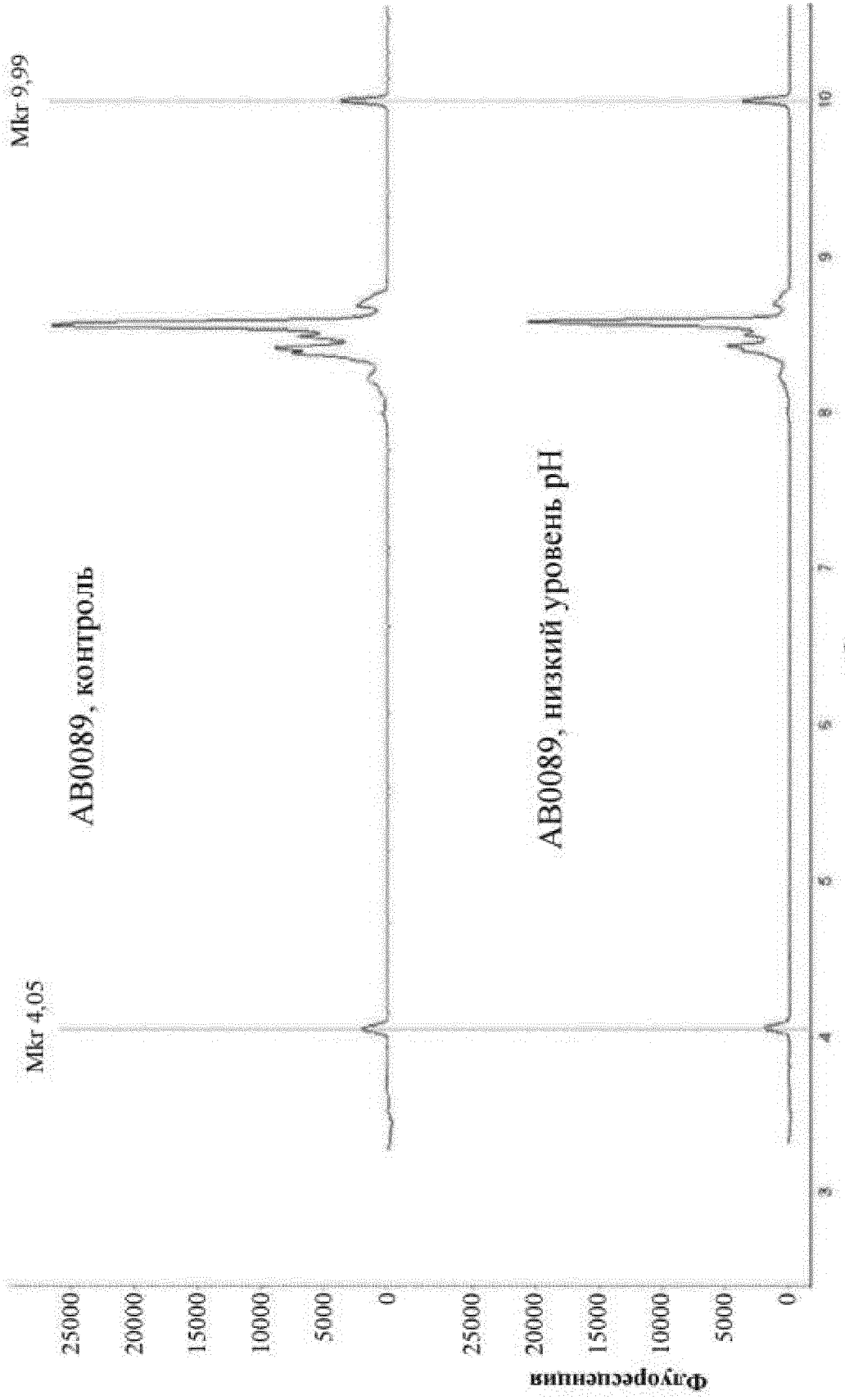

HL-60
KHYD-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
120
100
80
60
40
20
0
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0089, контроль
AB0089, выдерживание при низком уровне pH


AB0089, контроль
15,657
13,431
VWO1A, длина волны = 280 нм
Поглощение
Время [мин]

ФИГ. 192

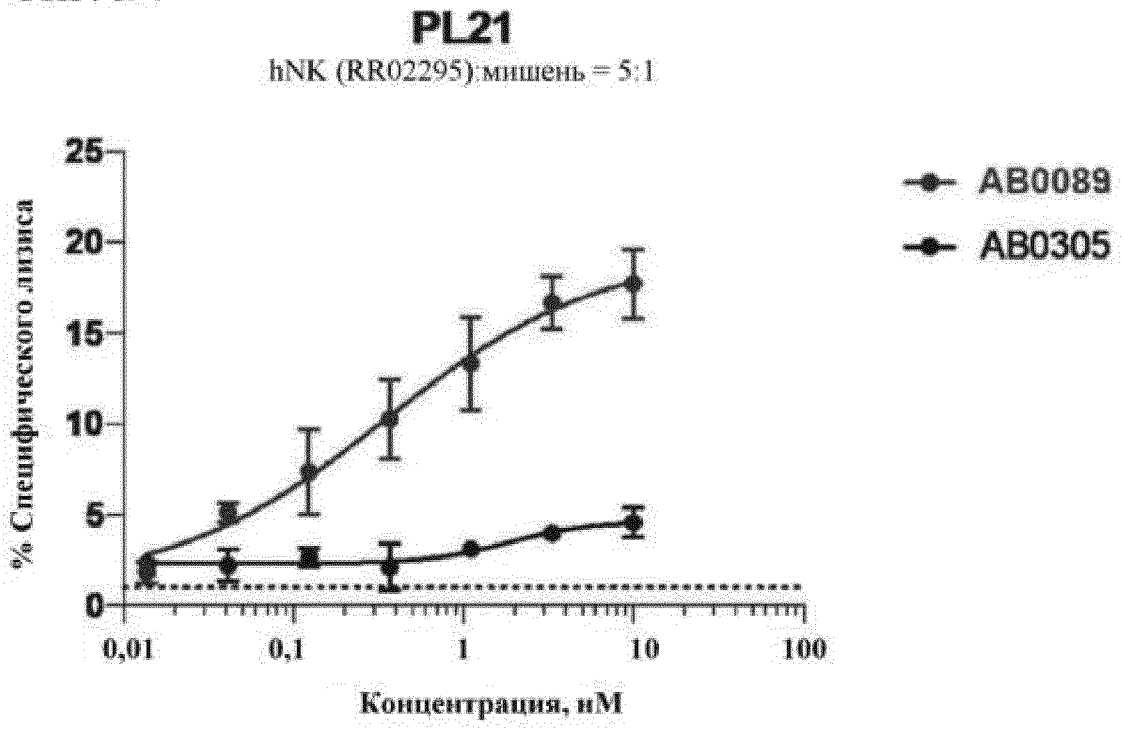



ФИГ. 192 продолжение

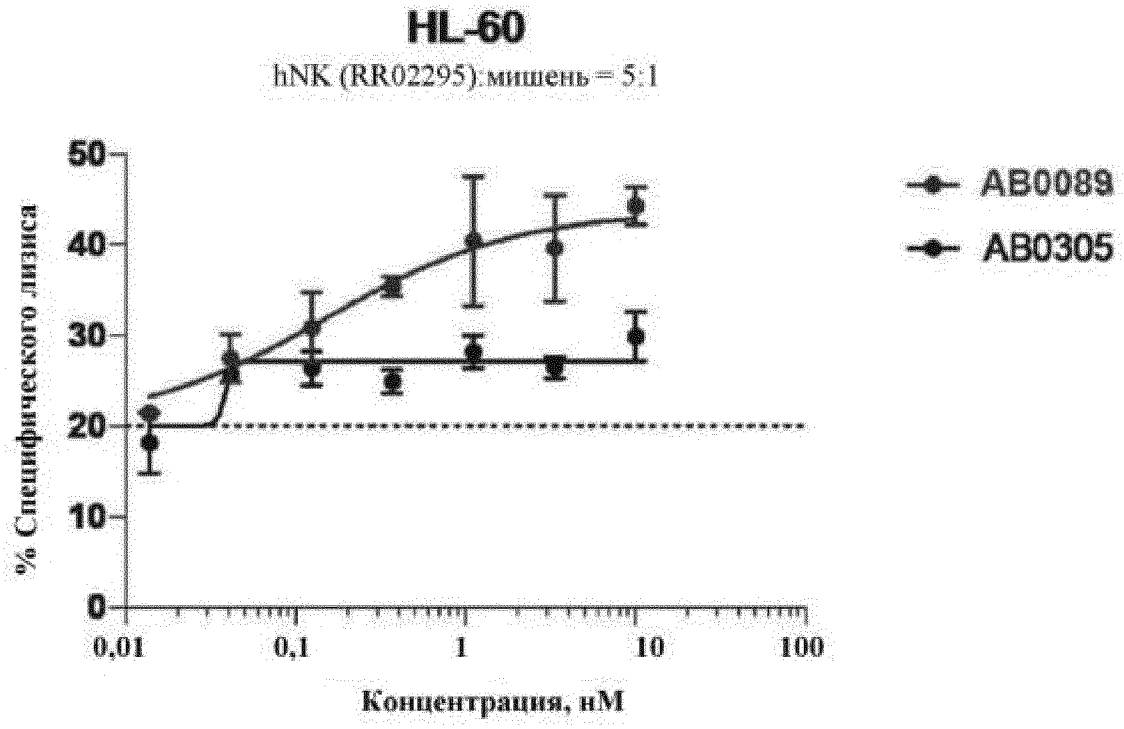

Mkr 9,99
Mkr 4,05
AB0089, контроль
AB0089, низкий уровень pH
Флуоресценция
25000
20000
15000
10000
5000
0
3
4
5
6
7
8
9
10
pI

ФИГ. 193

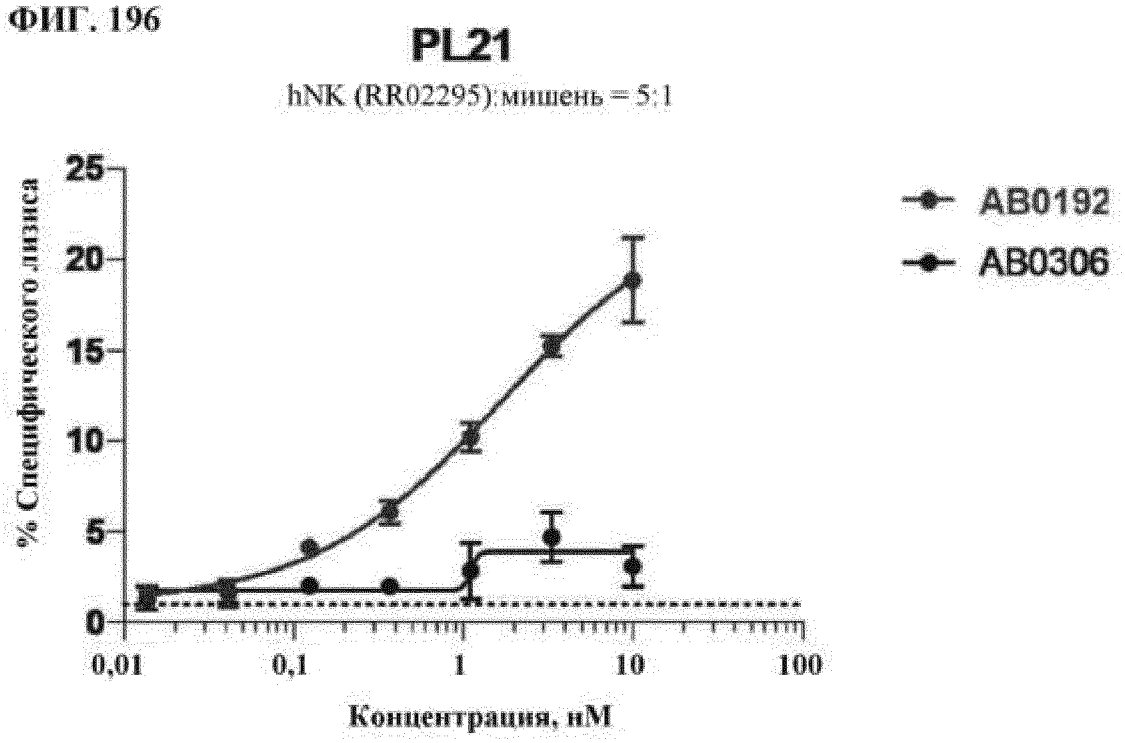
ФИГ. 194



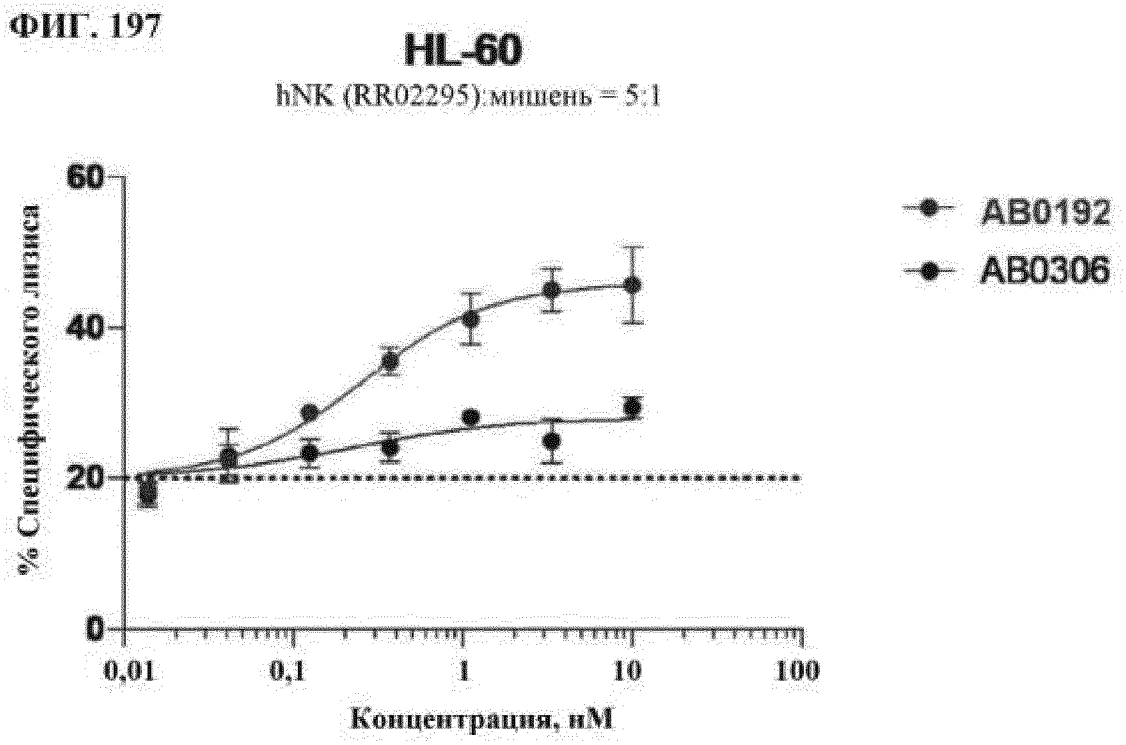

ФИГ. 195



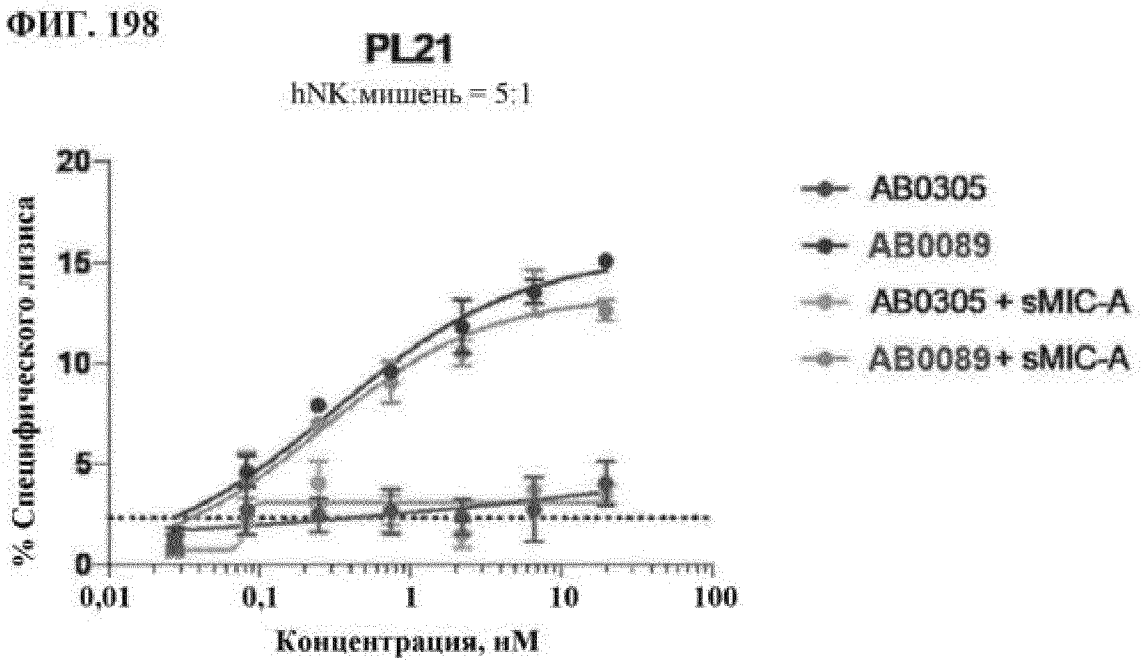
ФИГ. 196



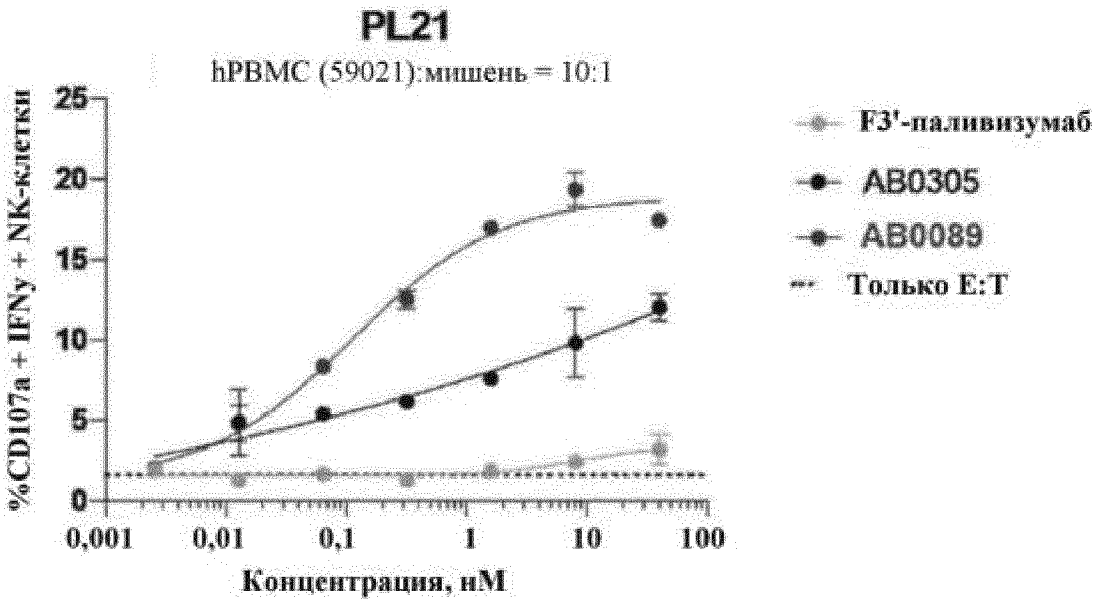

ФИГ. 197



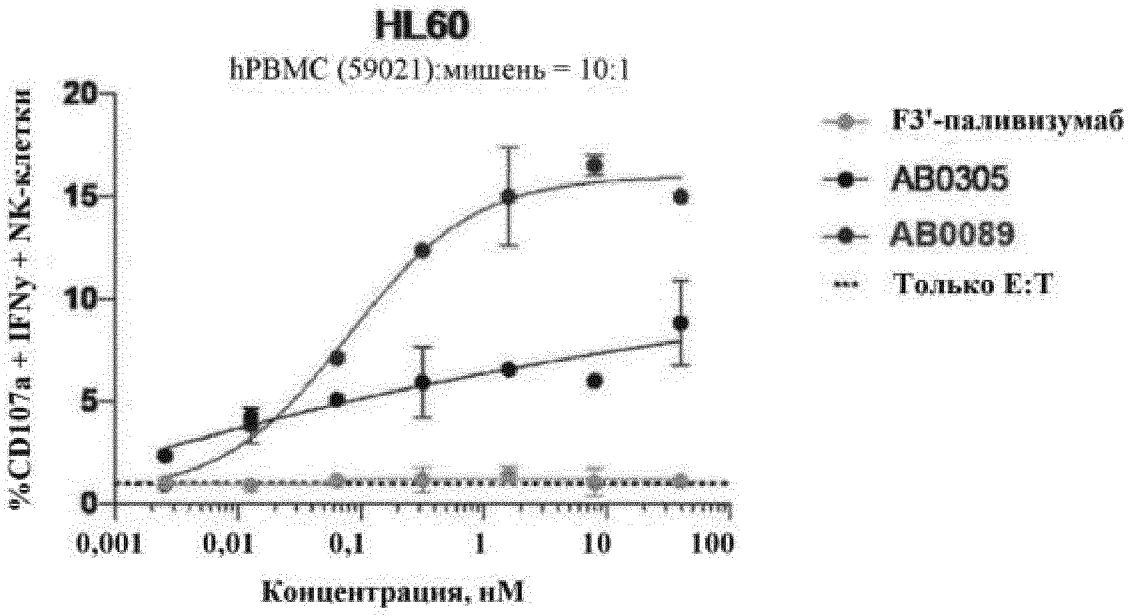
ФИГ. 198



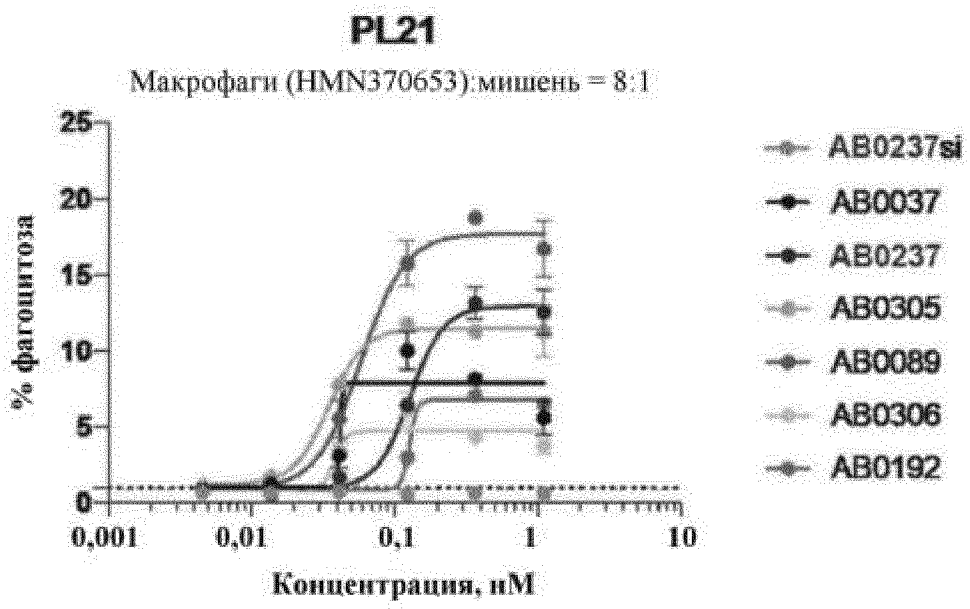

ФИГ. 199



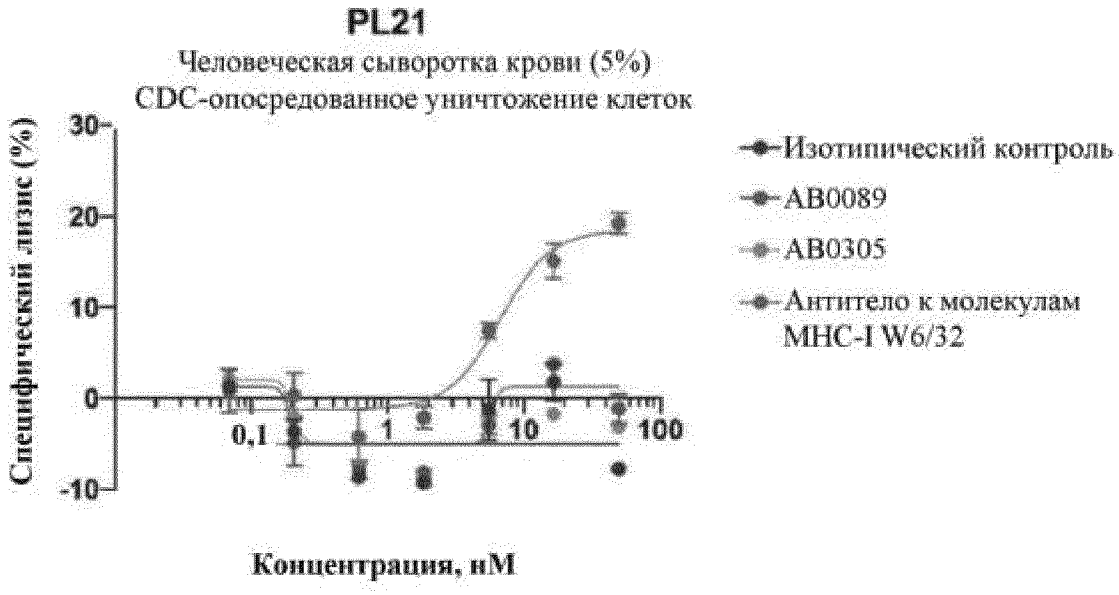
ФИГ. 200



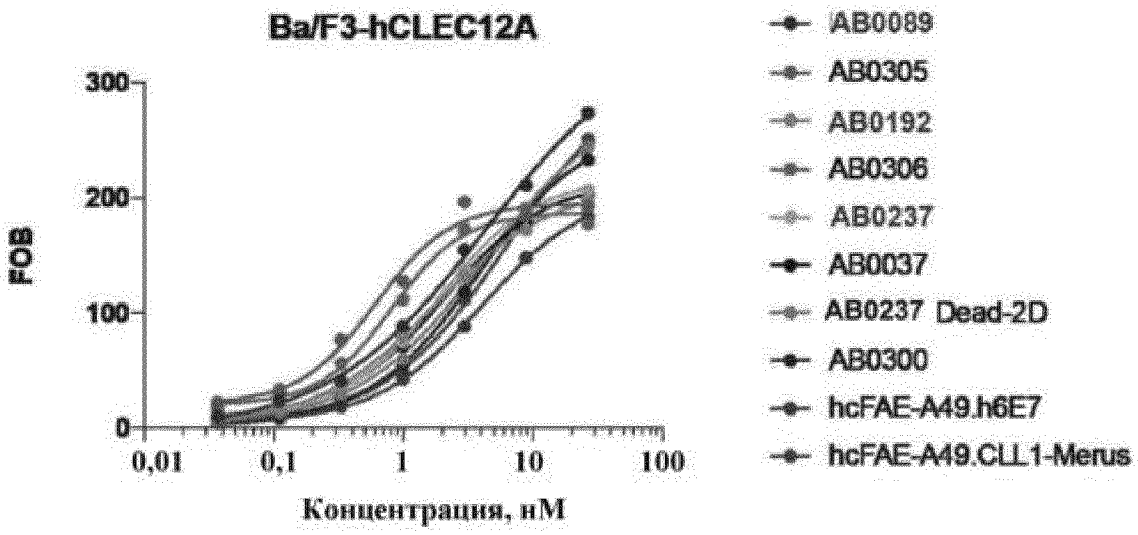

ФИГ. 201



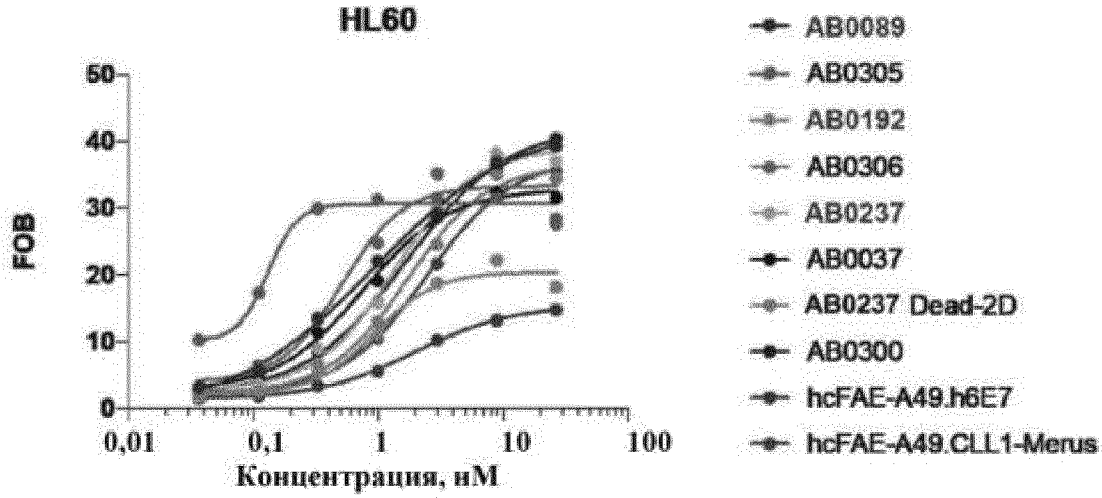
ФИГ. 202



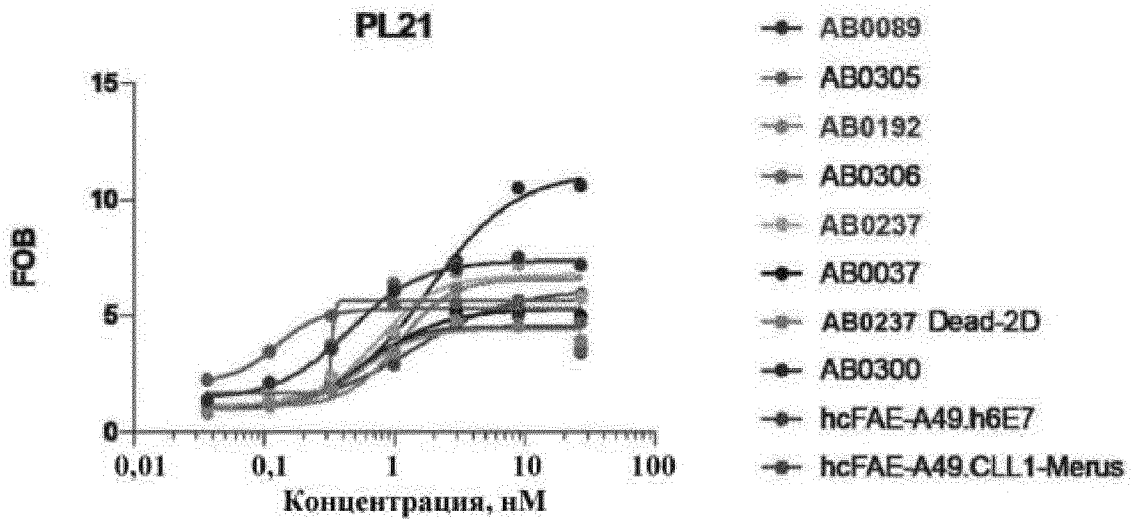

ФИГ. 203A



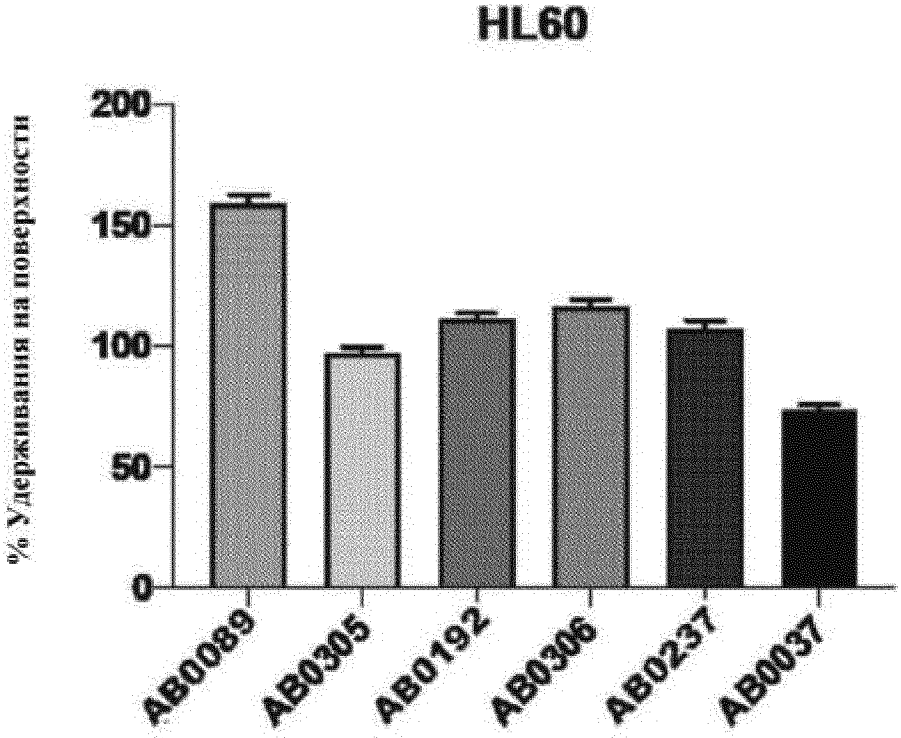
ФИГ. 203B



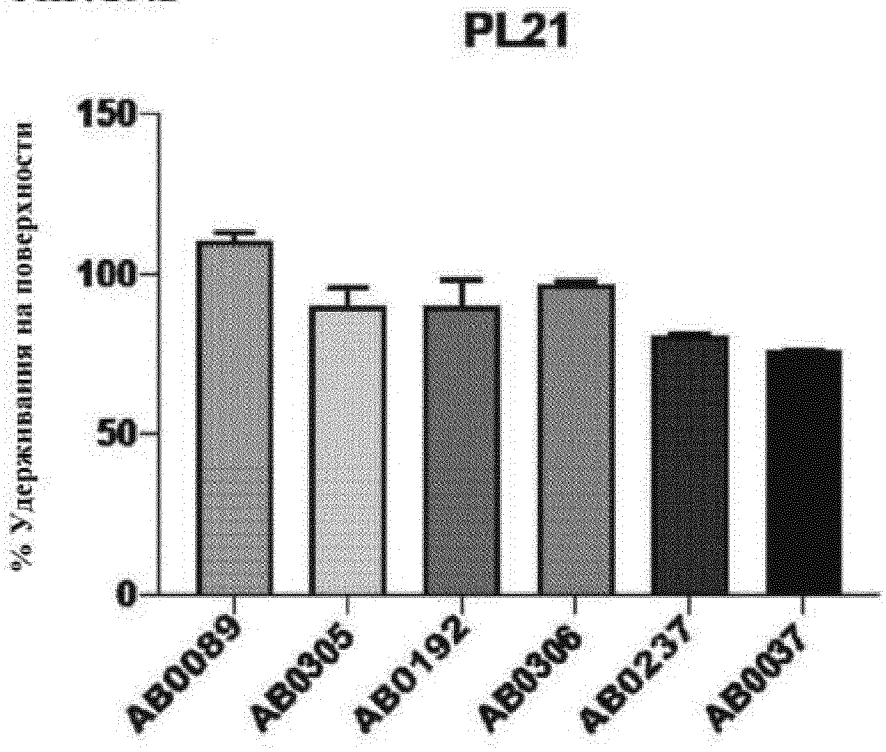

ФИГ. 203C



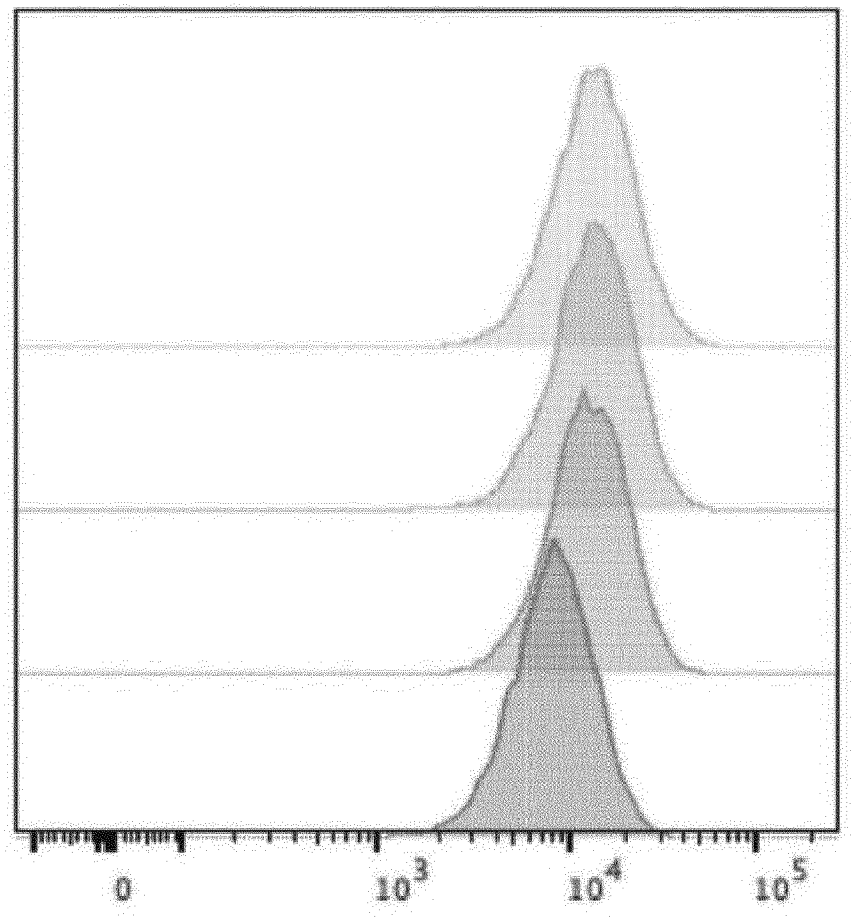
ФИГ. 204A



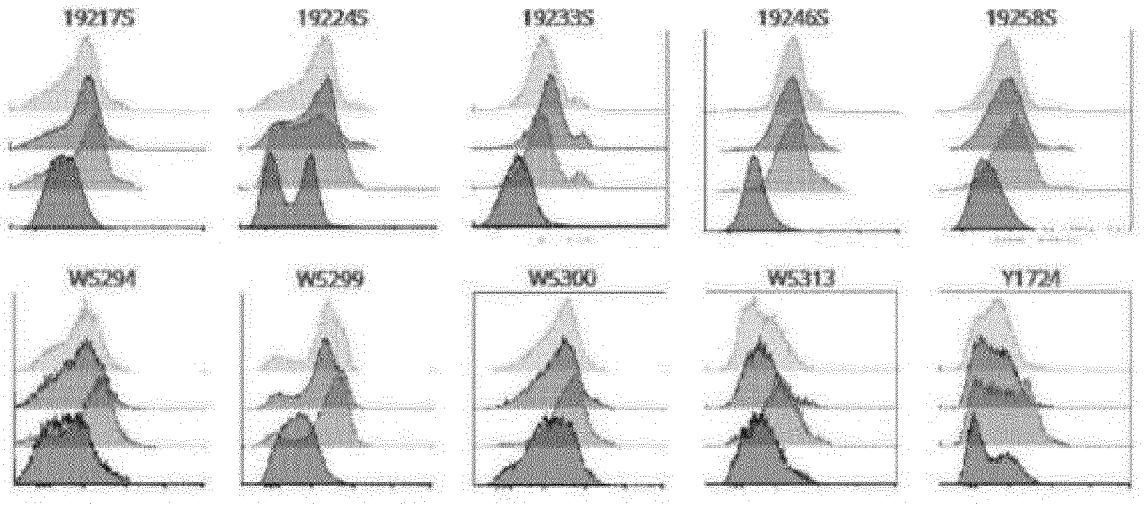

ФИГ. 204B



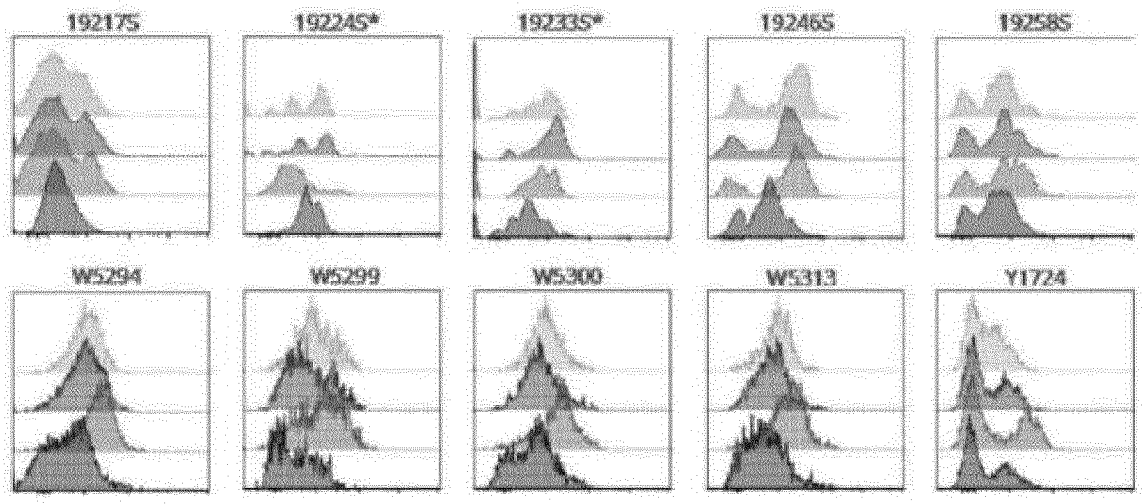
ФИГ. 205

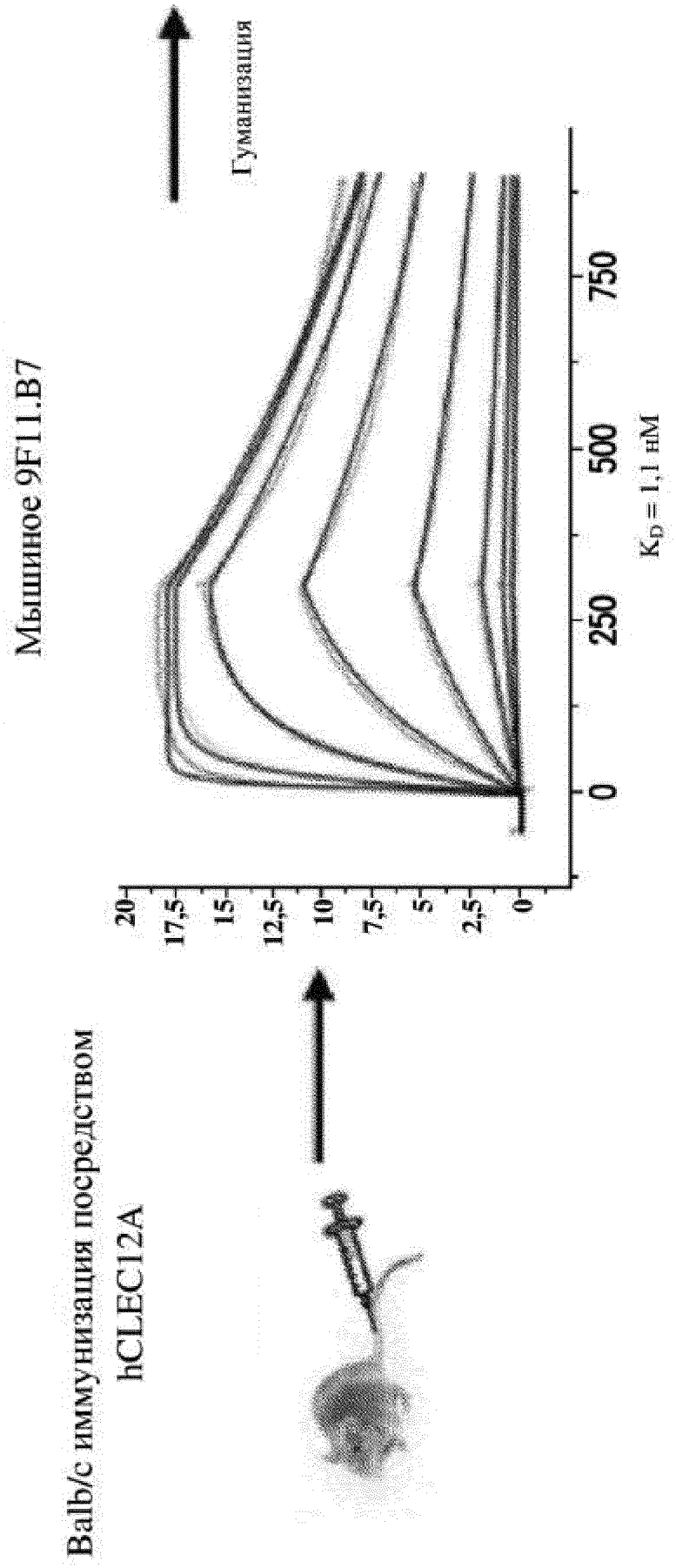


ФИГ. 206

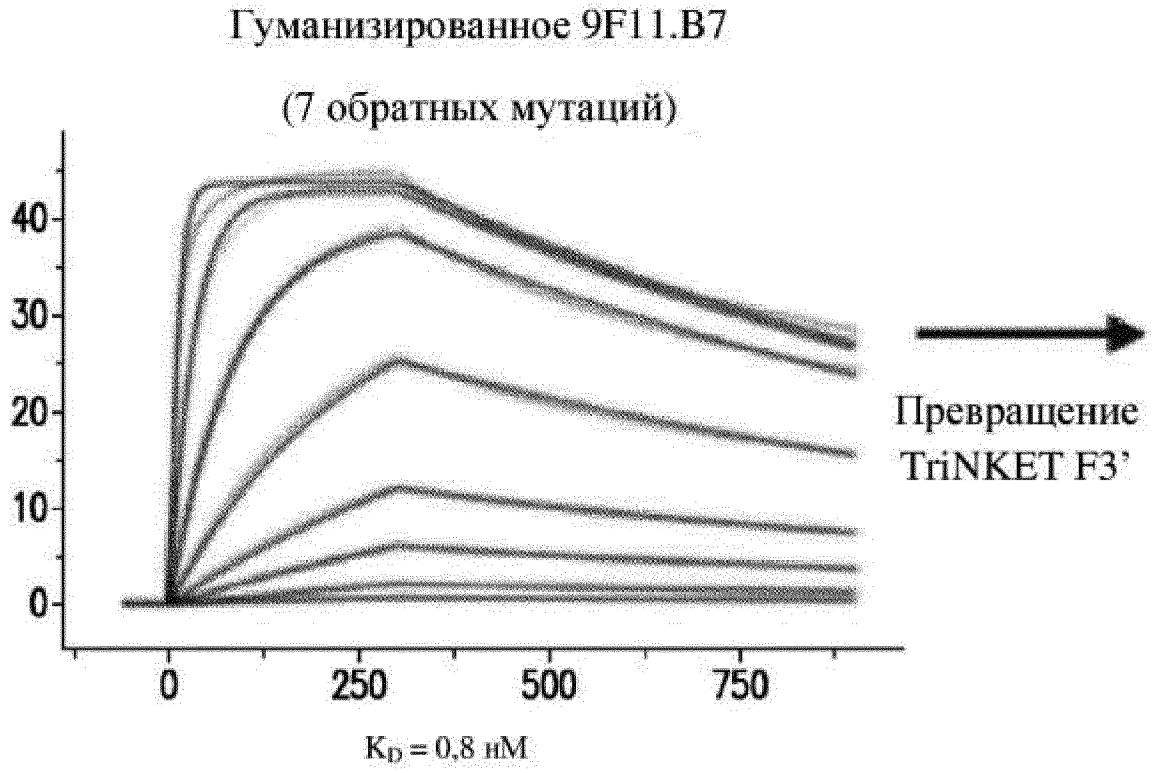


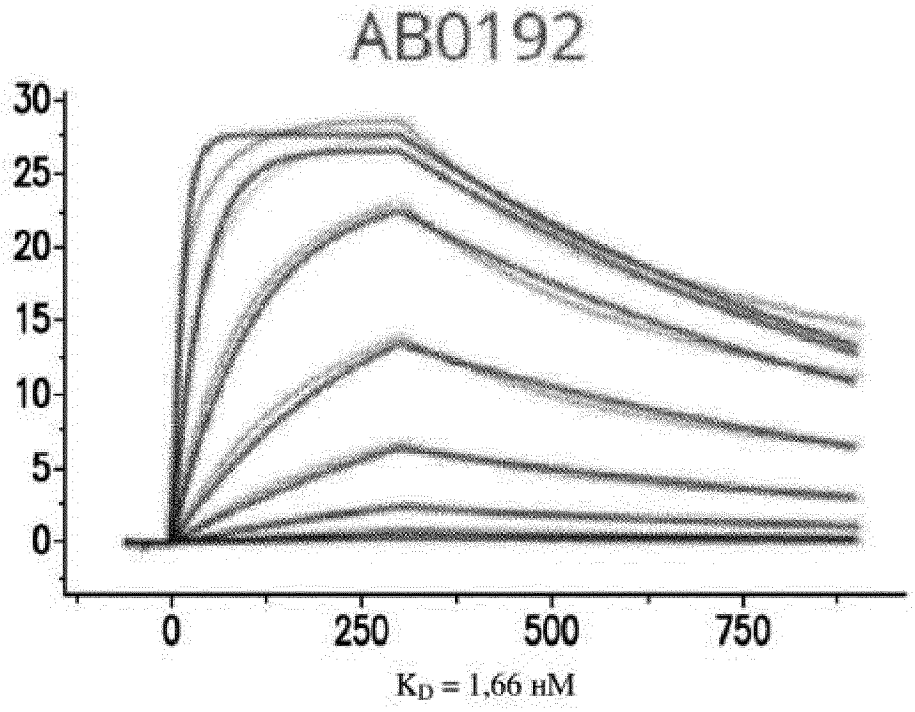

ФИГ. 207



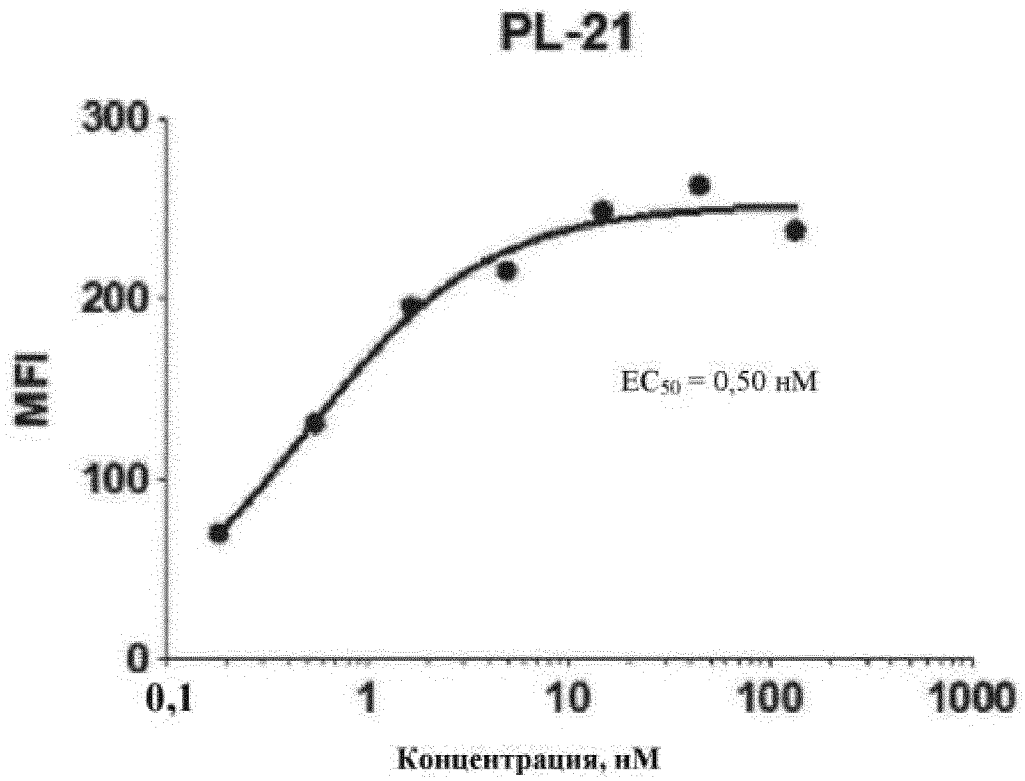

Balb/c иммунизация посредством
hCLEC12A
Мышиное 9F11.B7
Гуманизация
$K_D$ = 1,1 нМ
0
250
500
750
0
2,5
5
7,5
10
12,5
15
17,5
20

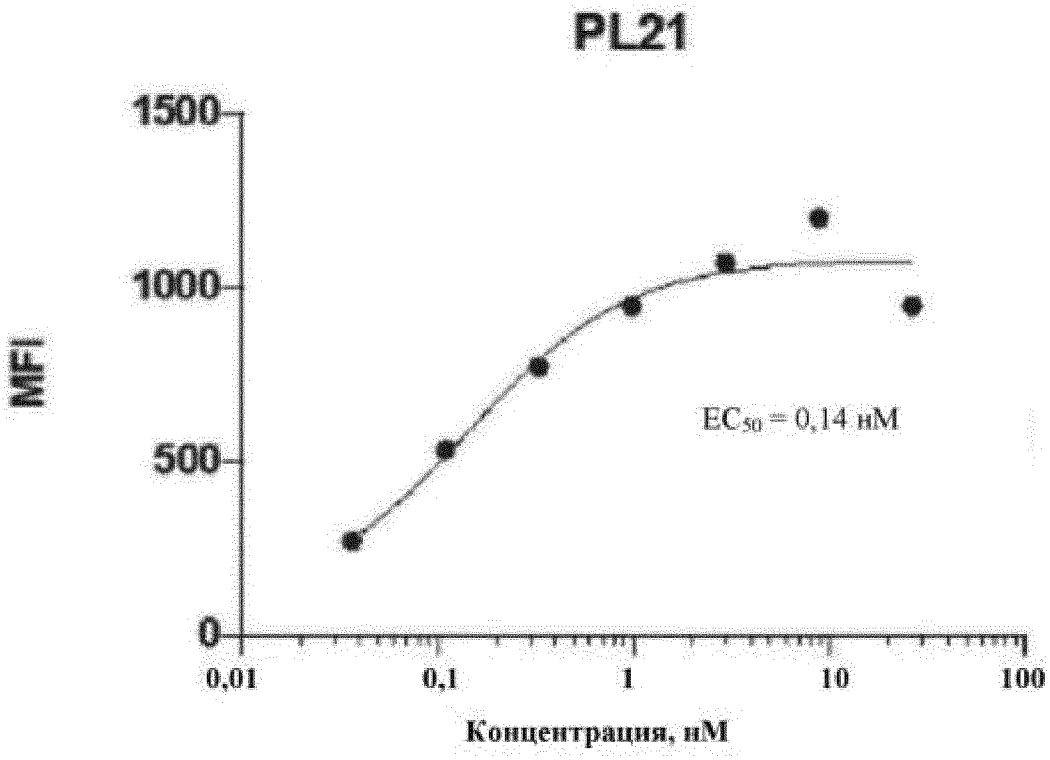
ФИГ. 208



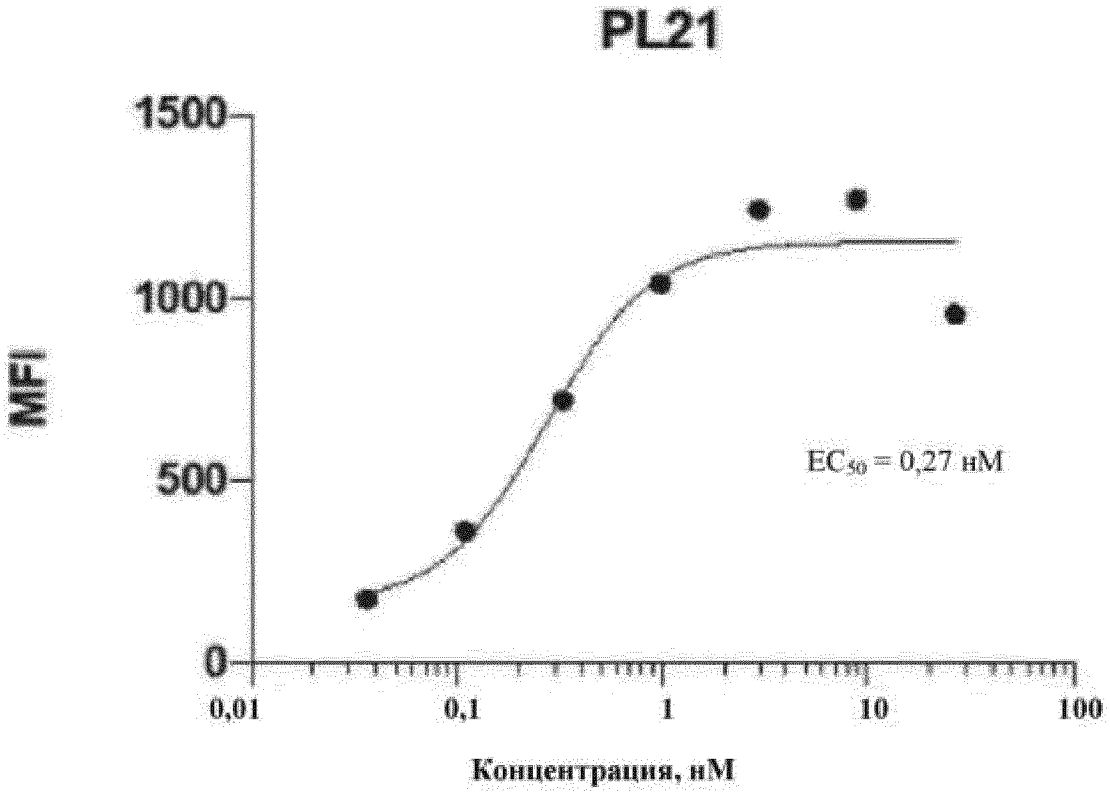




**ФИГ. 208 продолжение**

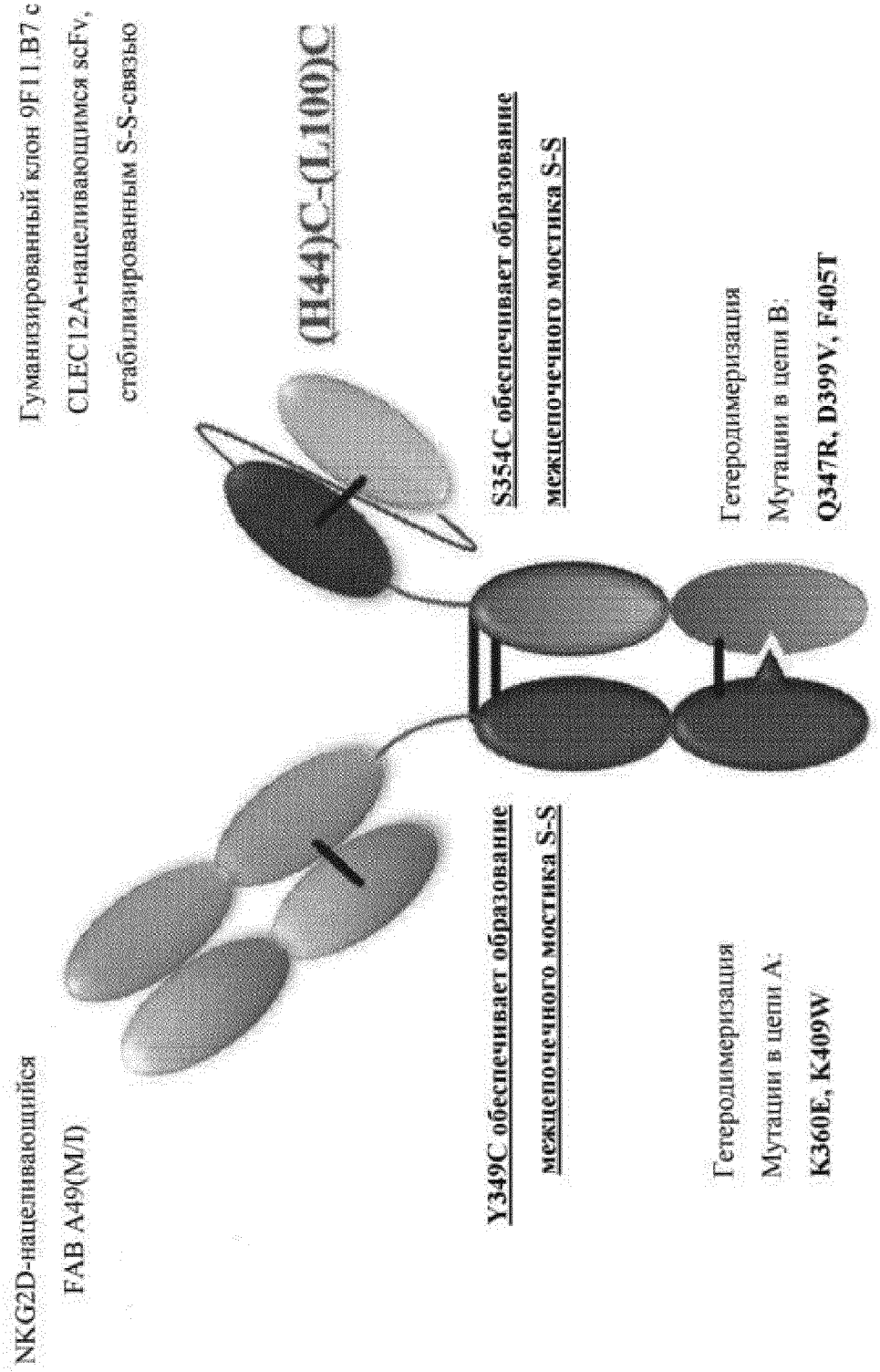



ФИГ. 208 продолжение




ФИГ. 208 продолжение


Гуманизированный клон 9F11.B7 с CLEC12A-нацеливающимся scFv, стабилизированным S-S-связью
(H44)C-(L100)C
S354C обеспечивает образование межцепочечного мостика S-S
Гетеродимеризация
Мутации в цепи B:
Q347R, D399V, F405T
NKG2D-нацеливающийся FAB A49(M/I)
Y349C обеспечивает образование межцепочечного мостика S-S
Гетеродимеризация
Мутации в цепи A:
K360E, K409W

ФИГ. 209

## ФИГ. 210

**Цепь S: scFv-CH2-CH3 антитела к CLEC12A** (гуманизированная последовательность, CDR выделены жирным шрифтом и не подчеркнуты, обратные мутации выделены жирным шрифтом и не подчеркнуты, сконструированный сайт образования дисульфидного мостика в scFv выделен курсивом и жирным шрифтом, и мутации в Fc для обеспечения гетеродимеризации и сконструированный дисульфидный мостик между CH3 подчеркнуты и представлены нежирным шрифтом).

**E**VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAA**SGFTFNAFGM**HWVRQAPGKCLEWVAFI**SSGSTSIYYANT**
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**RDGYPTGGAMDY**WGQGTSVTVSSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDIYNYLSWFQQKPGKAPKPLIY**
**RANILVSGVPSRFSGSGSGQDYTFTISSLQPEDIATYYCLQFDAFPFTFGCGTKLEIKGSDKTHTC**
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:278)

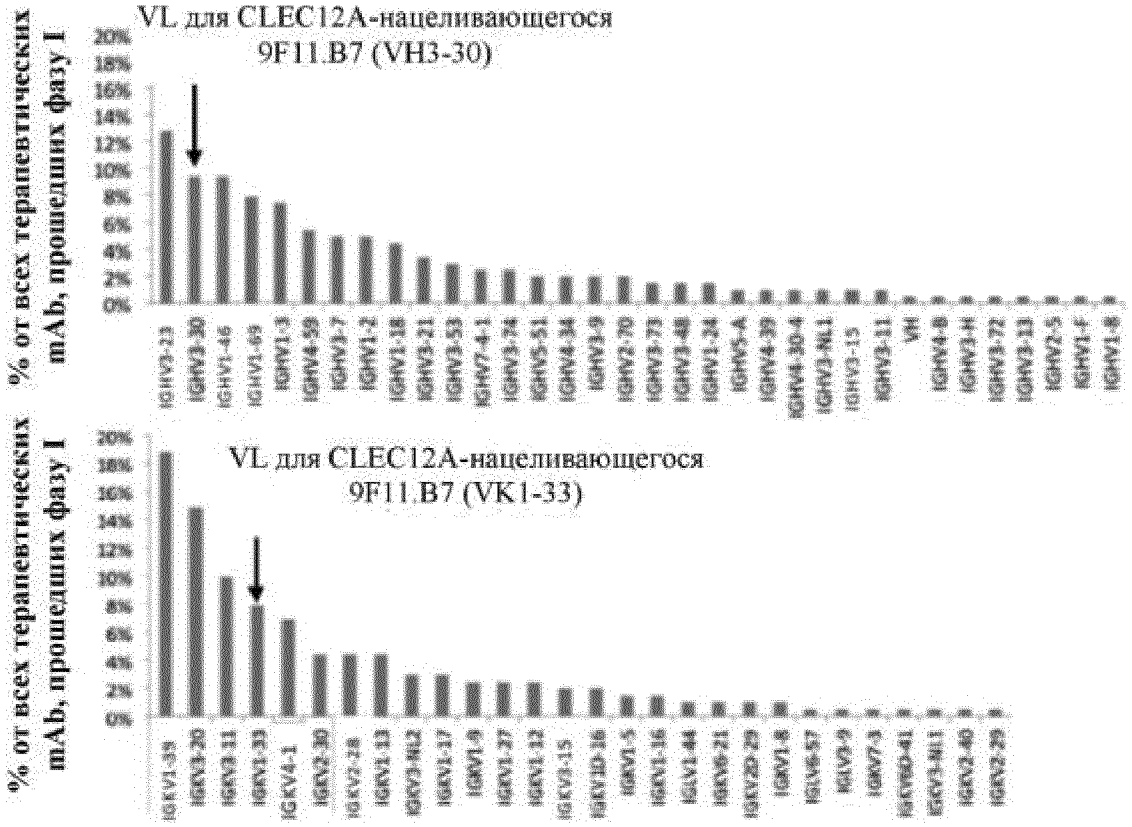
**Цепь H:** VH-CH1-CH2-CH3 антитела к NKGD (полностью человеческая, CDR выделены жирным шрифтом и не подчеркнуты, мутации Fc для обеспечения гетеродимеризации и сконструированный дисульфидный мостик между CH3 подчеркнуты и представлены нежирным шрифтом).

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA**SGFTFSSY**SMNWVRQAPGKGLEWVSS**ISSSSSSY**IYYADSVK
GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**GAPIGAAAGWFDP**WGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:260)

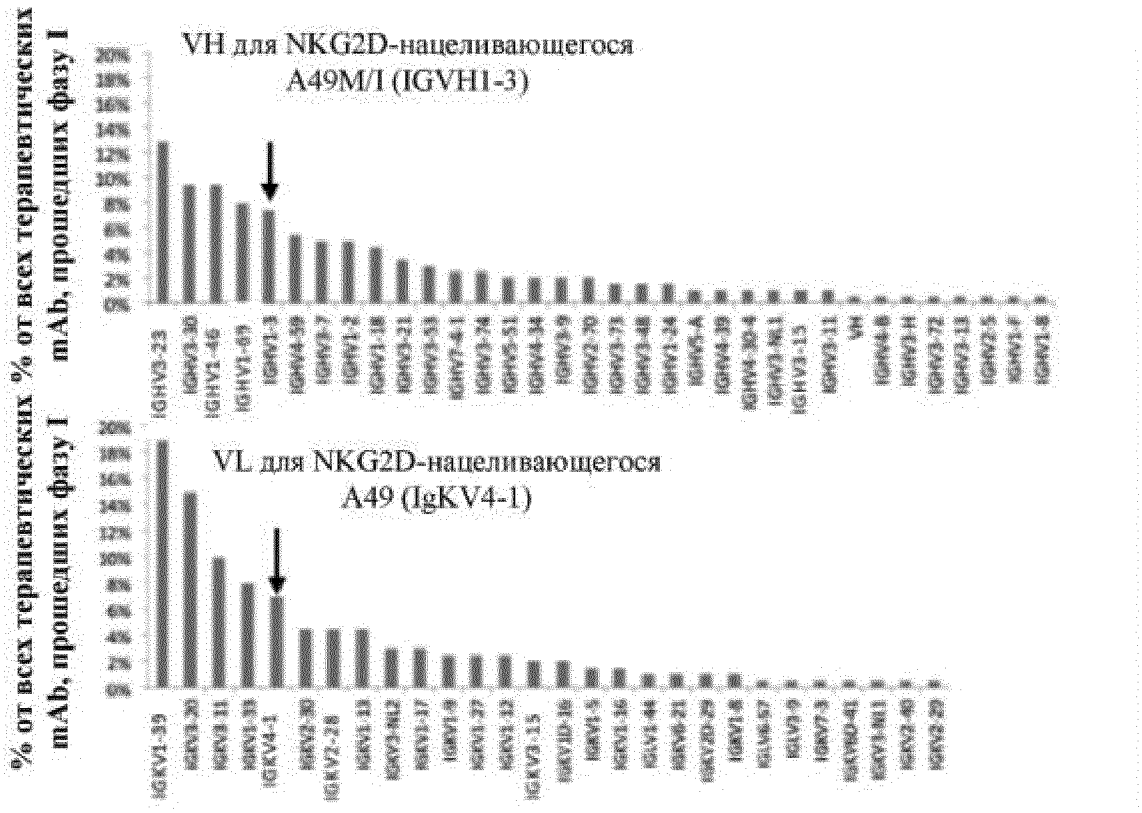
**Цепь L:** VL-CL антитела к NKGD (полностью человеческая, CDR выделены жирным шрифтом и не подчеркнуты).

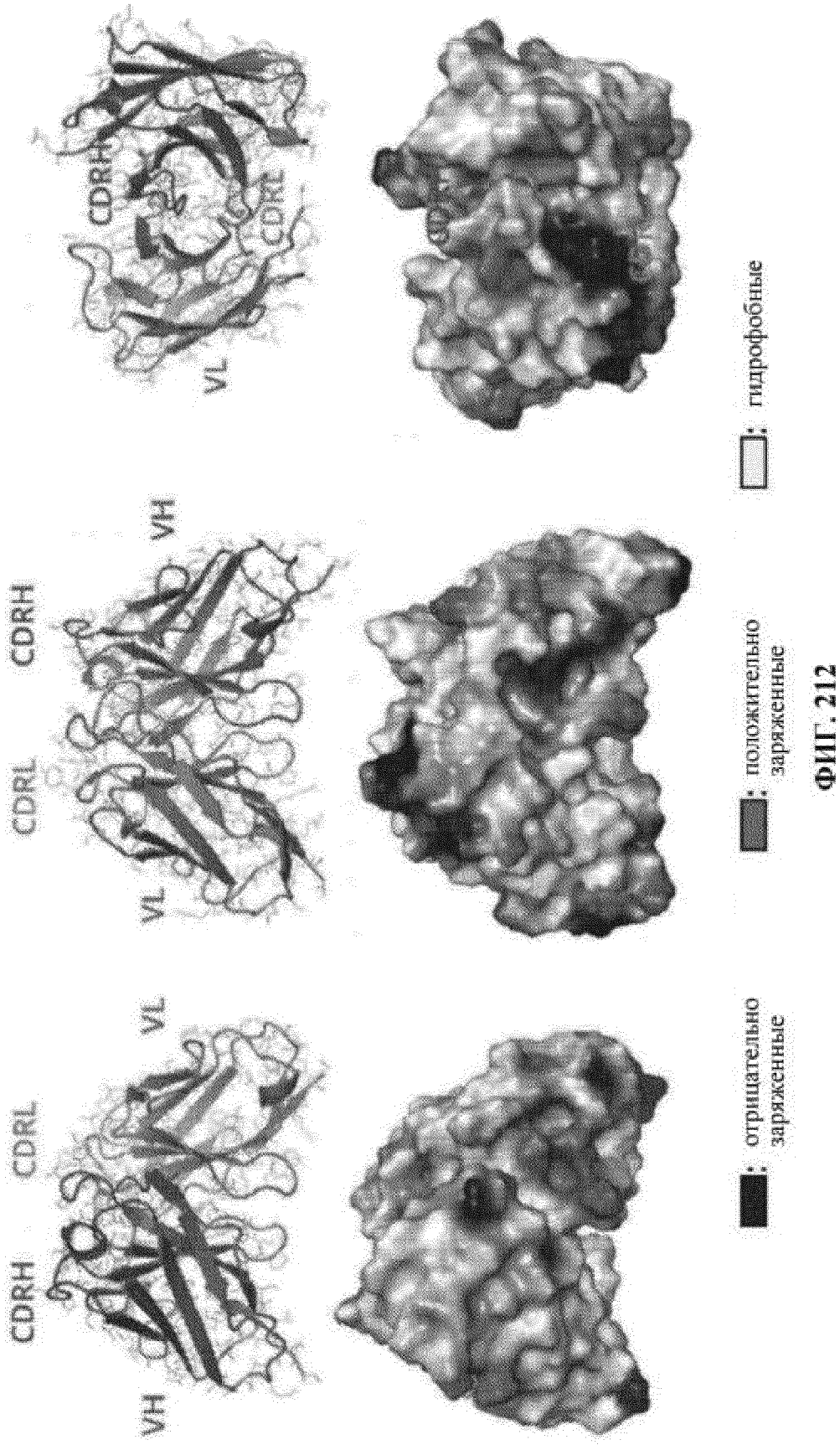
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC**RASQGISSWLA**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQGVSFPRT**FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:261)

**ФИГ. 211**

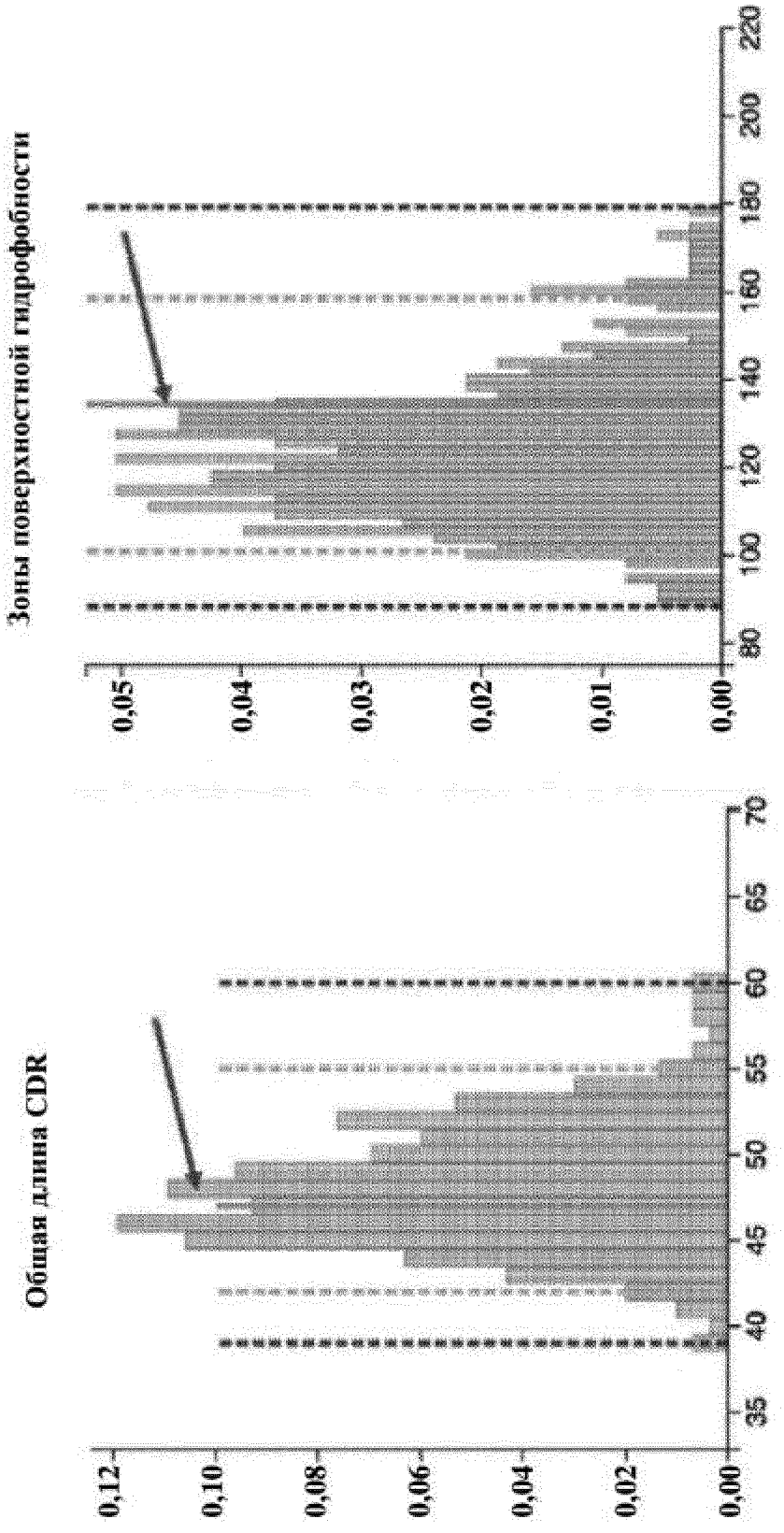

VL для CLEC12A-нацеливающегося
9F11.B7 (VH3-30)
% от всех терапевтических mAb, прошедших фазу I
20%
18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
IGHV3-23
IGHV3-30
IGHV1-46
IGHV1-69
IGHV1-3
IGHV4-59
IGHV3-7
IGHV1-2
IGHV1-18
IGHV3-21
IGHV3-53
IGHV7-4-1
IGHV3-74
IGHV5-51
IGHV4-34
IGHV3-9
IGHV2-70
IGHV3-73
IGHV3-48
IGHV1-24
IGHV5-A
IGHV4-39
IGHV4-30-4
IGHV3-NL1
IGHV3-15
IGHV3-11
VH
IGHV4-B
IGHV2-H
IGHV3-72
IGHV3-13
IGHV2-5
IGHV1-F
IGHV1-8
VL для CLEC12A-нацеливающегося
9F11.B7 (VK1-33)
% от всех терапевтических mAb, прошедших фазу I
20%
18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
IGKV1-39
IGKV3-20
IGKV3-11
IGKV1-33
IGKV4-1
IGKV2-30
IGKV2-28
IGKV1-13
IGKV3-NL2
IGKV1-17
IGKV1-9
IGKV1-27
IGKV1-12
IGKV3-15
IGKV3-20
IGKV1-5
IGKV1-16
IGLV1-44
IGKV6-21
IGKV2-29
IGKV1-8
IGLV6-57
IGKV2-9
IGKV7-3
IGKV6D-41
IGKV3-NL1
IGKV2-40
IGKV2-29

**ФИГ. 211 продолжение**

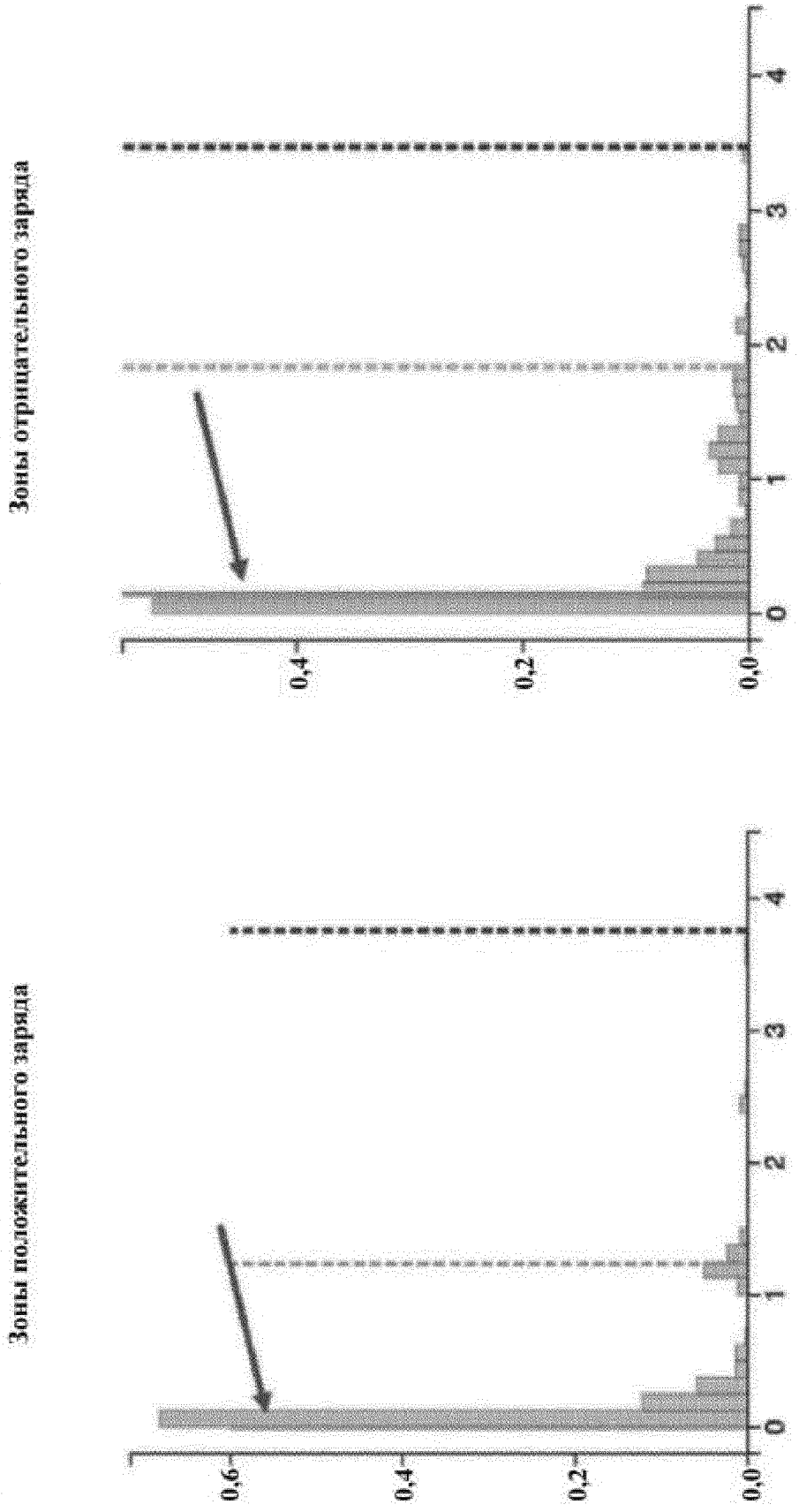



CDRH
CDRL
VL
VH
отрицательно заряженные
положительно заряженные
гидрофобные

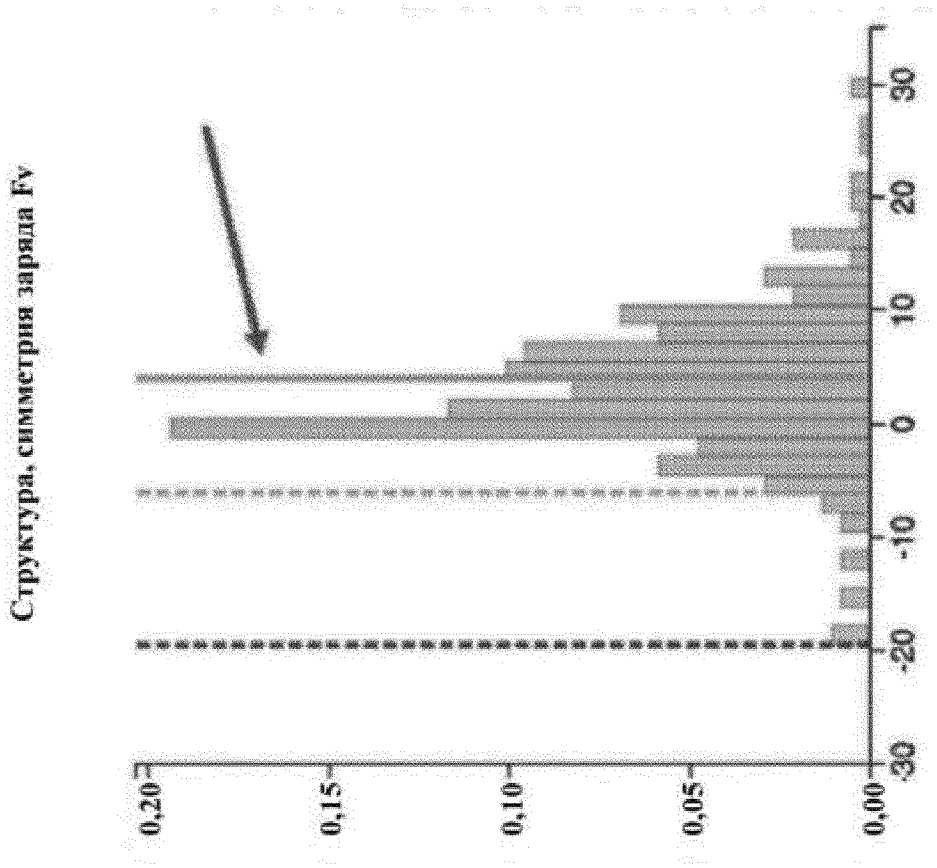
ФИГ. 212


Зоны поверхностной гидрофобности
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
80
100
120
140
160
180
200
220
Общая длина CDR
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
35
40
45
50
55
60
65
70

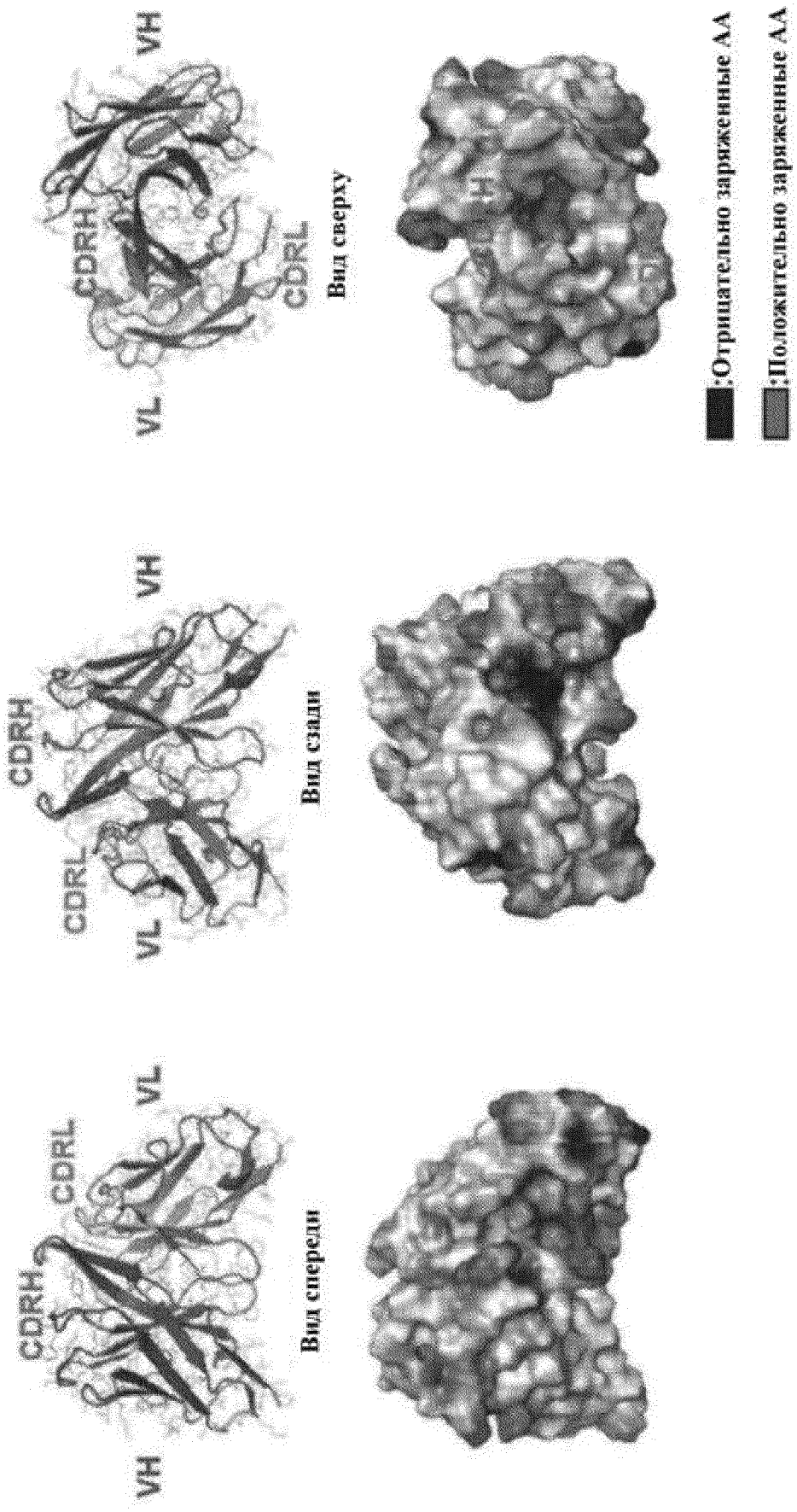
ФИГ. 213


Зоны отрицательного заряда
0,4
0,2
0,0
0
1
2
3
4
Зоны положительного заряда
0,6
0,4
0,2
0,0
0
1
2
3
4

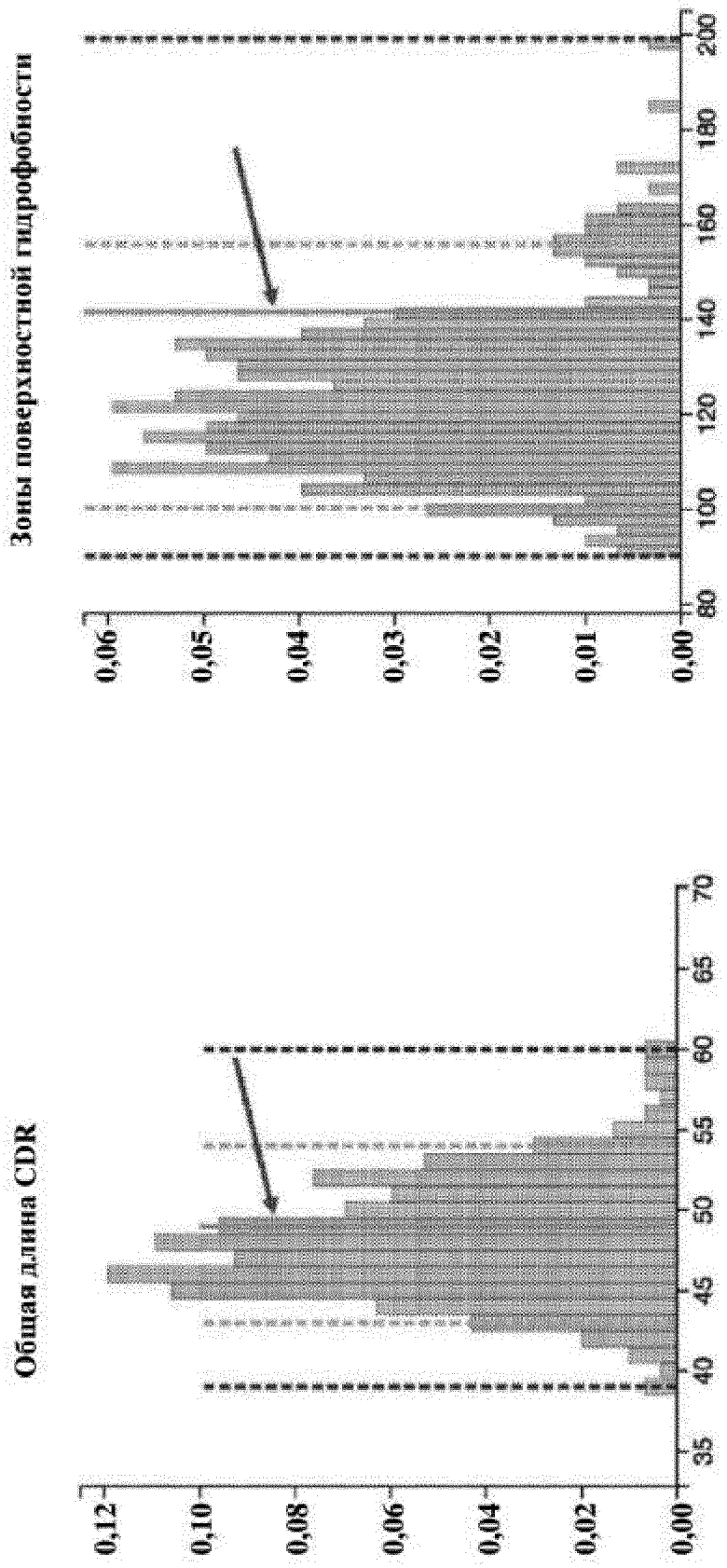
ФИГ. 214



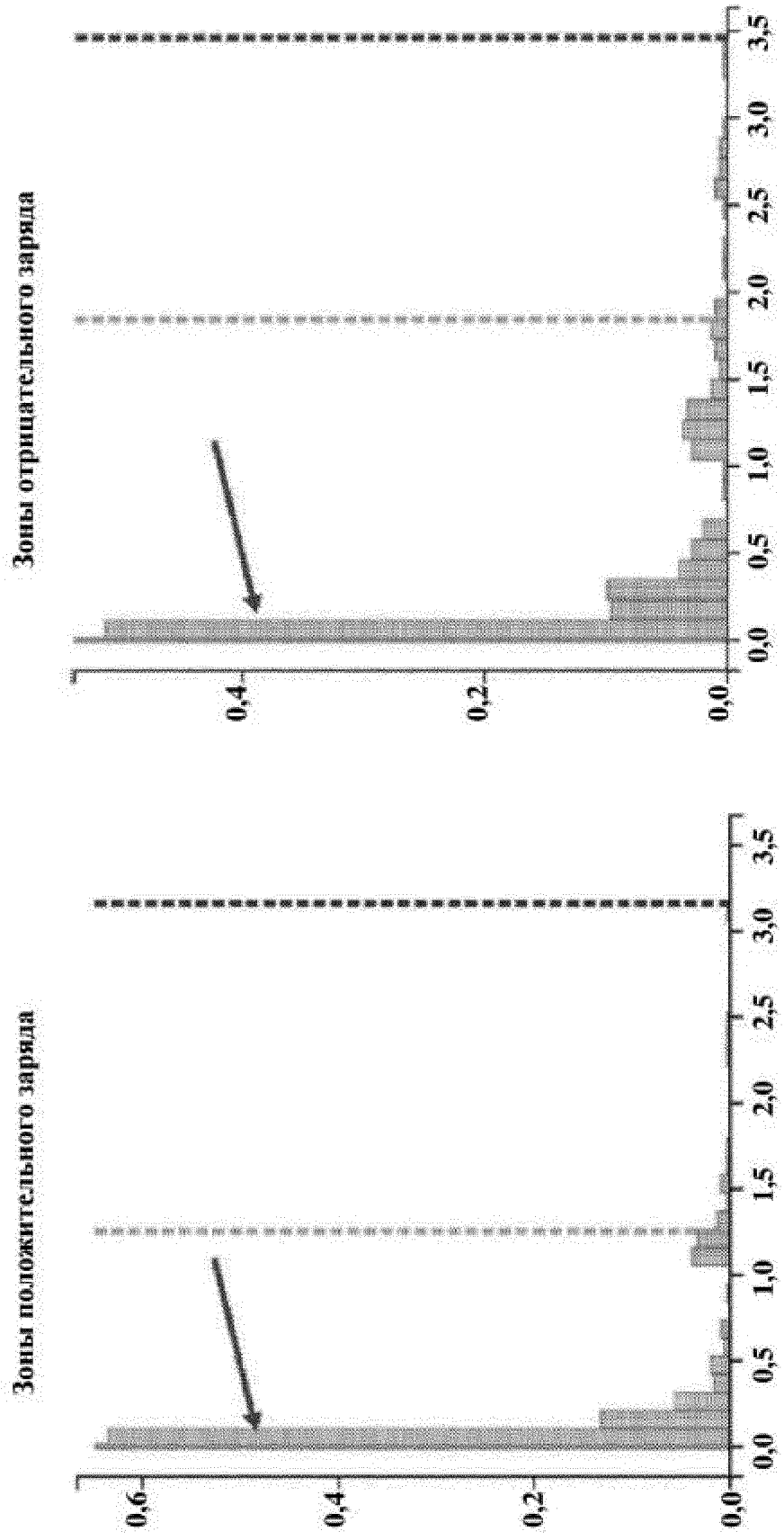

ФИГ. 214 продолжение


VH
CDRH
CDRL
VL
Вид спереди
Вид сзади
Вид сверху
:Отрицательно заряженные АА
:Положительно заряженные АА

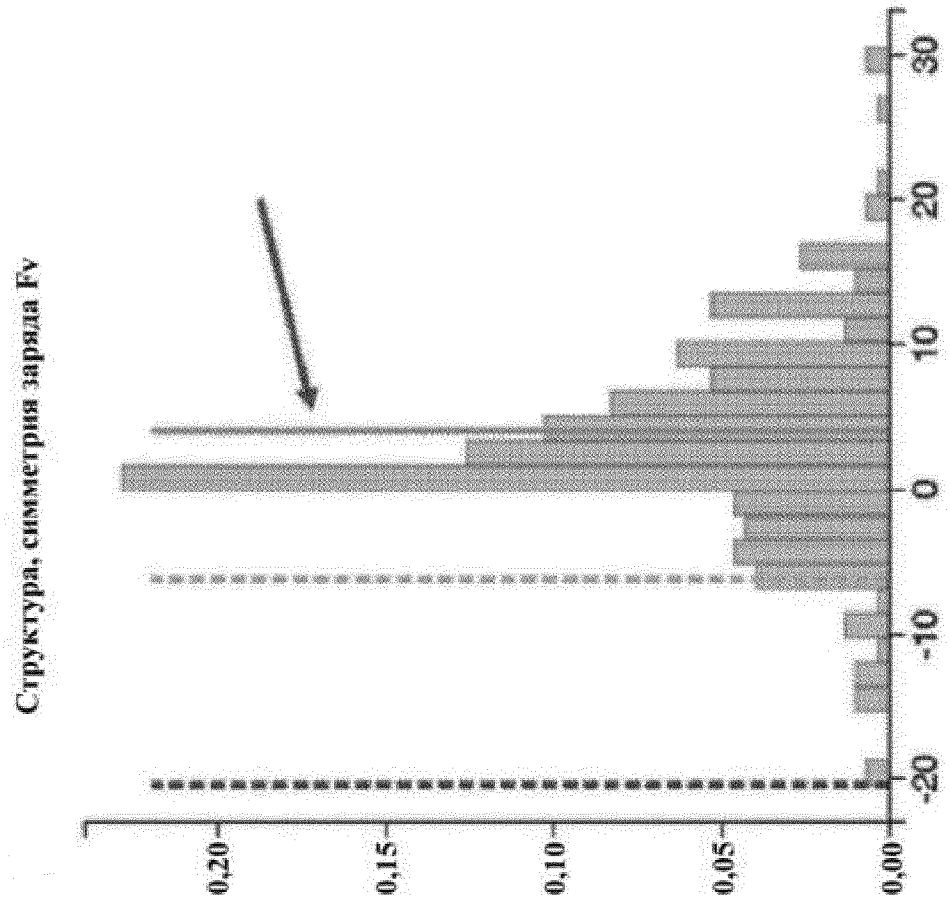
ФИГ. 215


Зоны поверхностной гидрофобности
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
80
100
120
140
160
180
200
Общая длина CDR
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
35
40
45
50
55
60
65
70

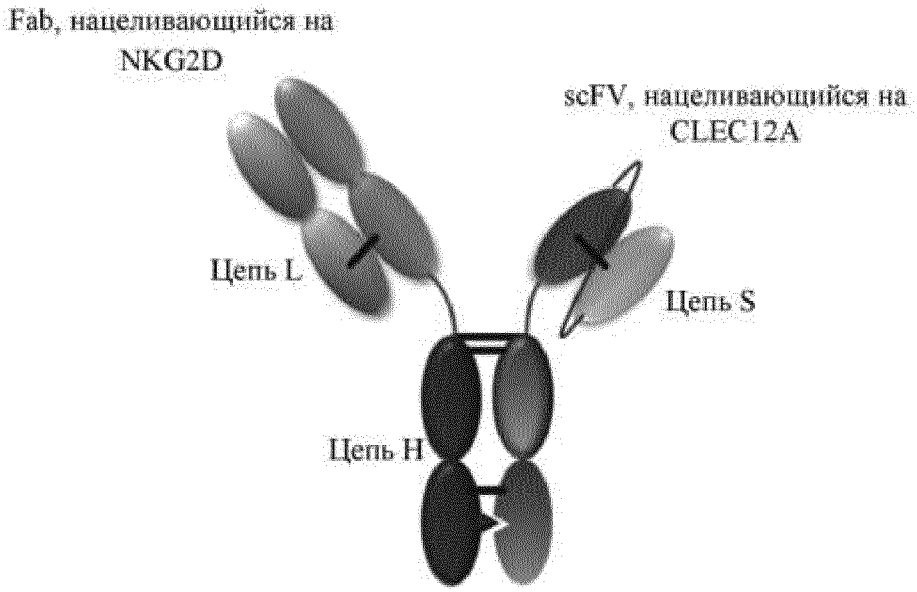
ФИГ. 216


Зоны положительного заряда
0,0
0,2
0,4
0,6
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
Зоны отрицательного заряда
0,0
0,2
0,4
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5

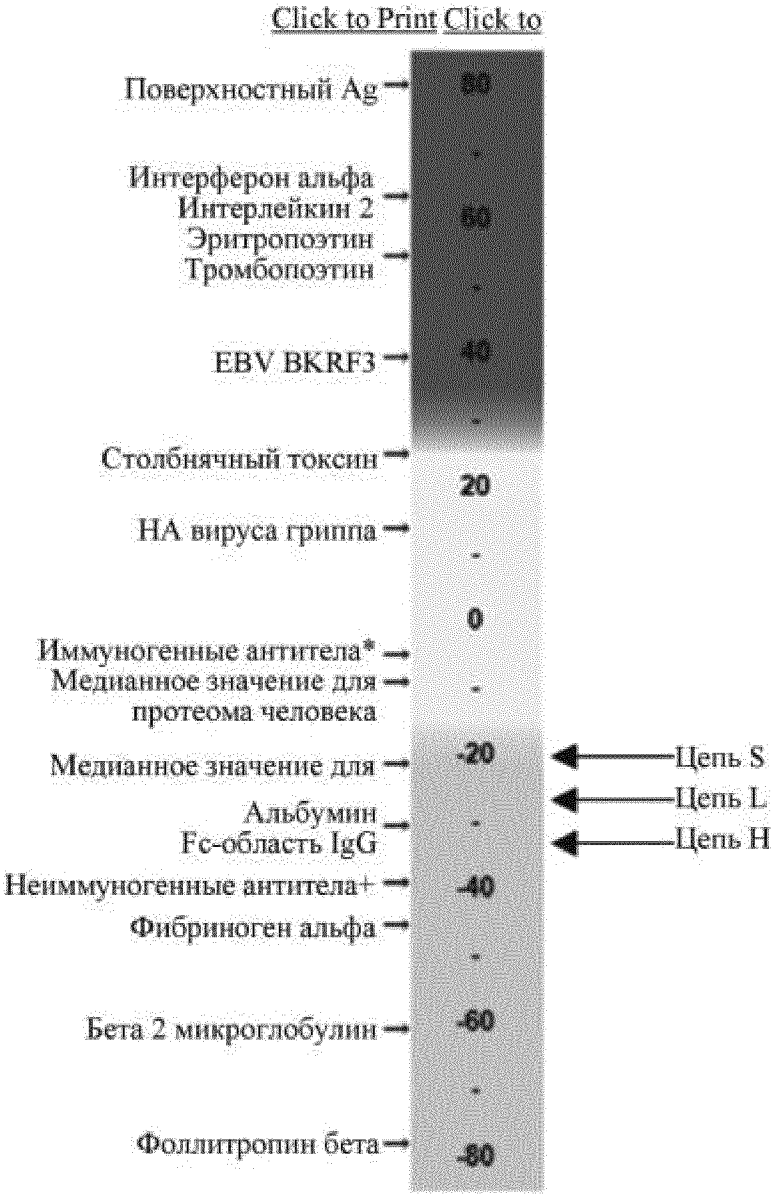
ФИГ. 217



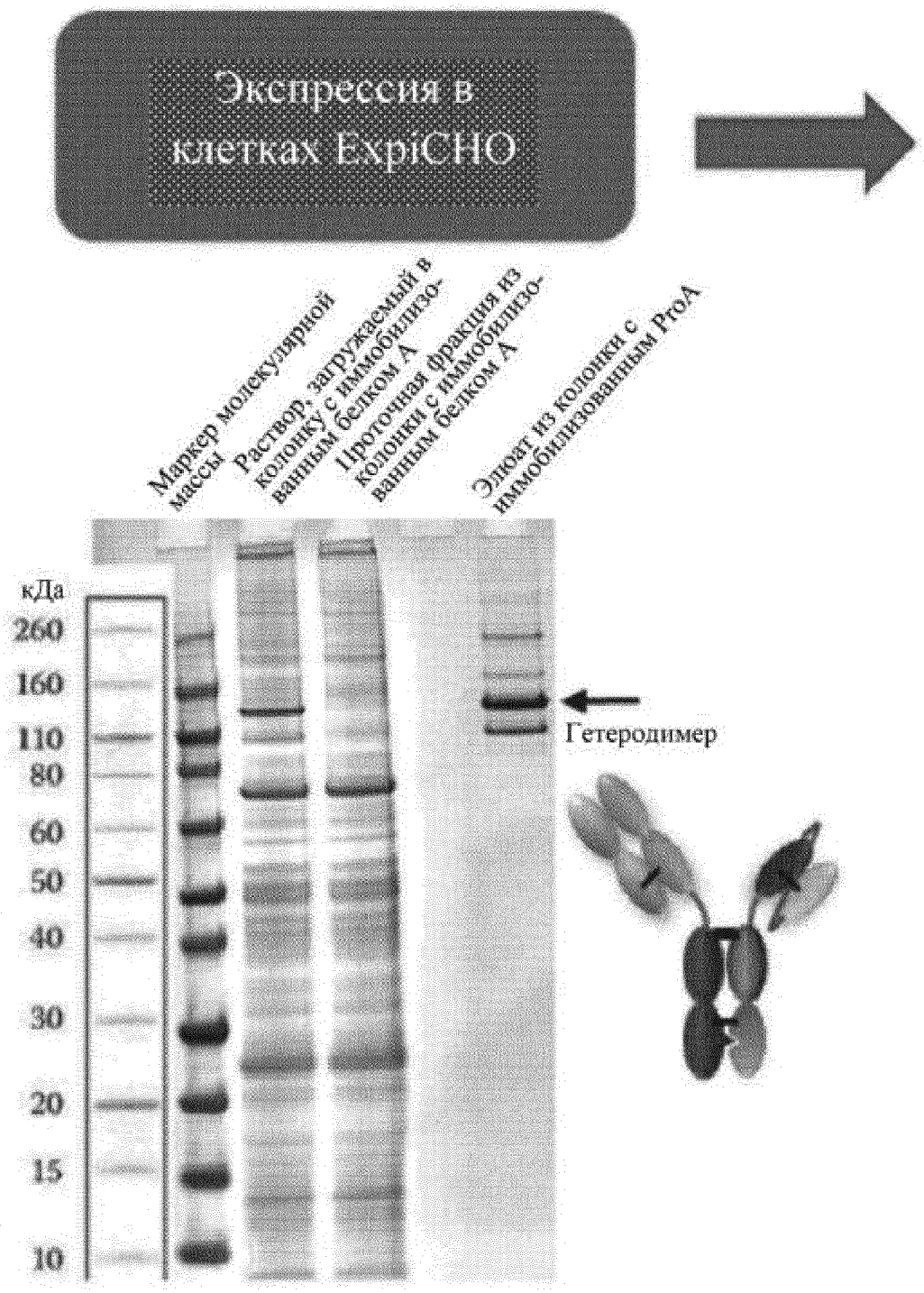

ФИГ. 217 продолжение


Fab, нацеливающийся на NKG2D
scFV, нацеливающийся на CLEC12A
Цепь L
Цепь S
Цепь H

**ФИГ. 218A**


Click to Print Click to
Поверхностный Ag
Интерферон альфа
Интерлейкин 2
Эритропоэтин
Тромбопоэтин
EBV BKRF3
Столбнячный токсин
HA вируса гриппа
Иммуногенные антитела*
Медианное значение для протеома человека
Медианное значение для
Альбумин
Fc-область IgG
Неиммуногенные антитела+
Фибриноген альфа
Бета 2 микроглобулин
Фоллитропин бета
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
Цепь S
Цепь L
Цепь H

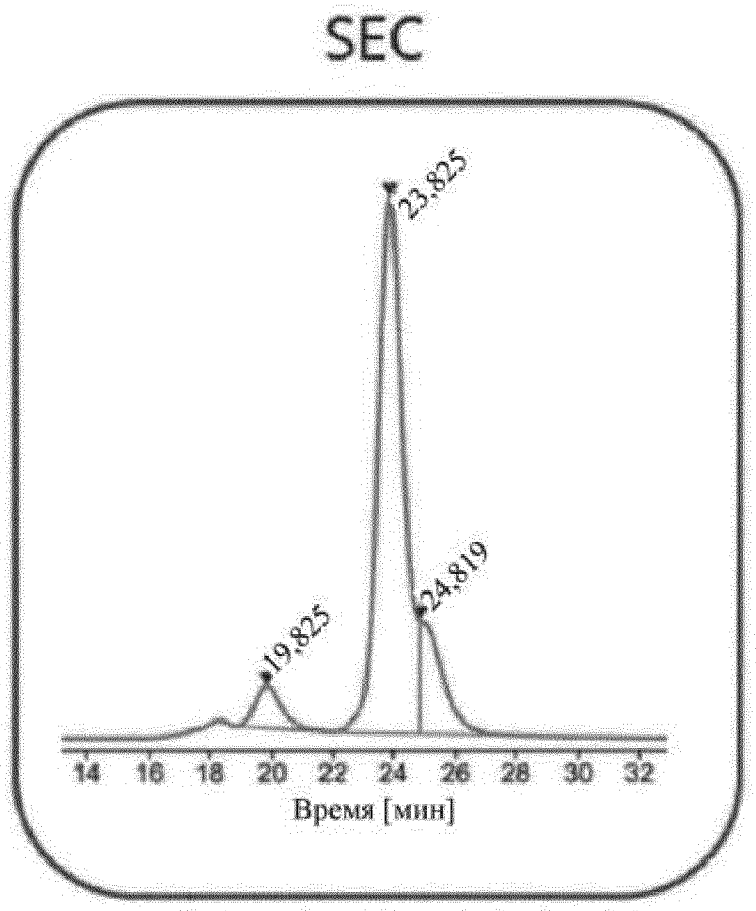
**ФИГ. 218B**




Неоптимизированное соотношение плазмид.

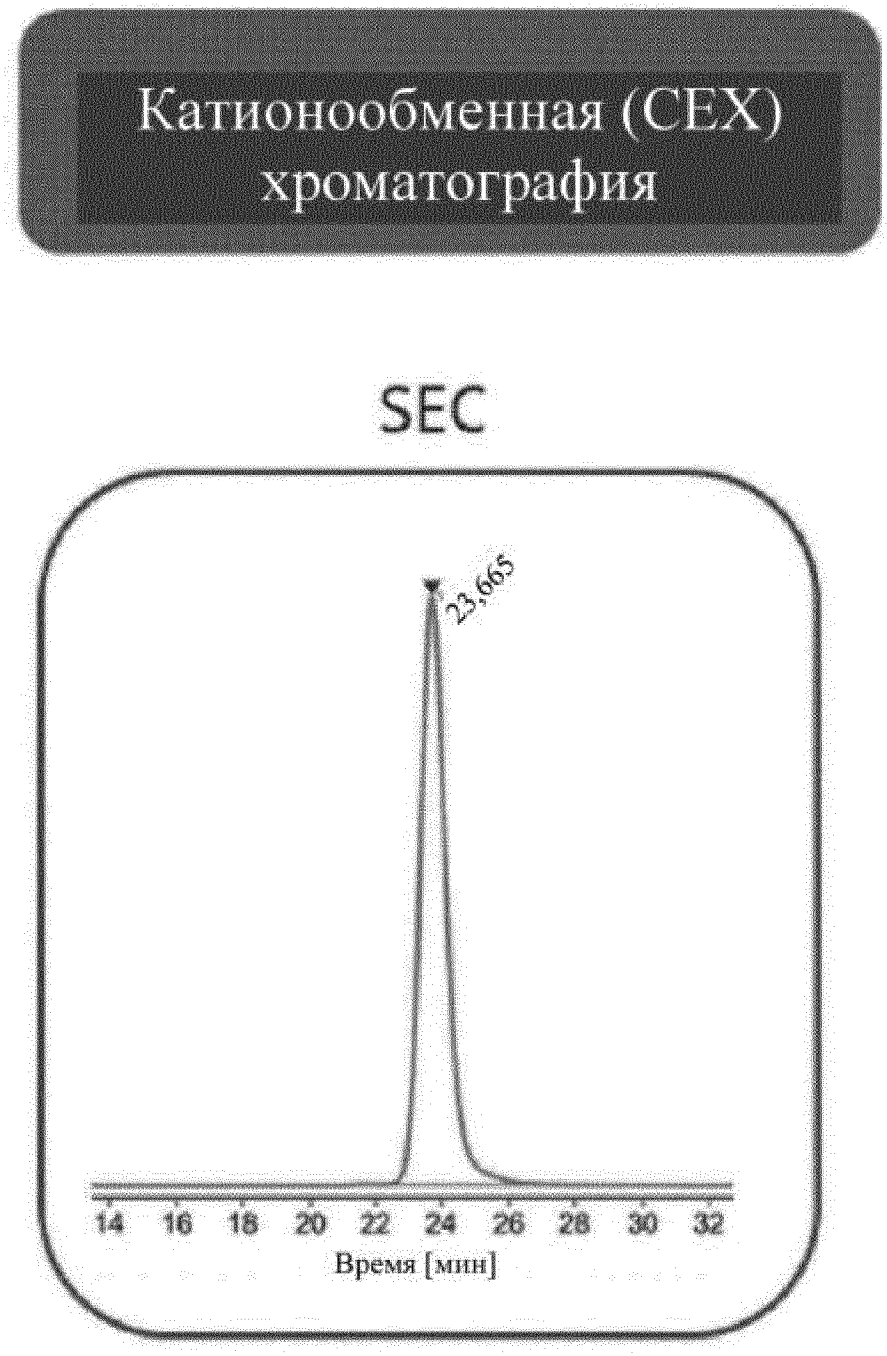
**ФИГ. 219**



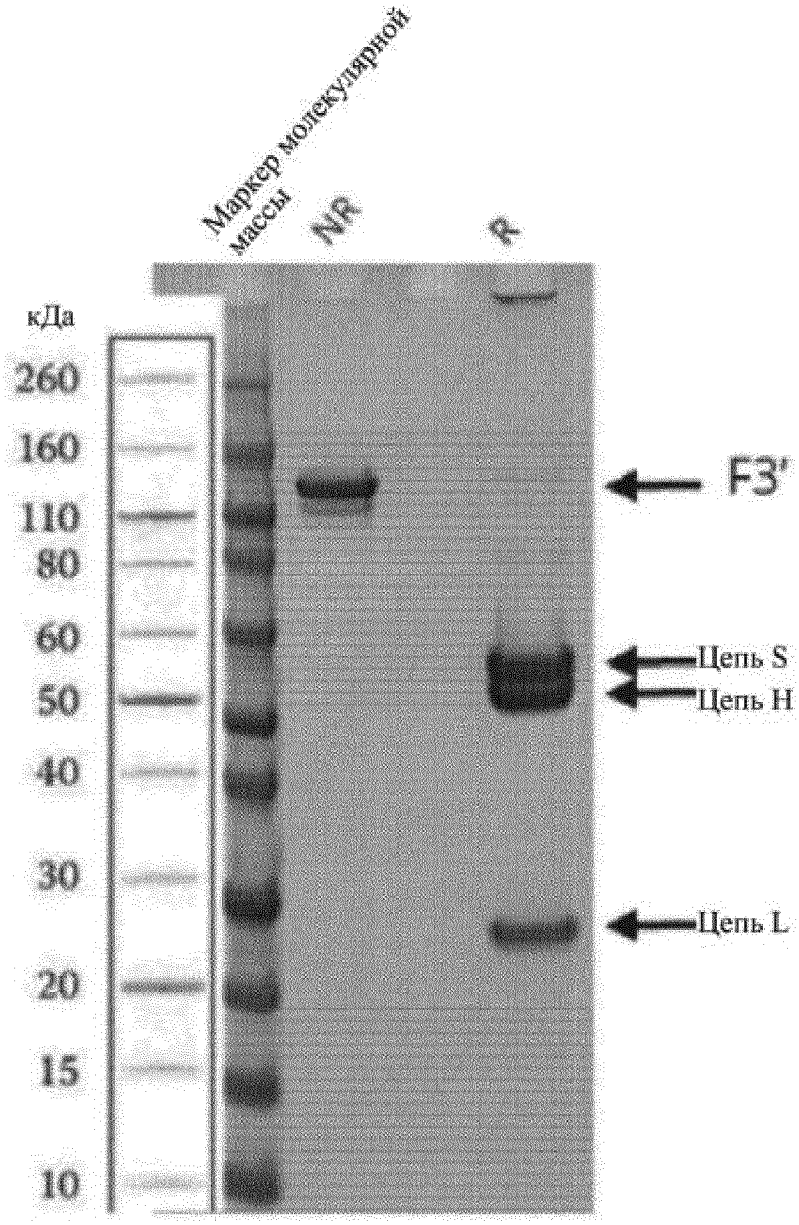




Элюат из колонки с иммобилизованным ProA:
~79% гетеродимера F3'

**ФИГ. 219 продолжение**

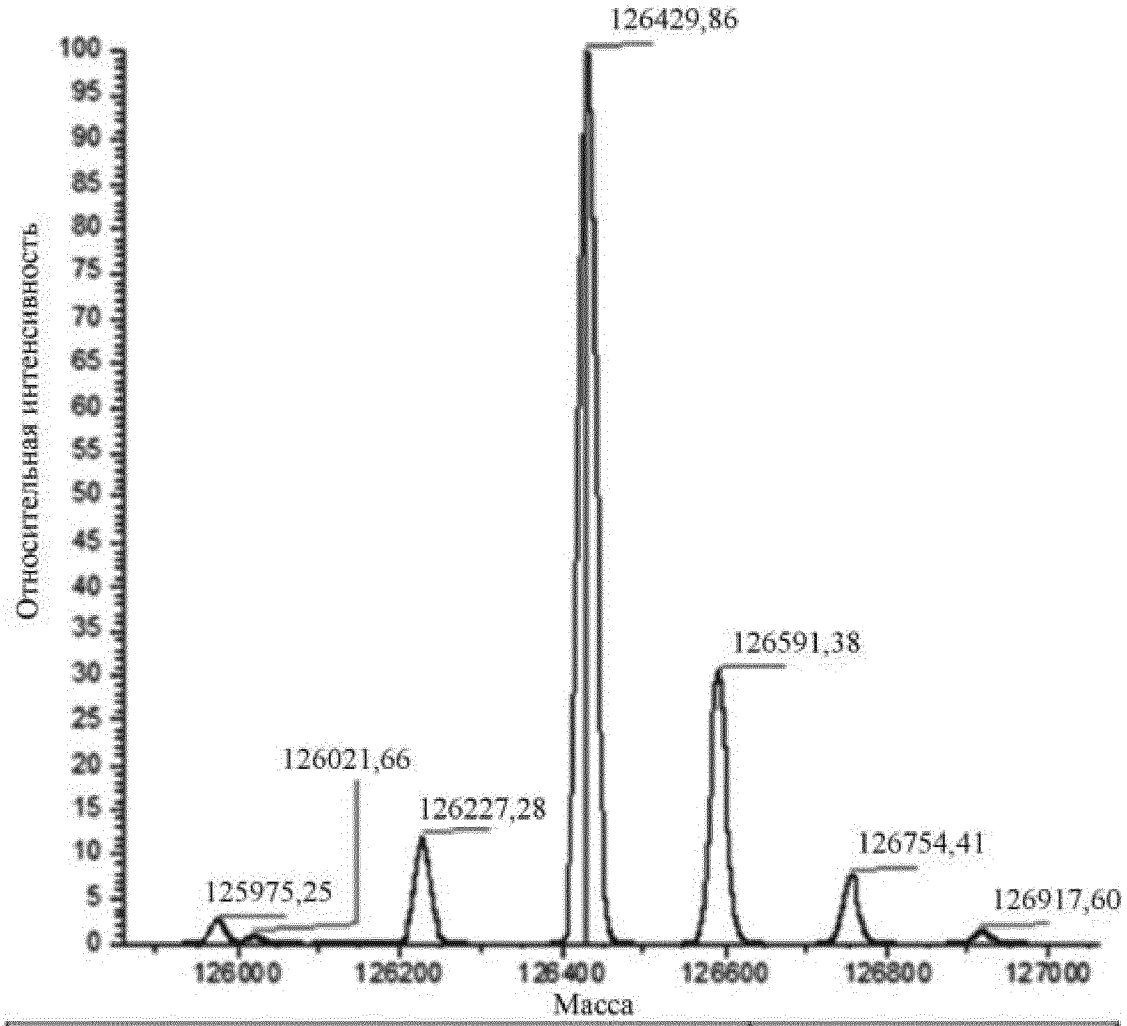



**ФИГ. 219 продолжение**

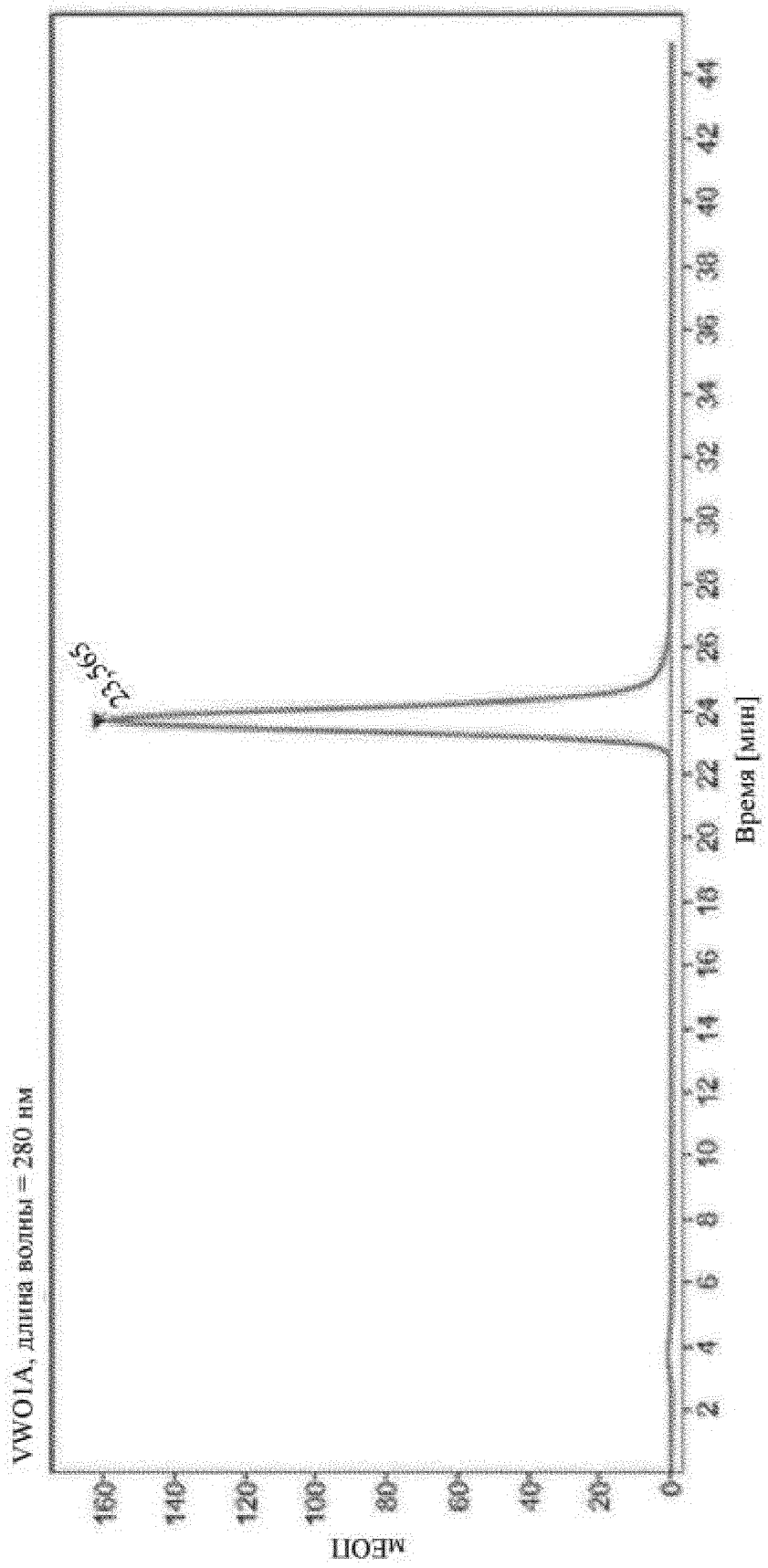



**ФИГ. 219 продолжение**

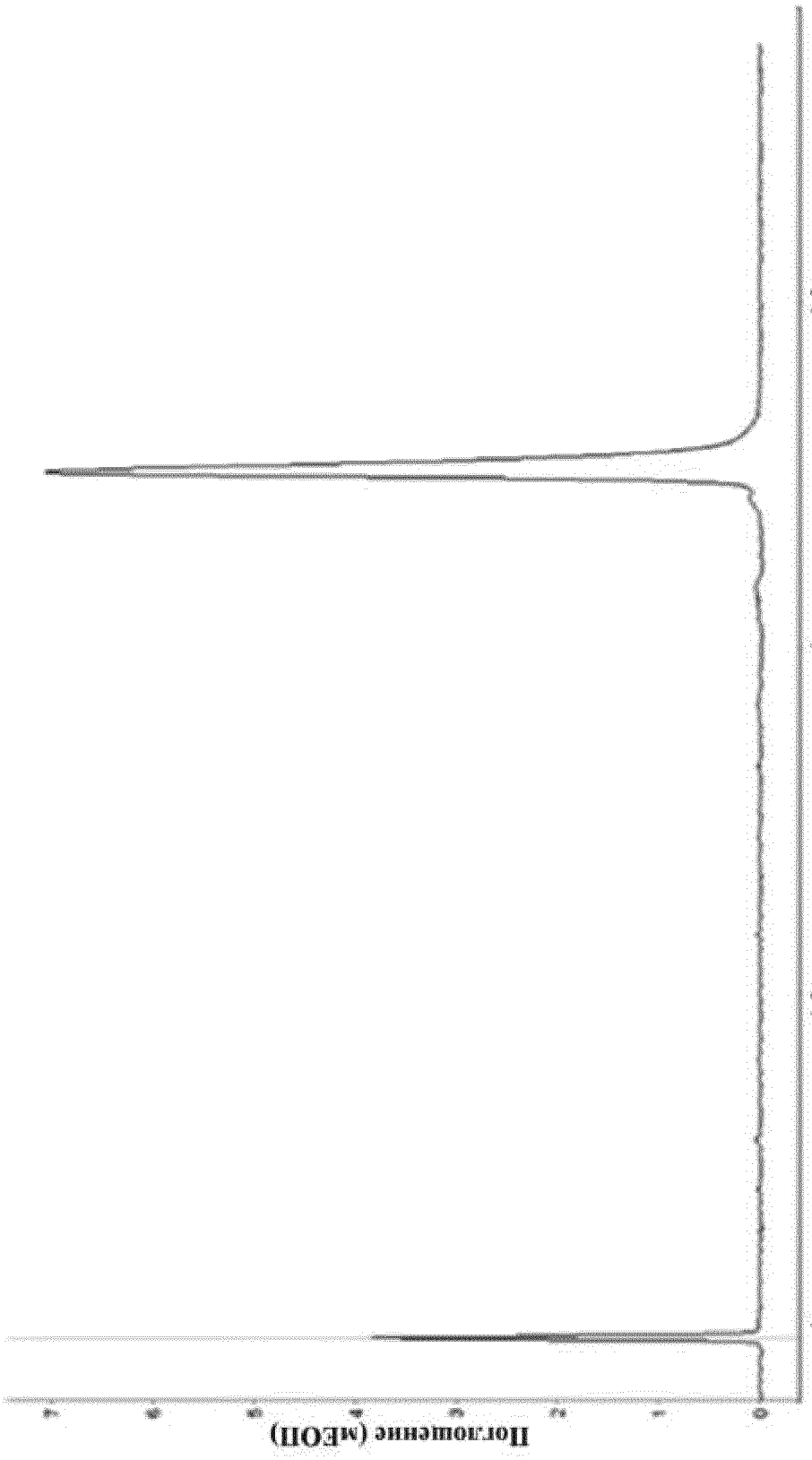
**ФИГ. 220**



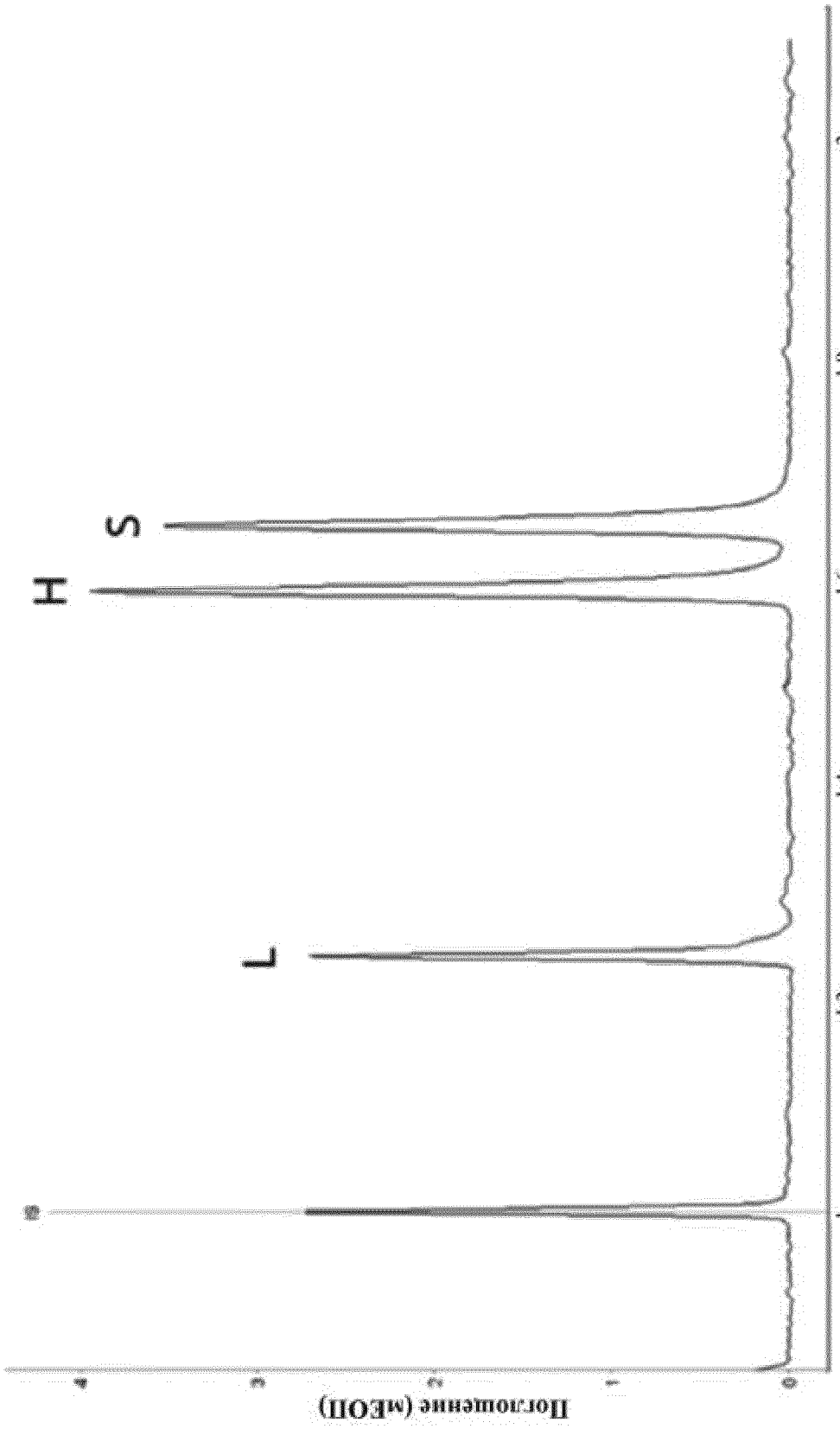

| | |
|---|---|
| Масса интактного антитела (теоретическая) | 126429,5 Да |
| Масса интактного антитела (экспериментальная) | 126429,9 Да |



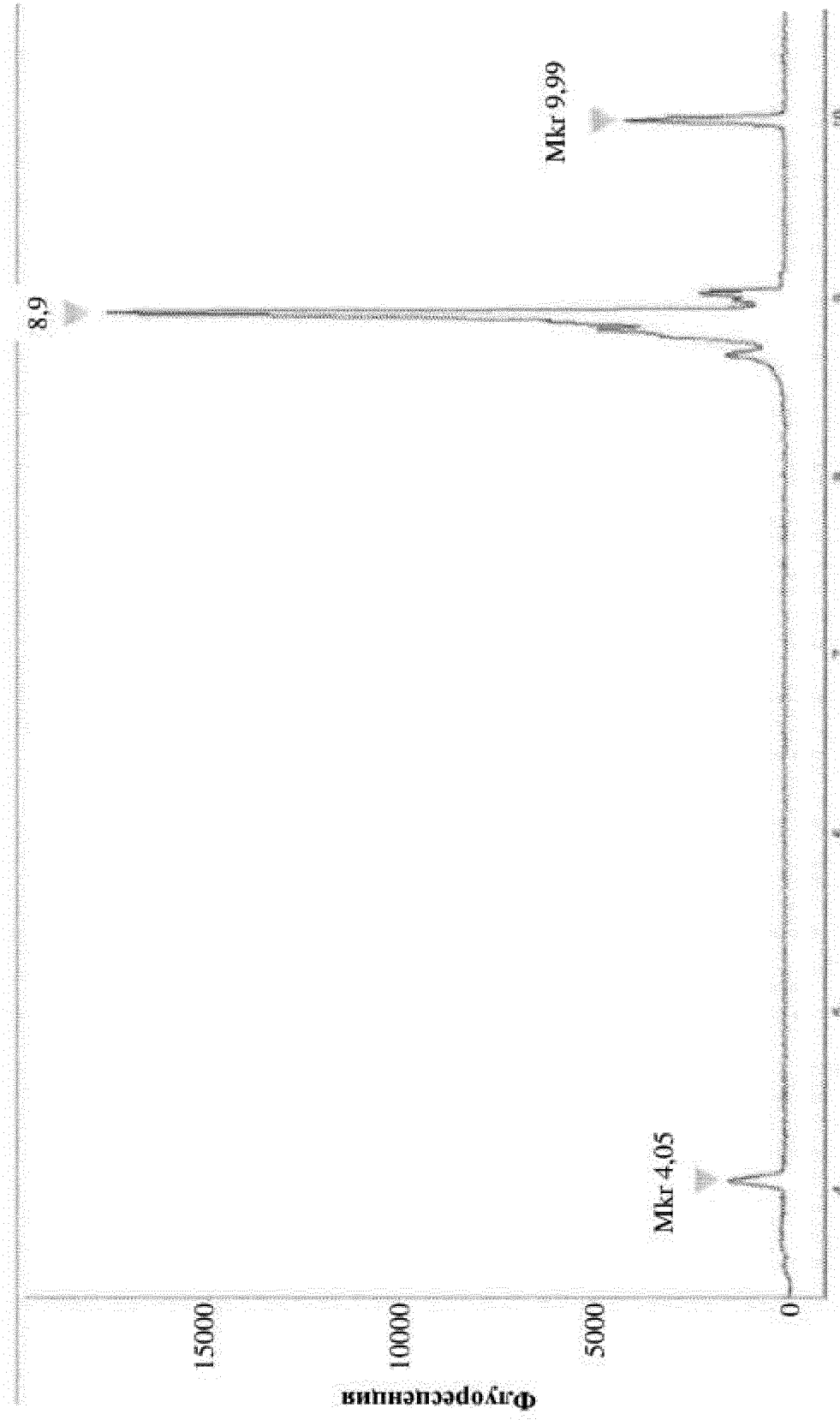

ФИГ. 221



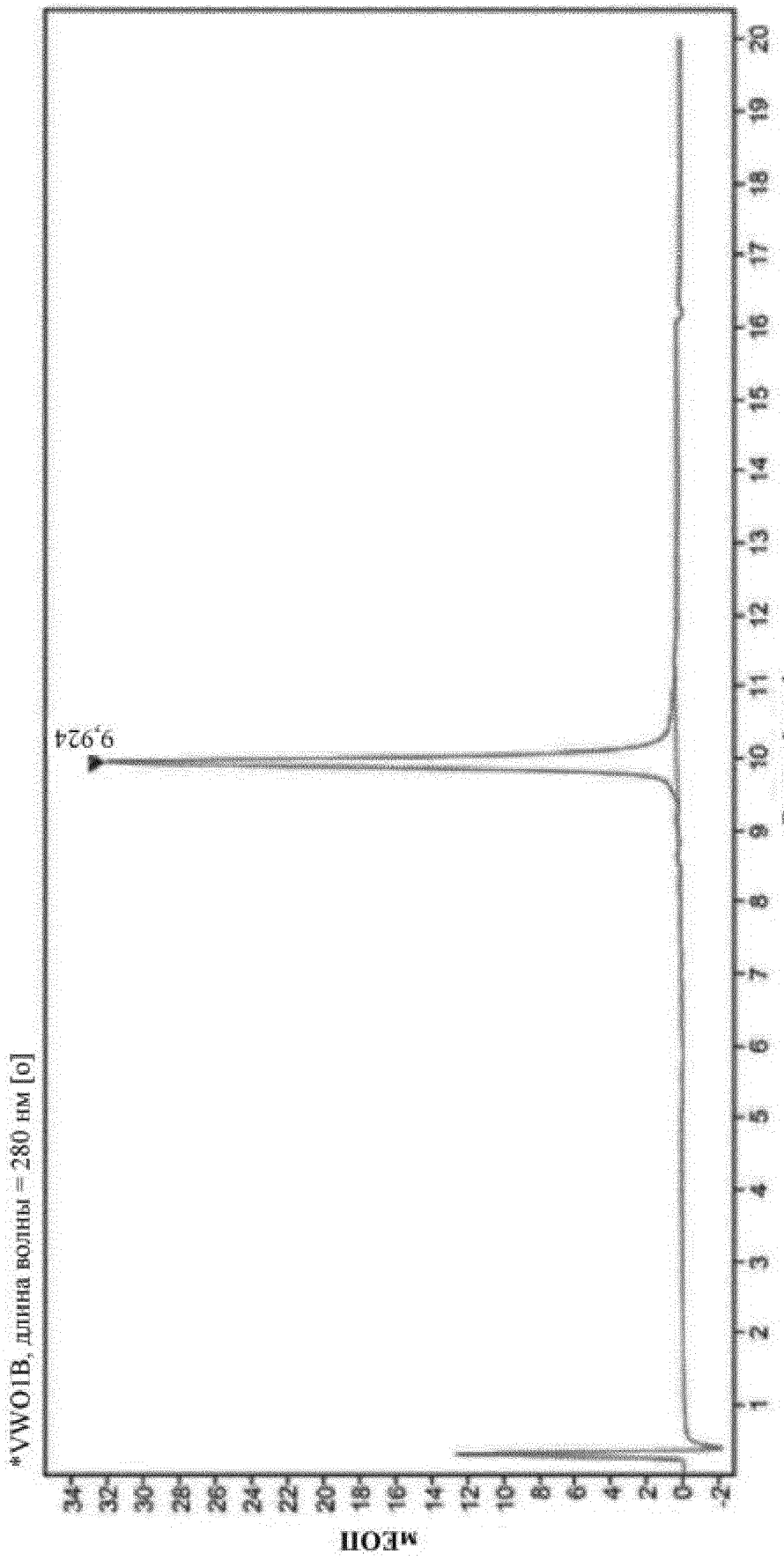

ФИГ. 222



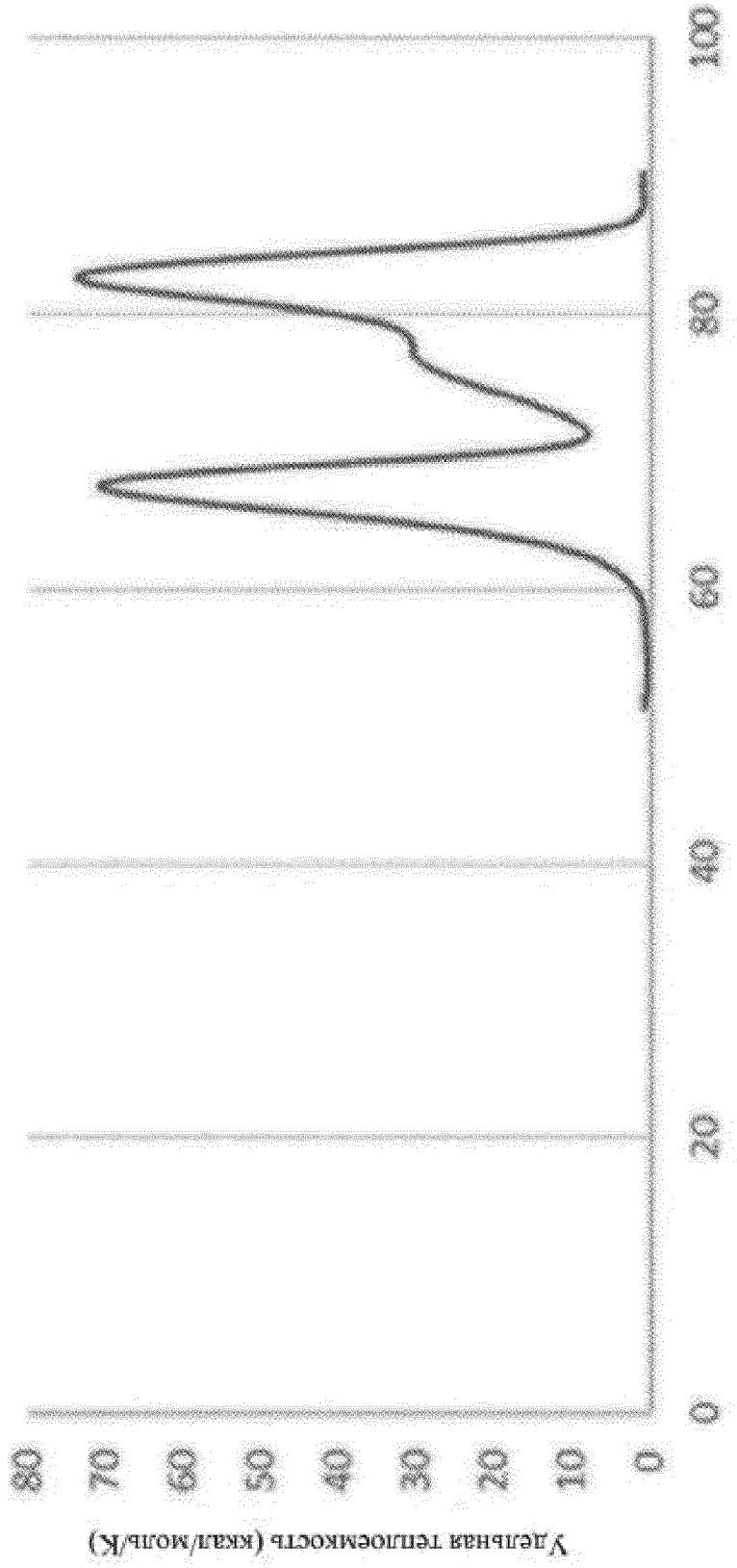

ФИГ. 222 продолжение


Флуоресценция
15000
10000
5000
0
Mkr 4,05
8,9
Mkr 9,99
4
6
8
7
pI
10

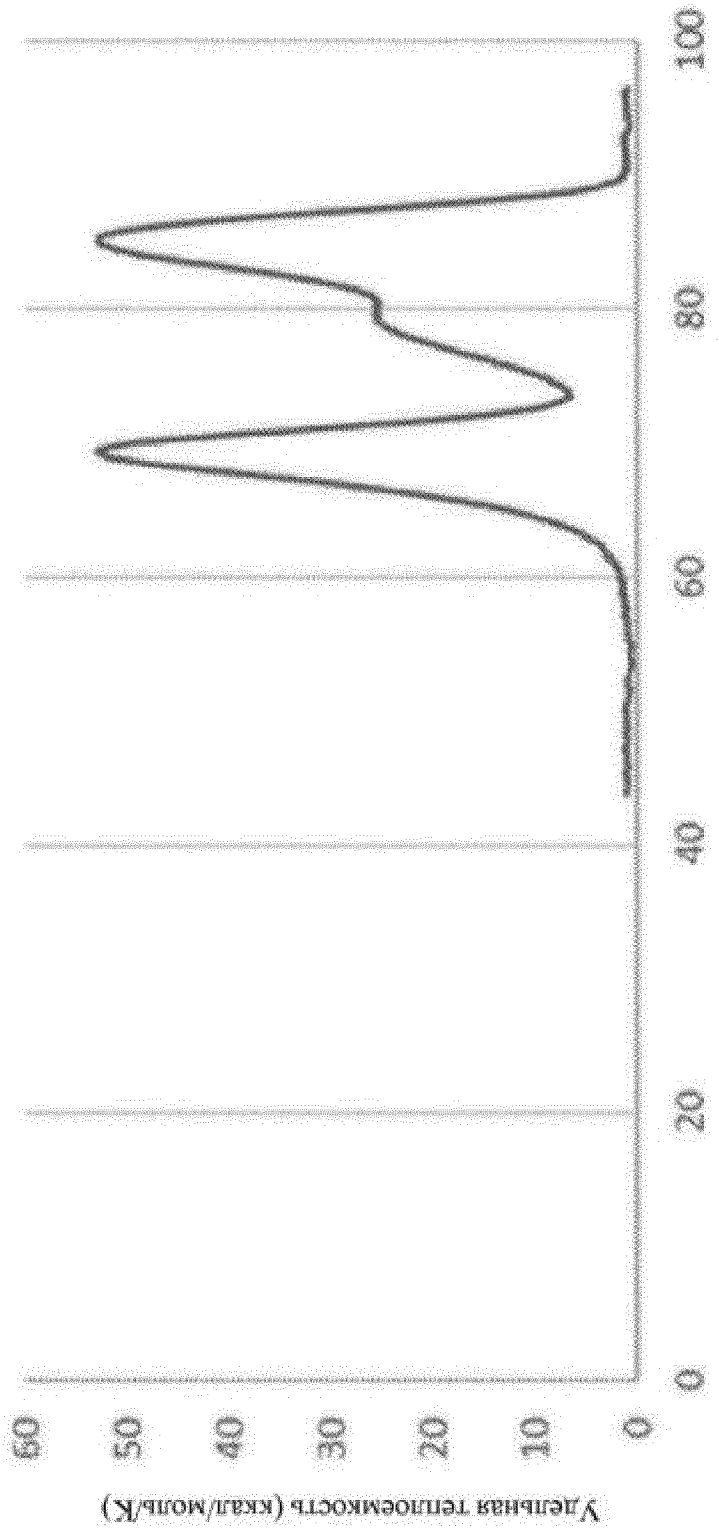
ФИГ. 223



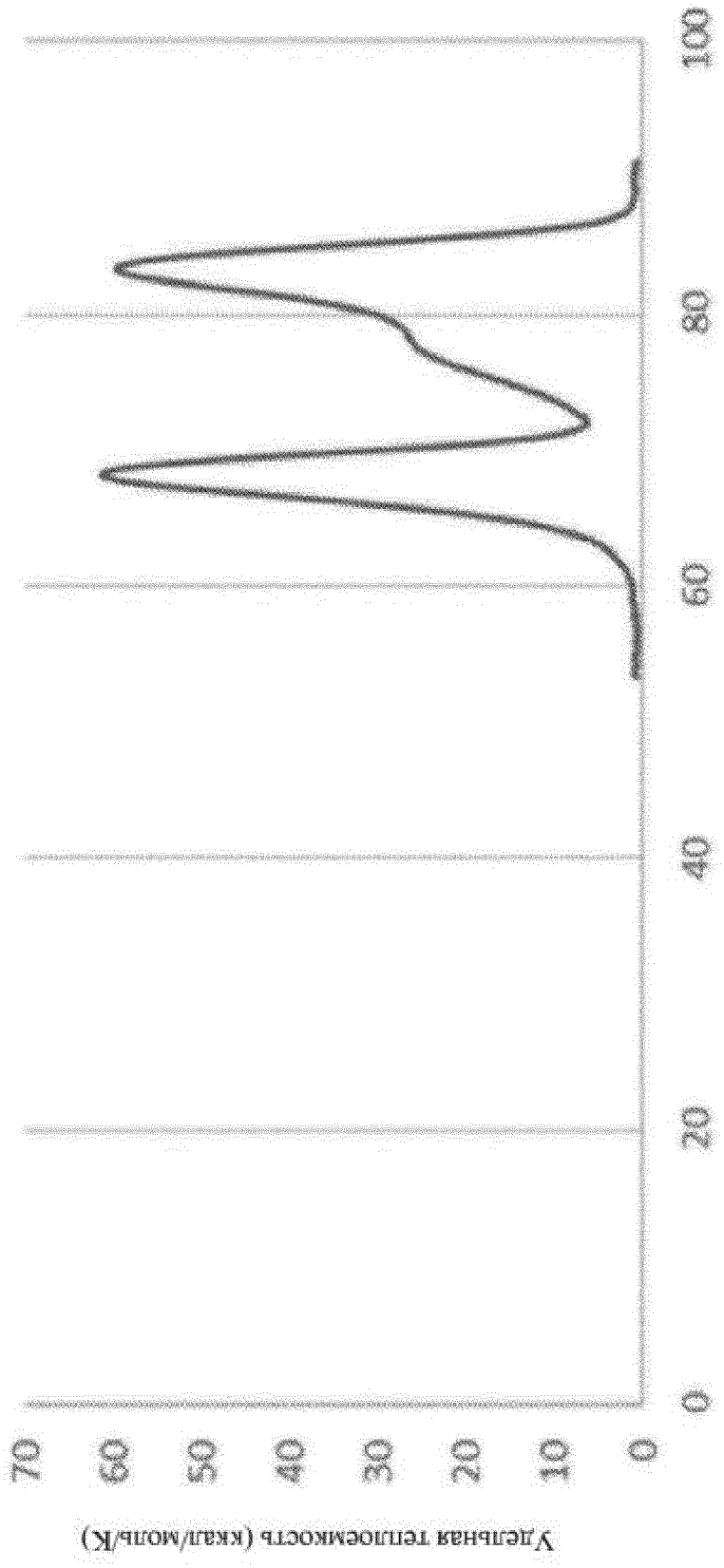

ФИГ. 224


Удельная теплоемкость (ккал/моль/К)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
Температура (°C)

ФИГ. 225А

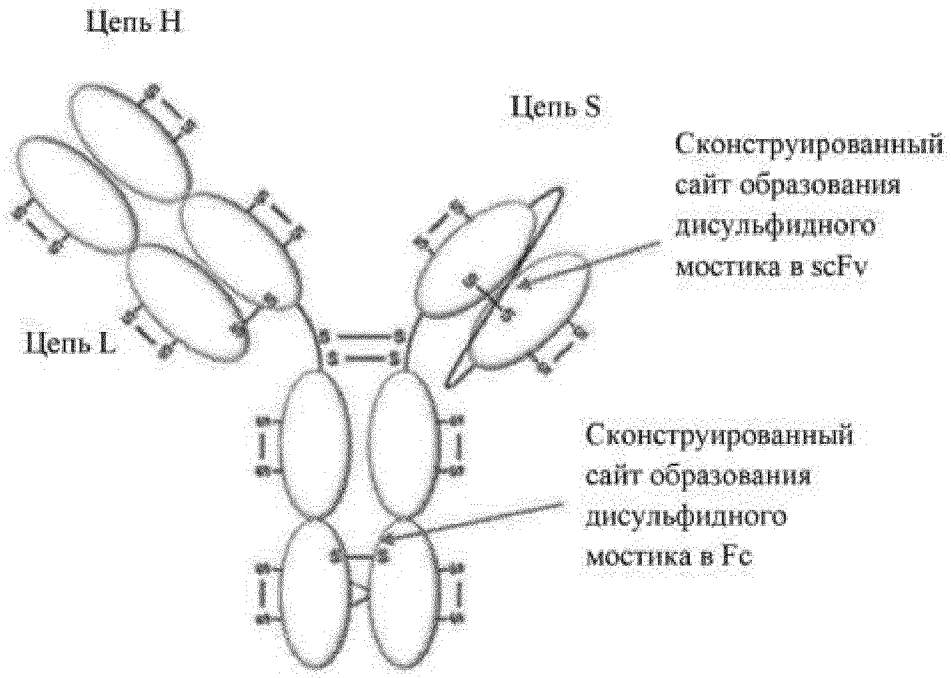

Удельная теплоемкость (ккал/моль/К)
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
Температура (°C)

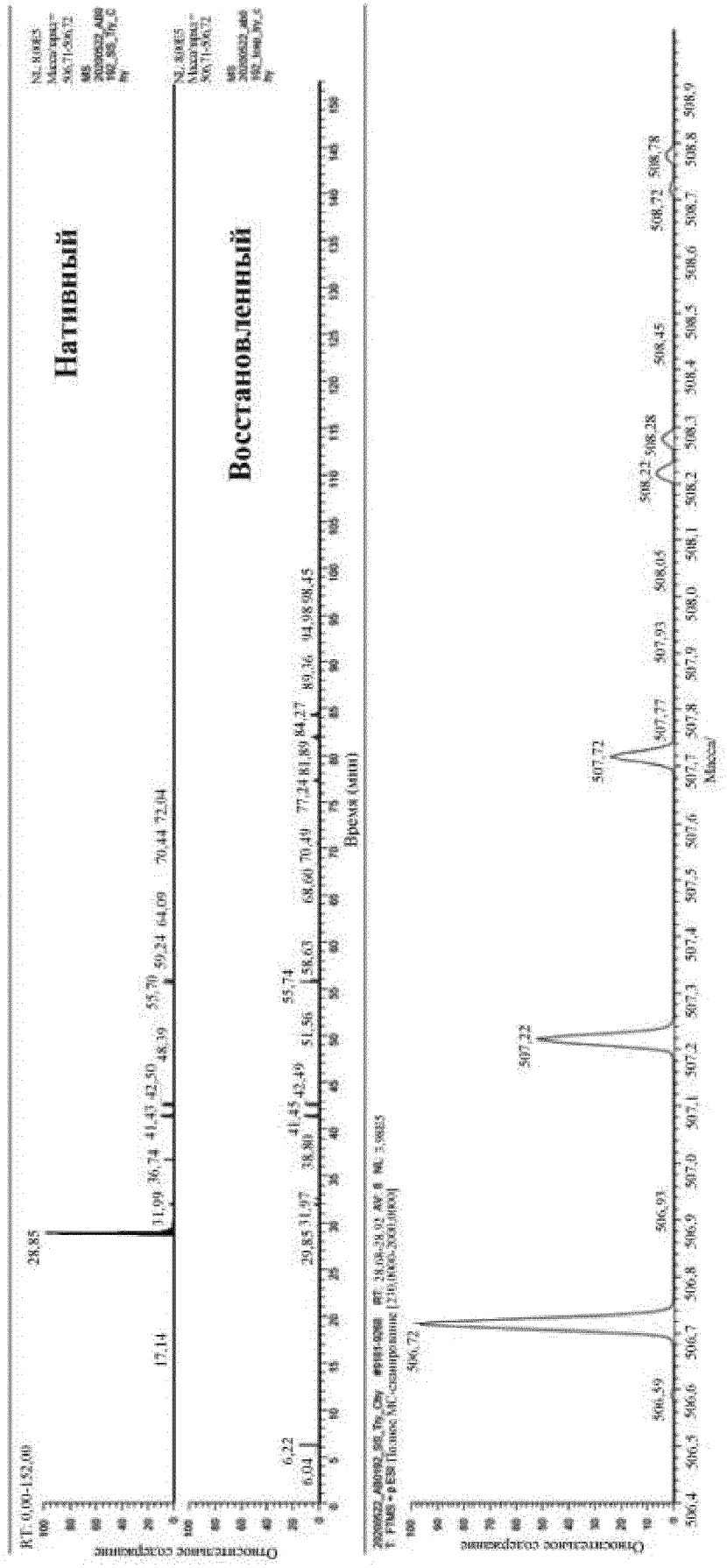
ФИГ. 225В


Удельная теплоемкость (ккал/моль/К)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
Температура (°C)

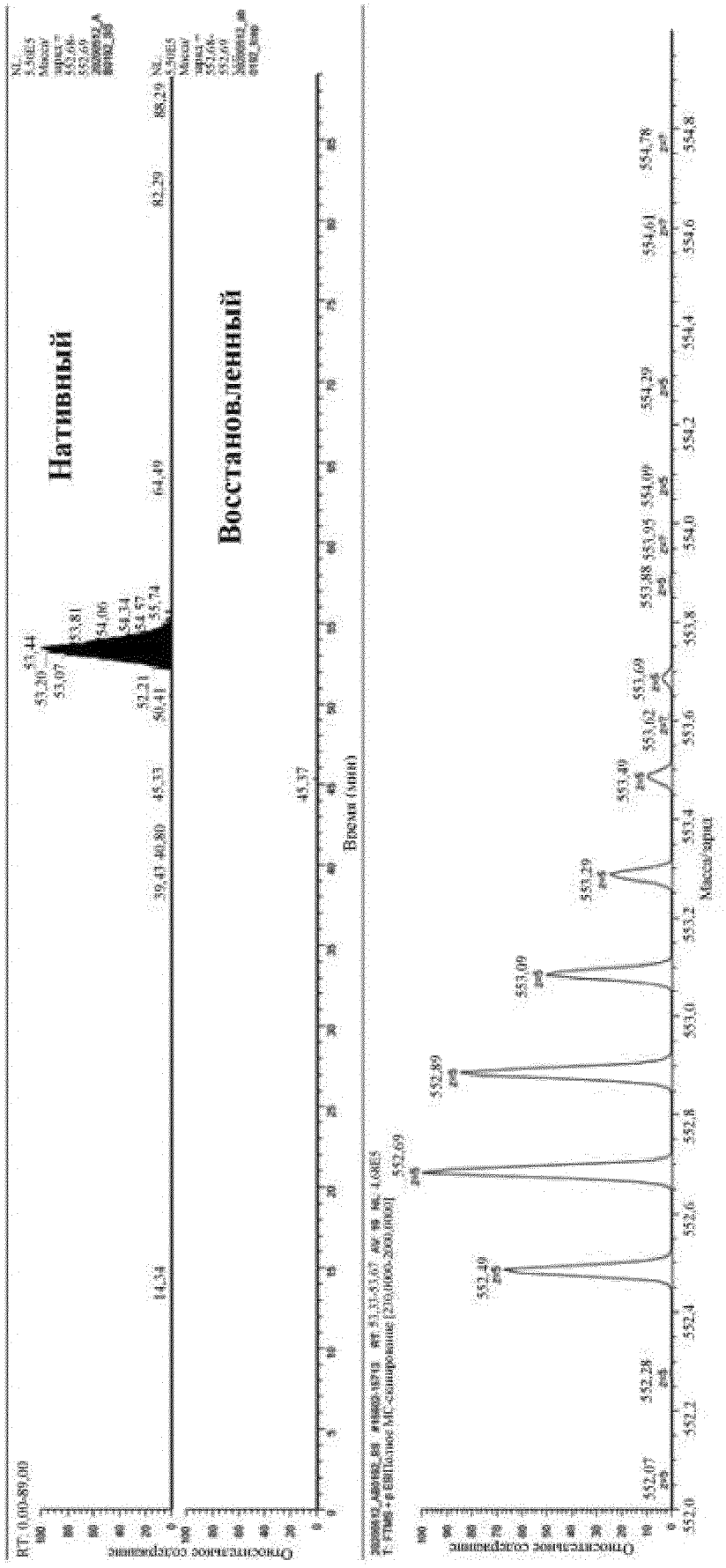
ФИГ. 225С

**ФИГ. 226**

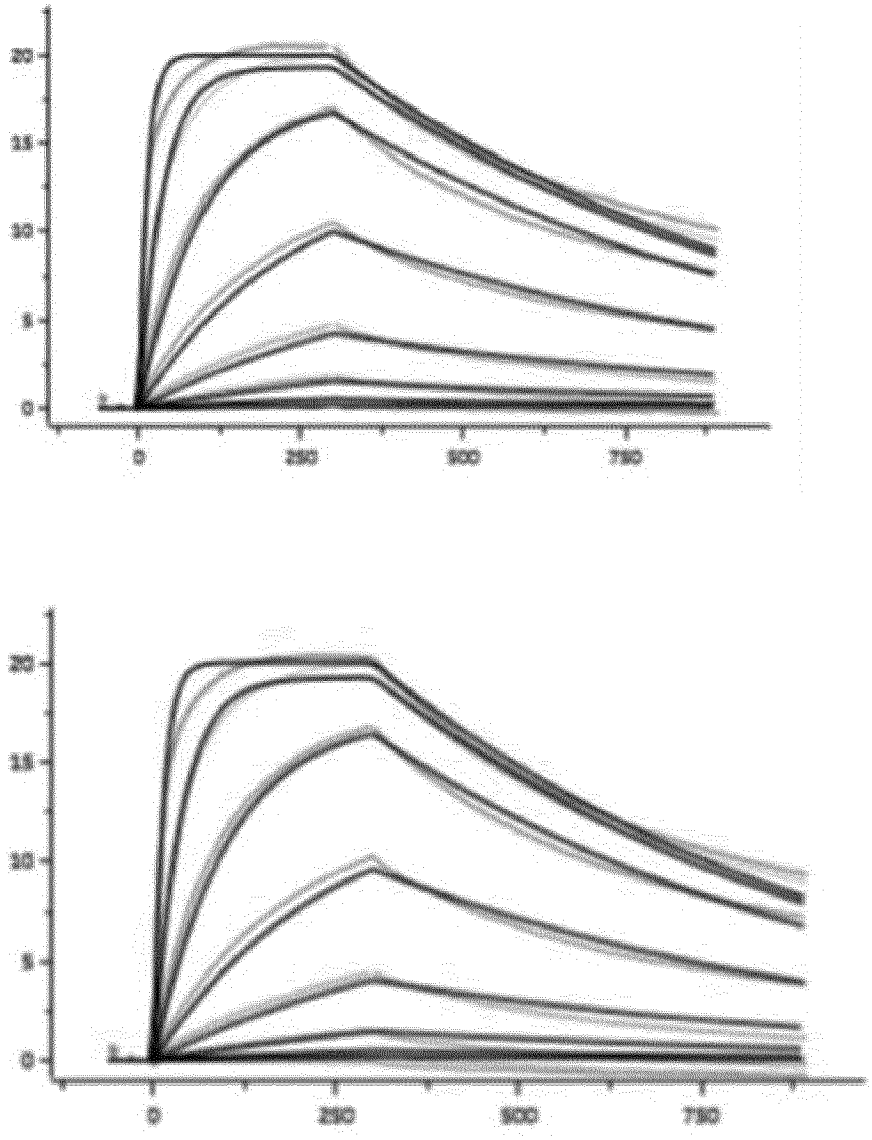

Цепь H
Цепь S
Сконструированный сайт образования дисульфидного мостика в scFv
Цепь L
Сконструированный сайт образования дисульфидного мостика в Fc


Нативный
Восстановленный
Относительное содержание
Время (мин)
Масса

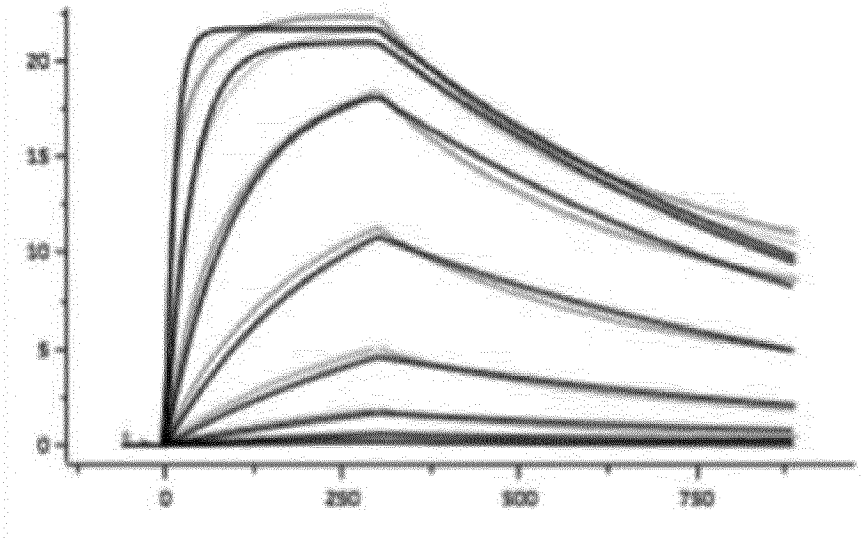
ФИГ. 227


Нативный
Восстановленный
Относительное содержание
Время (мин)
Масса/заряд

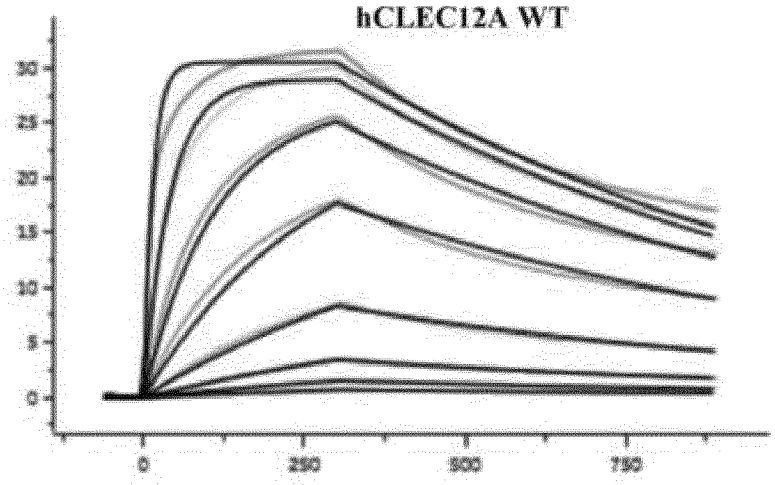
ФИГ. 228



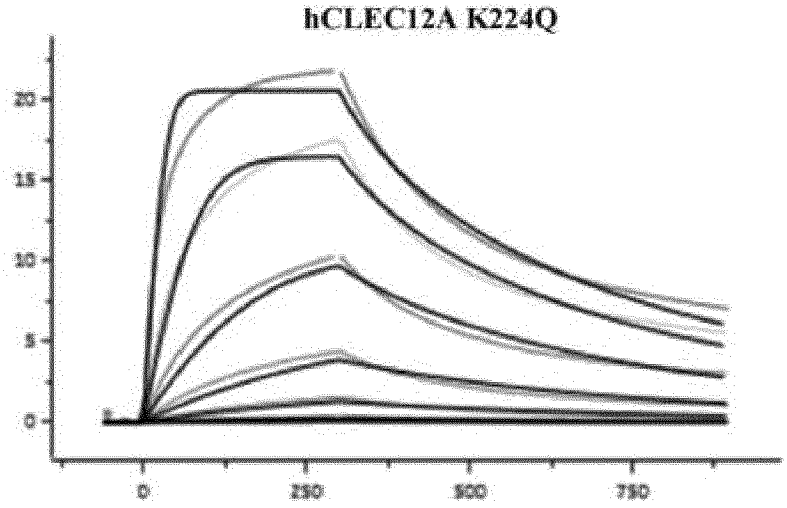

ФИГ. 229




**ФИГ. 229 продолжение**

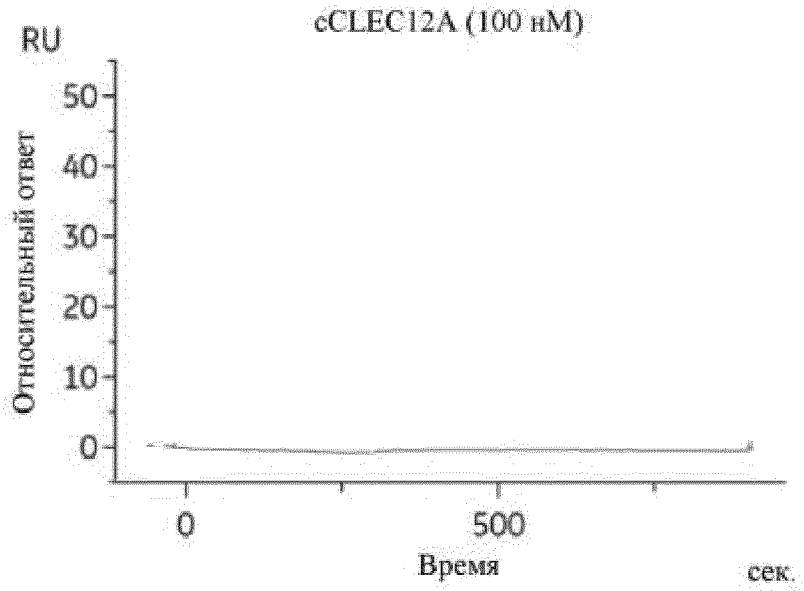



Группа 9
hCLEC12A-His; AB0192; связывание 1:1



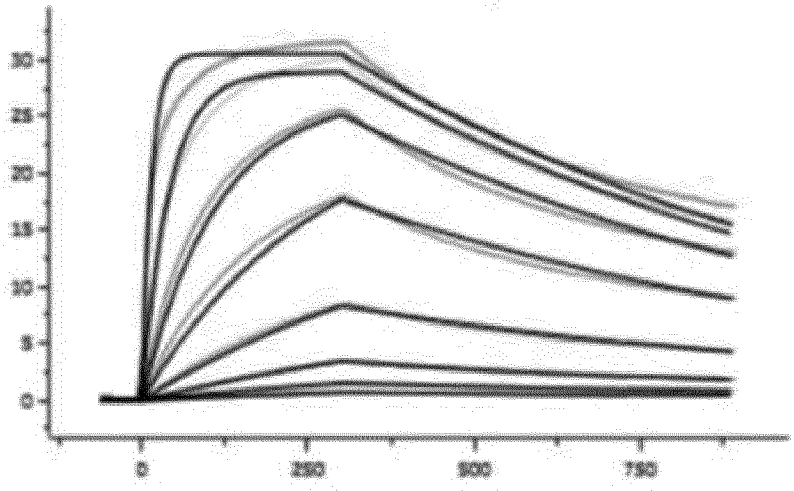

Группа 4
hCLEC12A K224Q; AB0192; связывание 1:1

**ФИГ. 230**



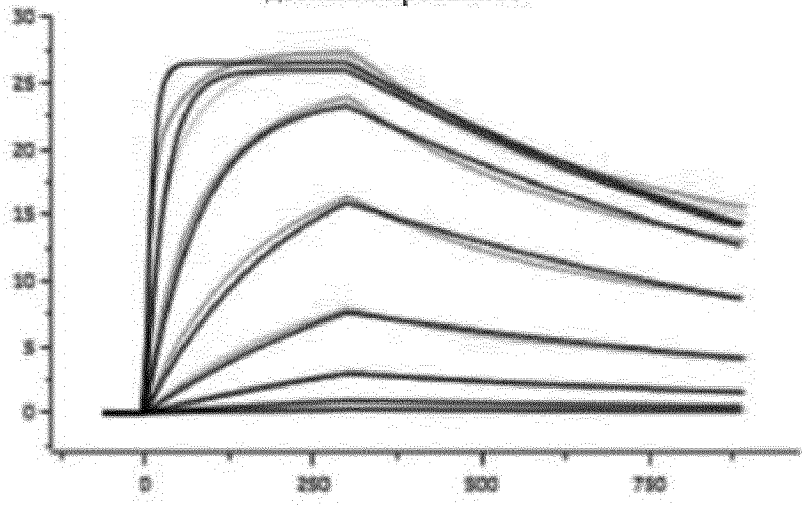

**ФИГ. 230 продолжение**

hCLEC12A, без обработки



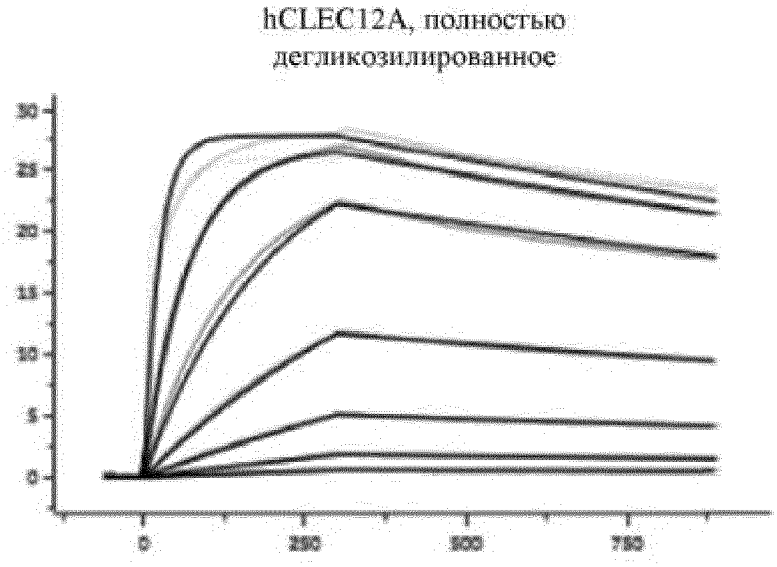
Группа 9
hCLEC12A-His; AB0192; связывание 1:1

hCLEC12A,
десиалилированное



Группа 4
Десиалилированное hCLEC12A-His; AB0192;
связывание 1:1

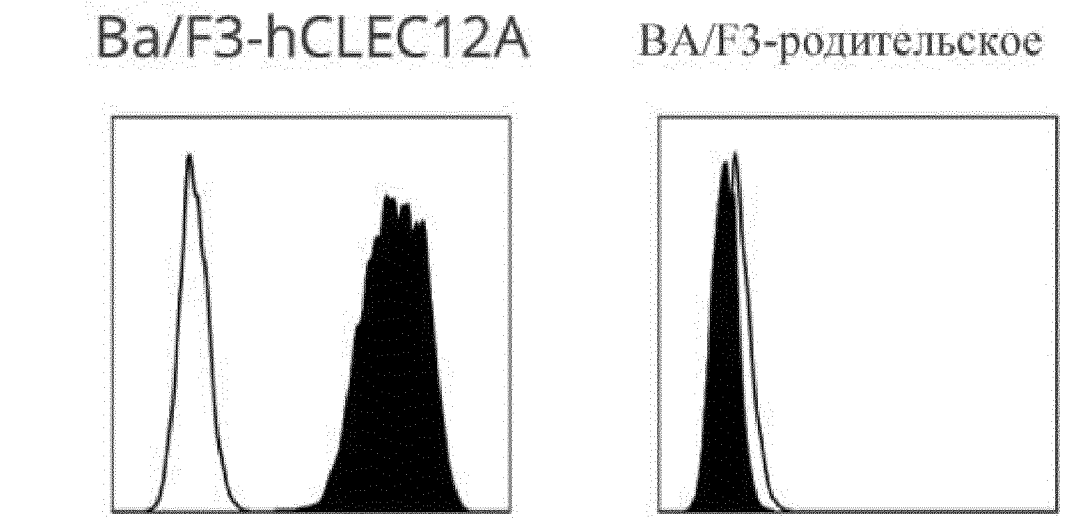
**ФИГ. 231**




Группа 2
Дегликозилированное hCLEC12A-His; AB0192;
связывание 1:1

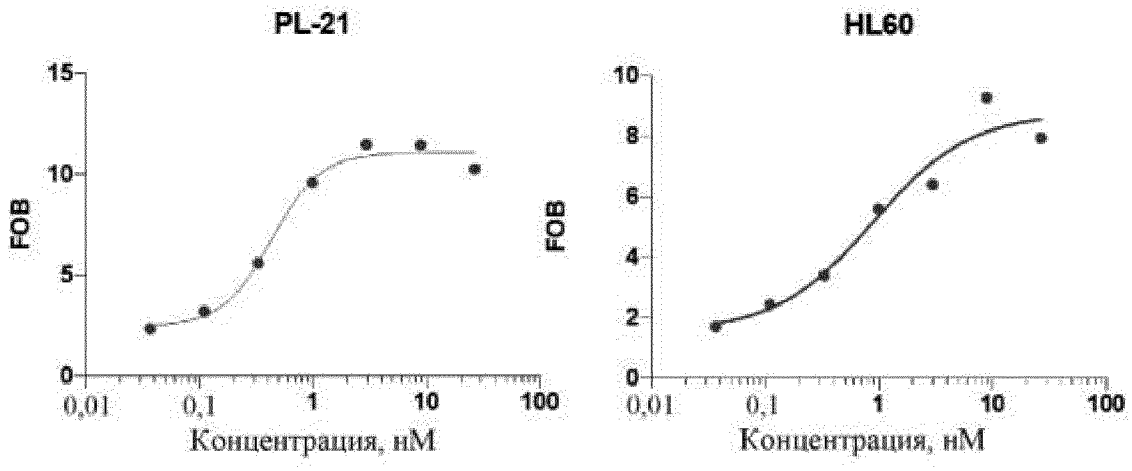
**ФИГ. 231 продолжение**

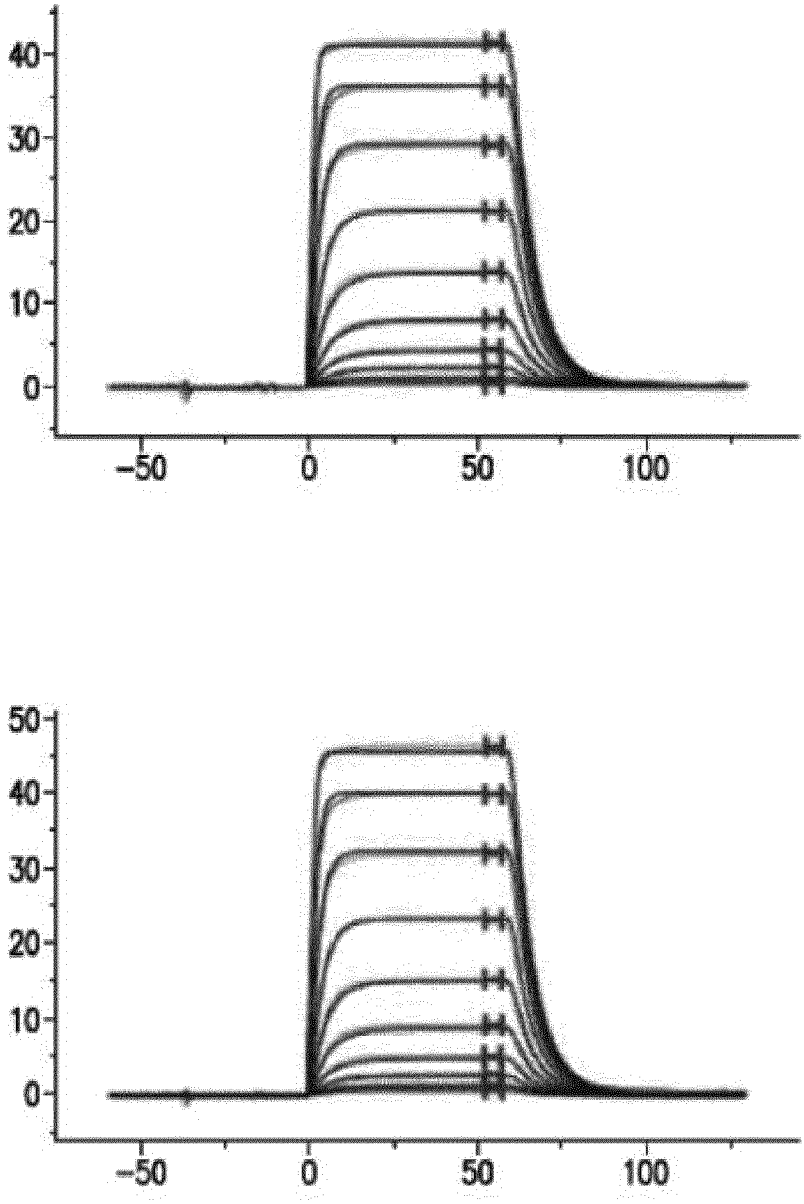
**ФИГ. 232**



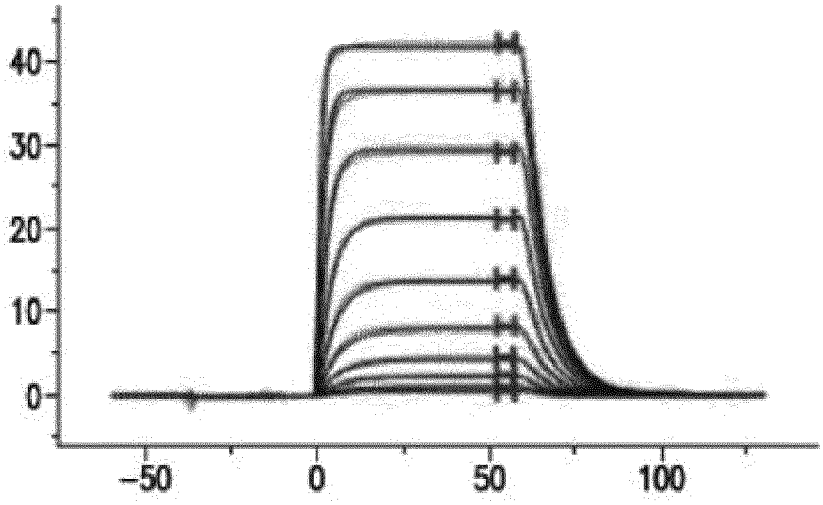

Без заливки = изотип hIgG1

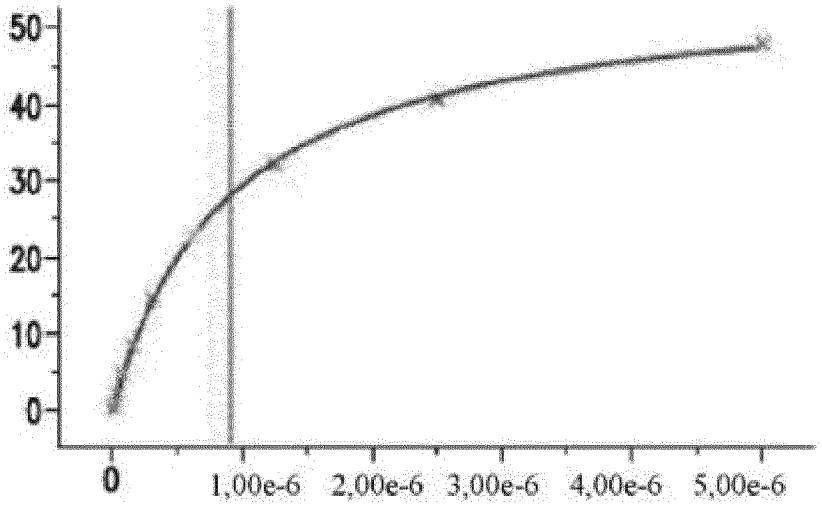
Заливка черным: AB0192





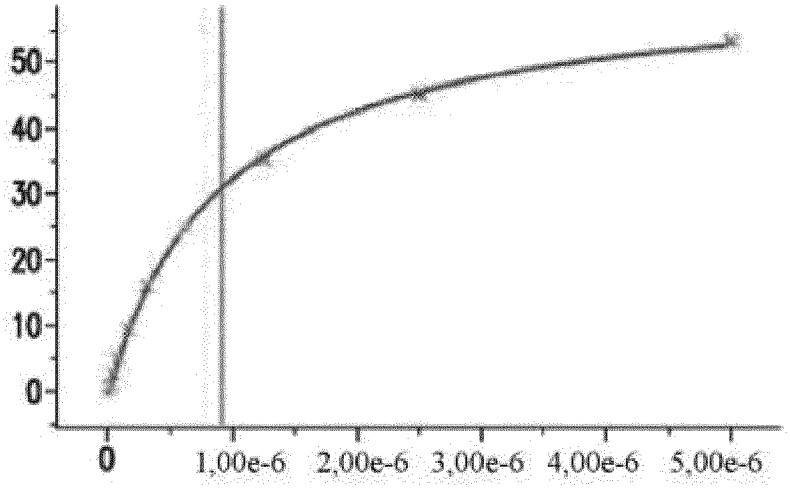

**ФИГ. 233**



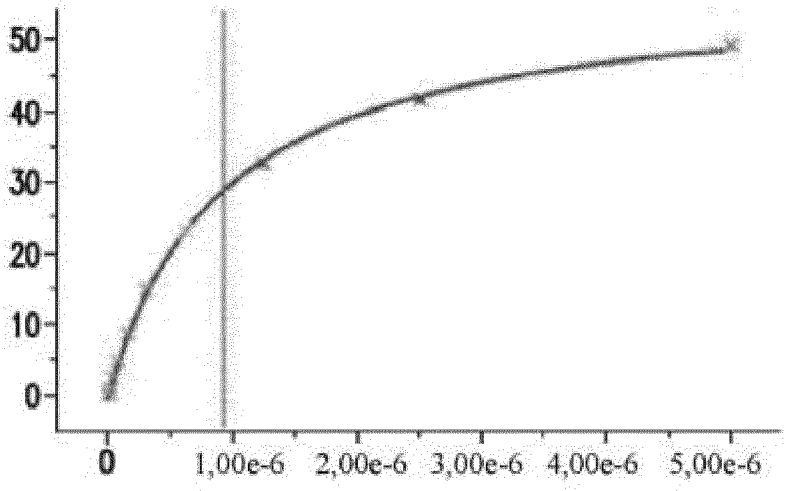




Группа 7
AB0192-005; mFc-cNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

**ФИГ. 233 продолжение**

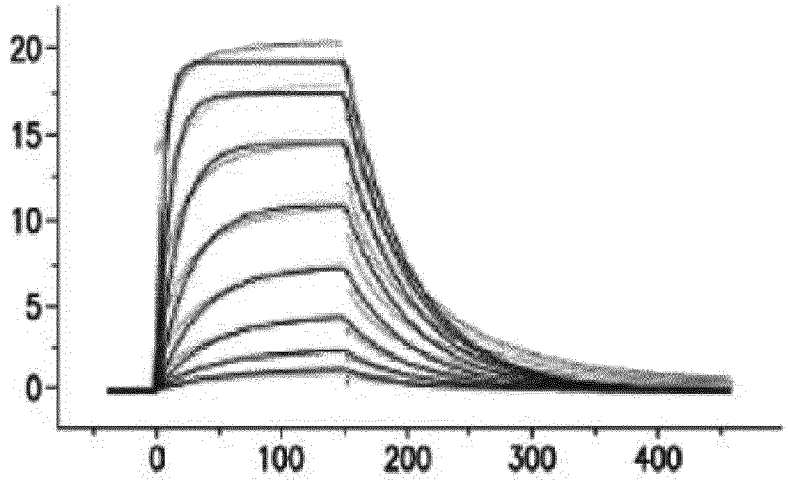



Группа 8
AB0192-005; mFc-cNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

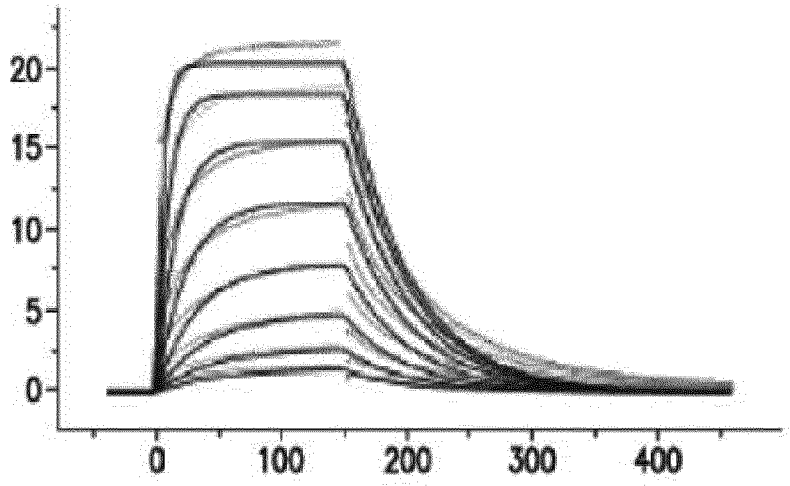



Группа 9
AB0192-005; mFc-cNKG2D; аффинность в стационарном состоянии

**ФИГ. 233 продолжение**

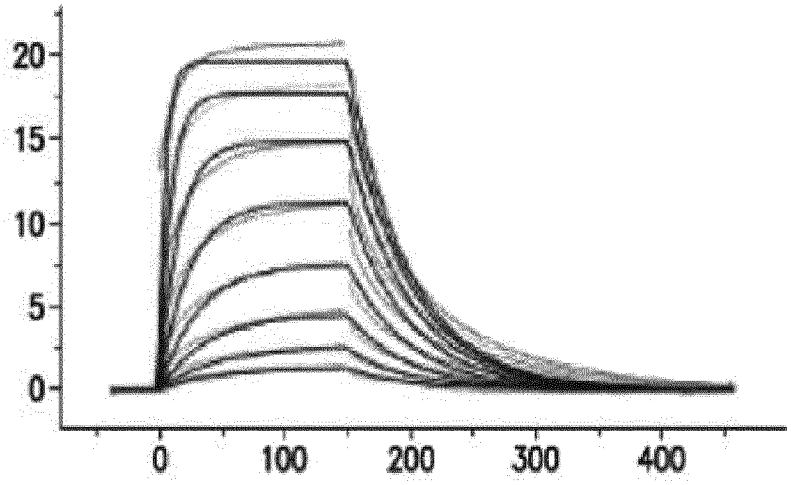



Группа 13
AB0192-005; связывание 1:1

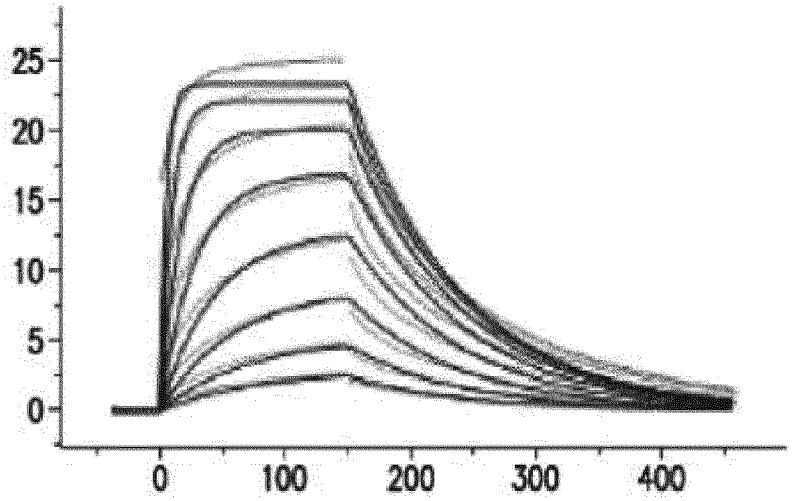



Группа 14
AB0192-005; связывание 1:1

**ФИГ. 234 продолжение**

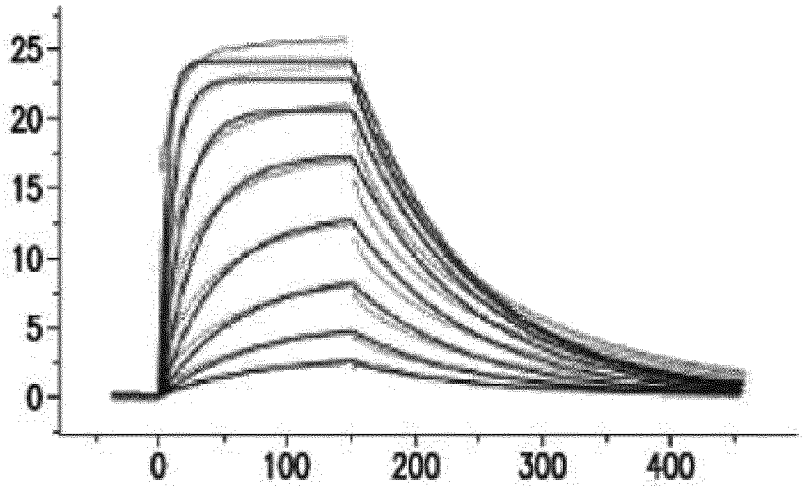



Группа 15
AB0192-005; связывание 1:1

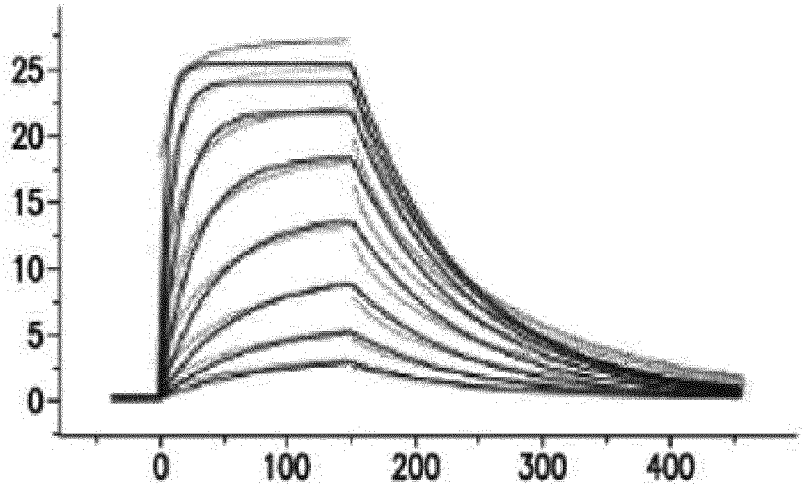



Группа 25
трастузумаб; связывание 1:1

**ФИГ. 234 продолжение**

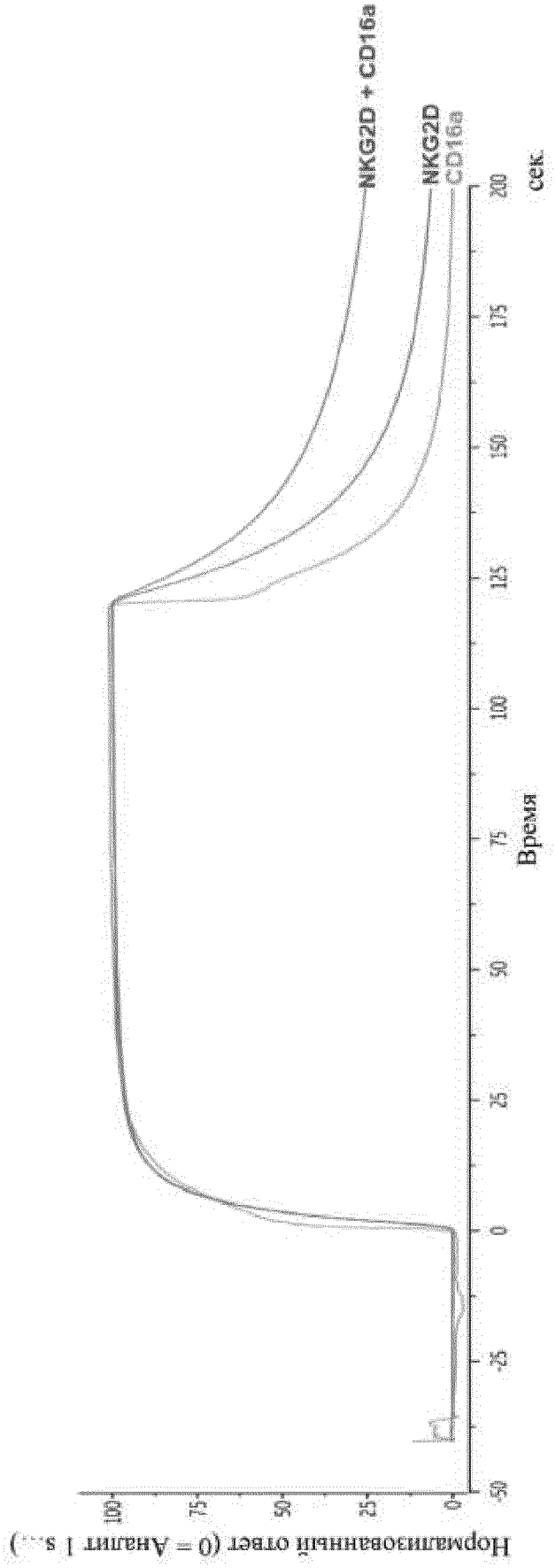



Группа 26
трастузумаб; связывание 1:1

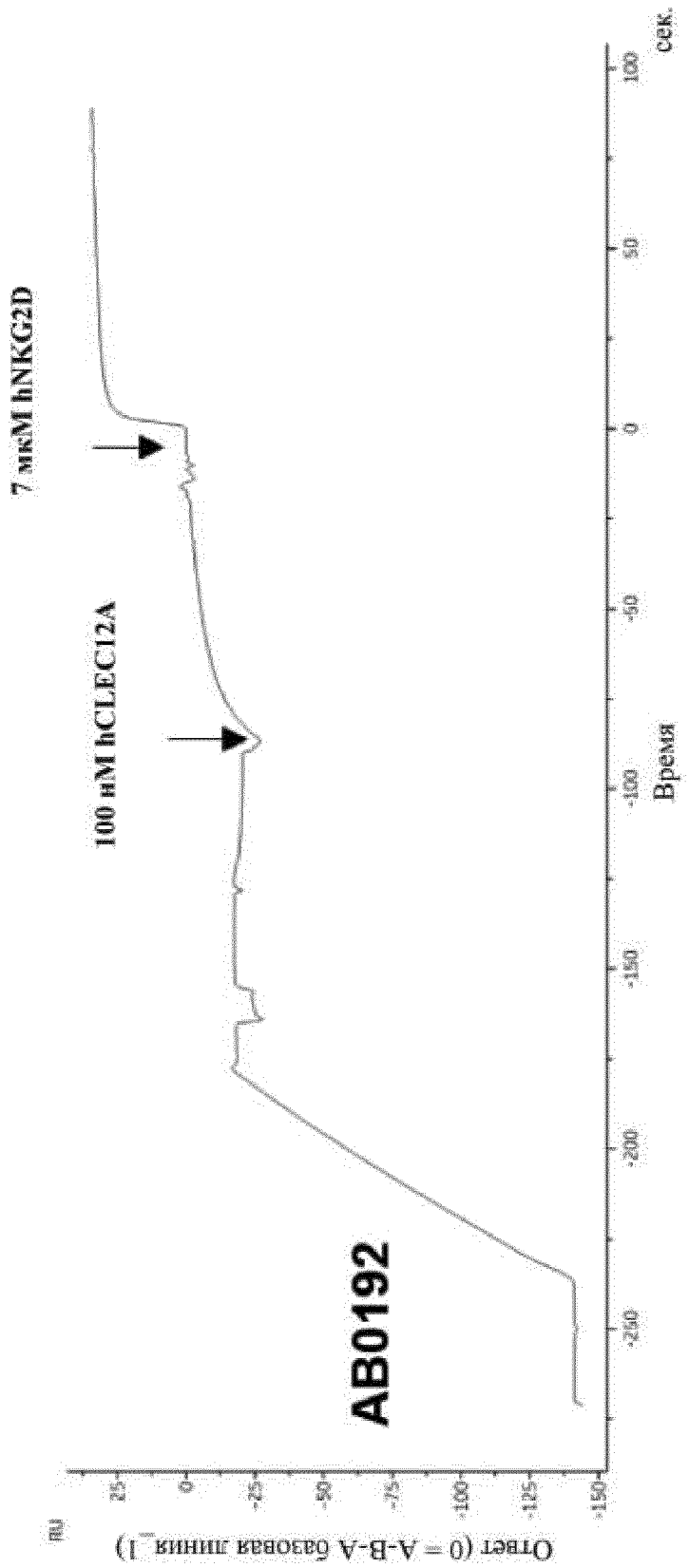



Группа 27
трастузумаб; связывание 1:1

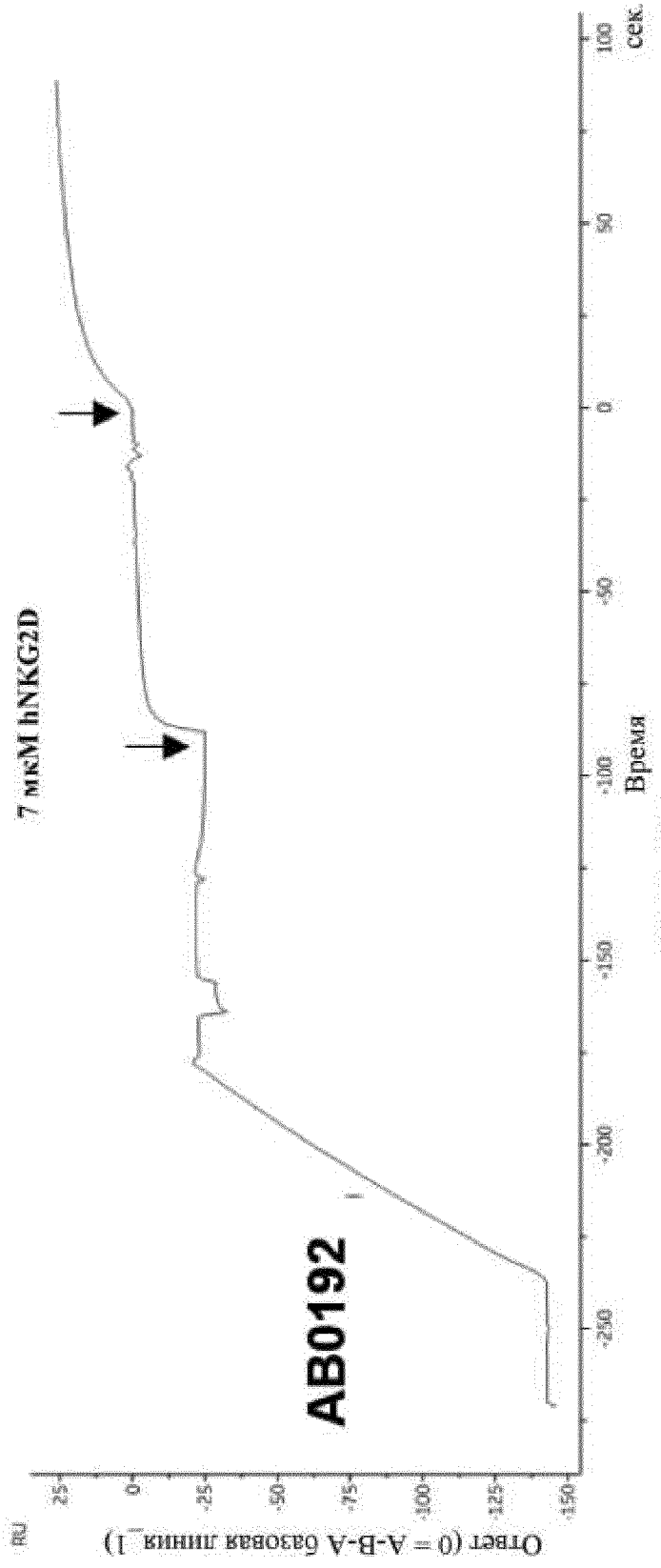
**ФИГ. 234 продолжение**


NKG2D + CD16a
NKG2D
CD16a
Время
сек.
-50
-25
0
25
50
75
100
125
150
175
200
0
25
50
75
100

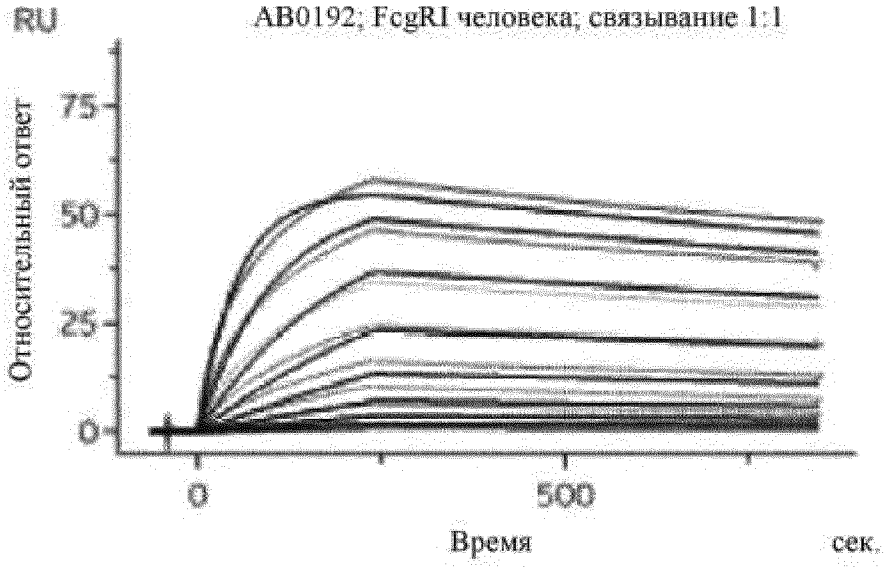
ФИГ. 235


7 мкМ hNKG2D
100 нМ hCLEC12A
AB0192
Ответ (0 = A-B-A базовая линия_1)
RU
25
0
-25
-50
-75
-100
-125
-150
-250
-200
-150
-100
-50
0
50
100
Время
сек.

ФИГ. 236




ФИГ. 236 продолжение



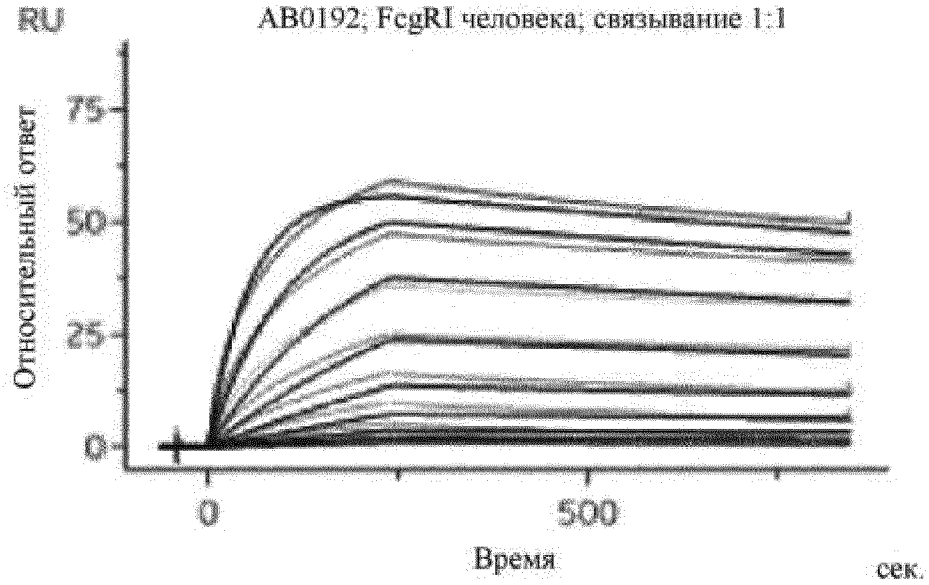


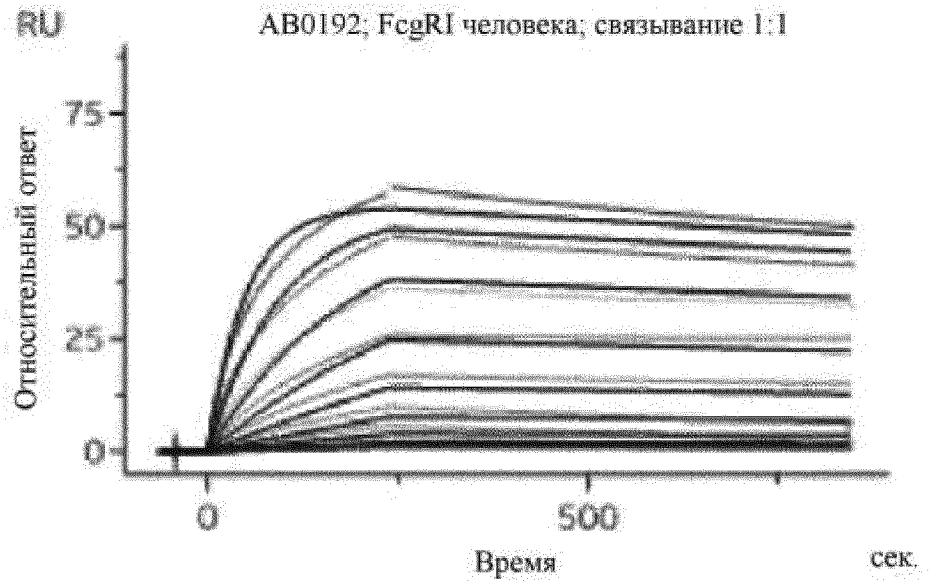


**AB0192**

**$K_D$ = 5,2 ± 1,2 нМ**

**ФИГ. 237**



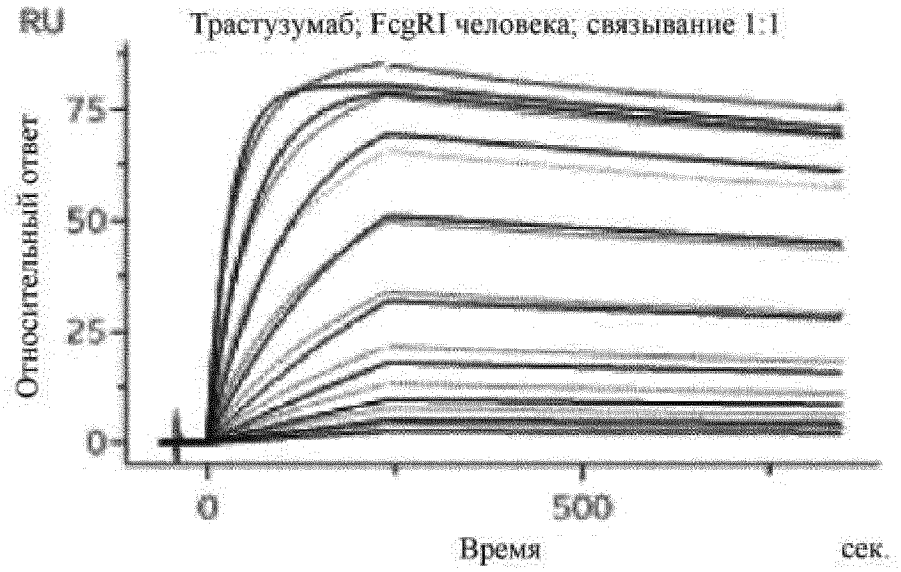




**AB0192**

**$K_D$ = 5,2 ± 1,2 нМ**

**ФИГ. 237 продолжение**

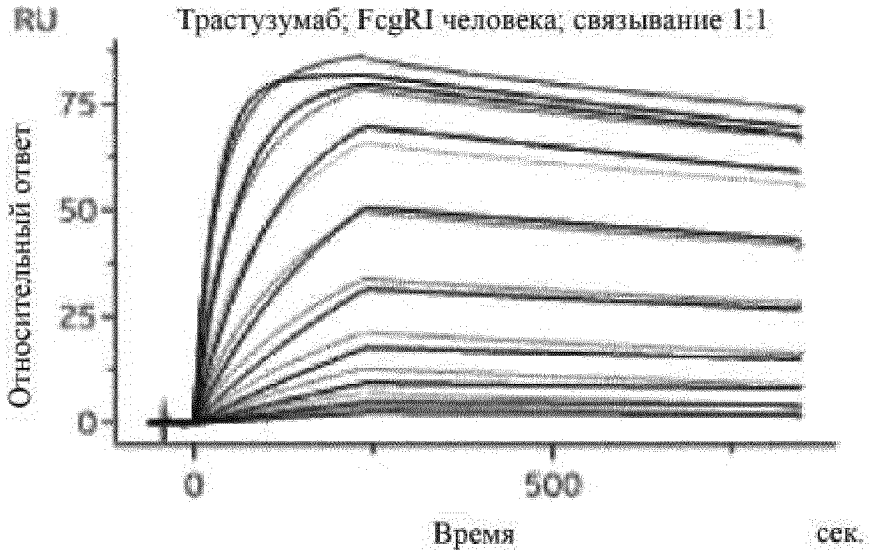


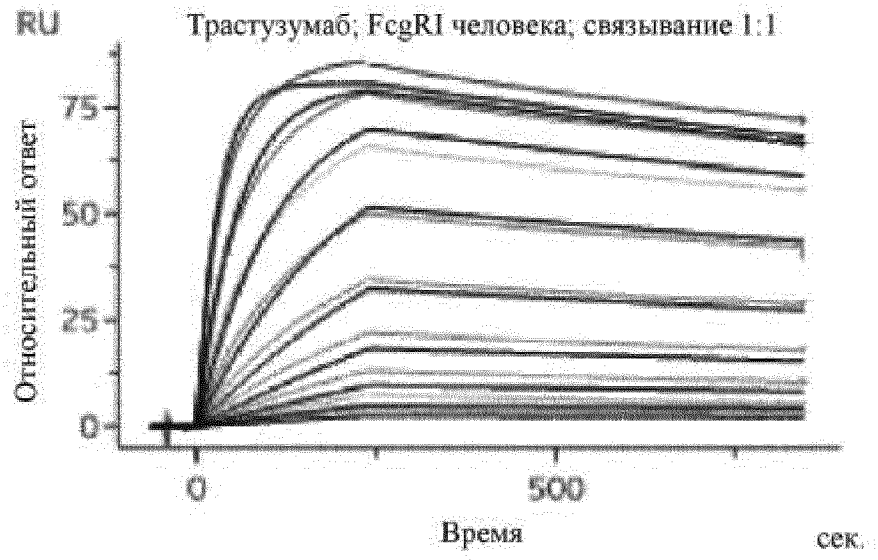




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 2,9 ± 0,4 нМ**

**ФИГ. 237 продолжение**

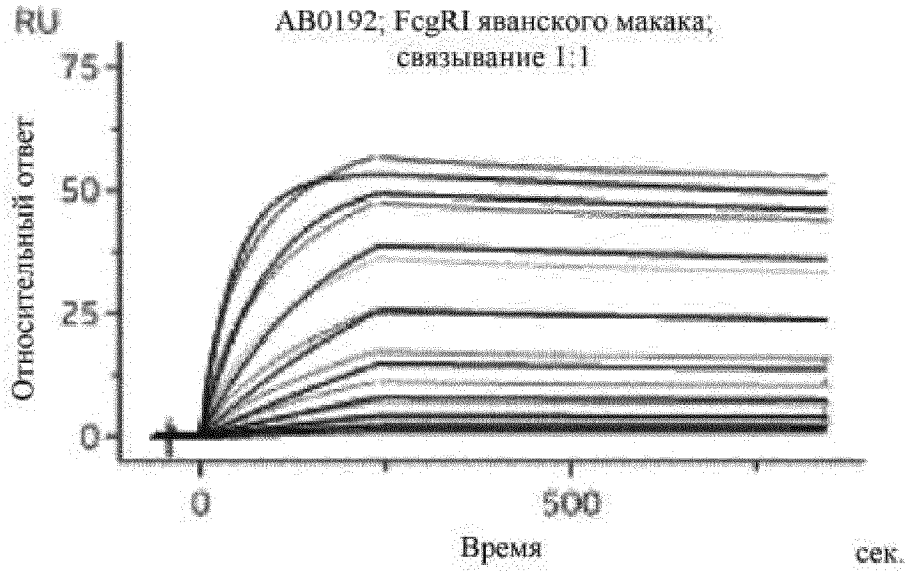


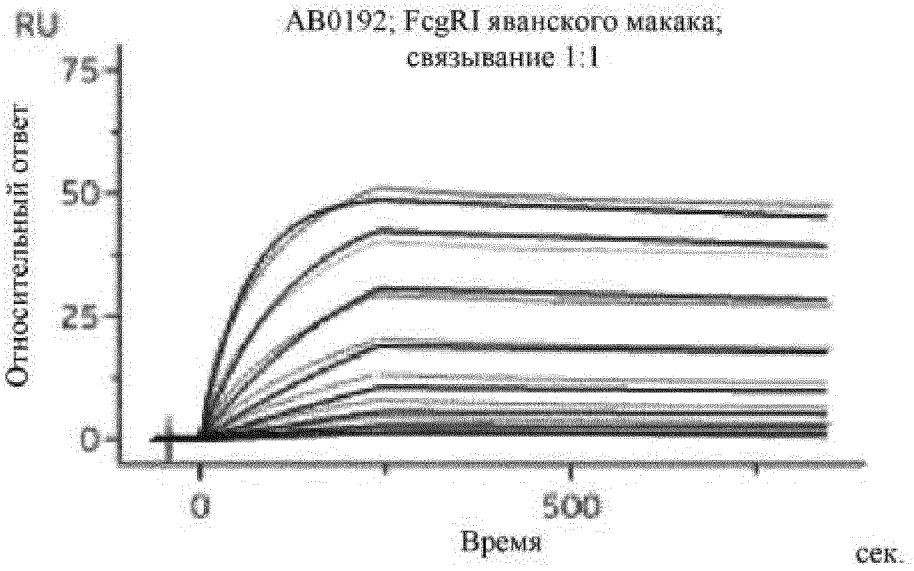




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 2,9 ± 0,4 нМ**

**ФИГ. 237 продолжение**

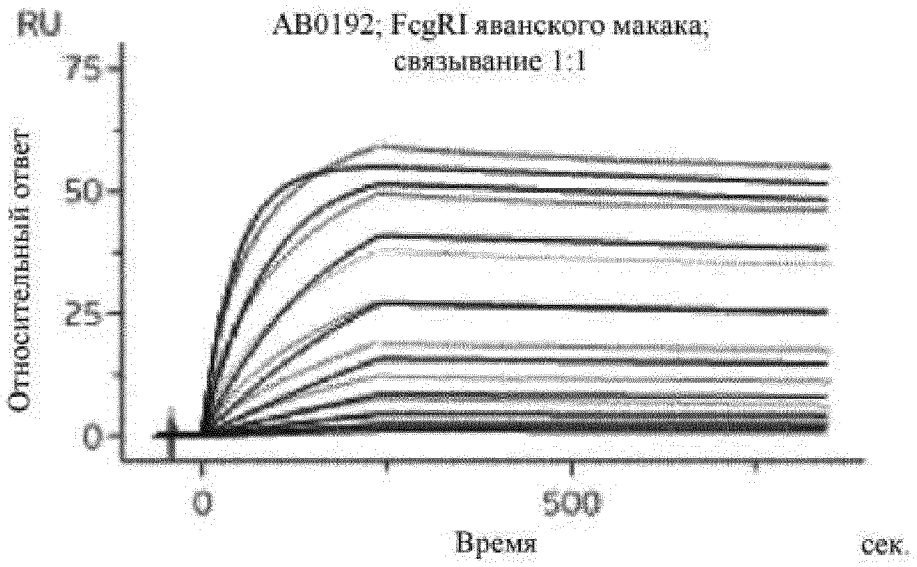


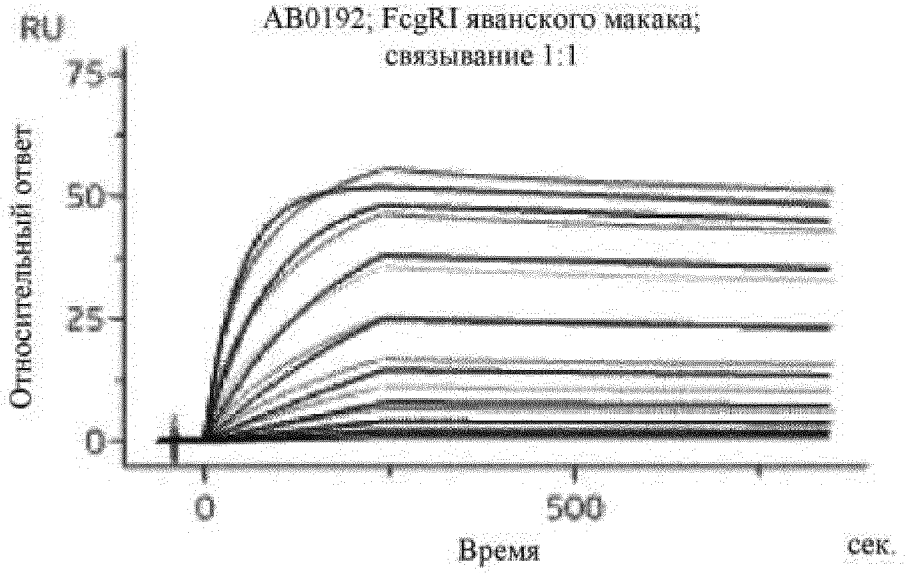




**AB0192**

**$K_D$ = 1,9 ± 0,3 нМ**

**ФИГ. 238**

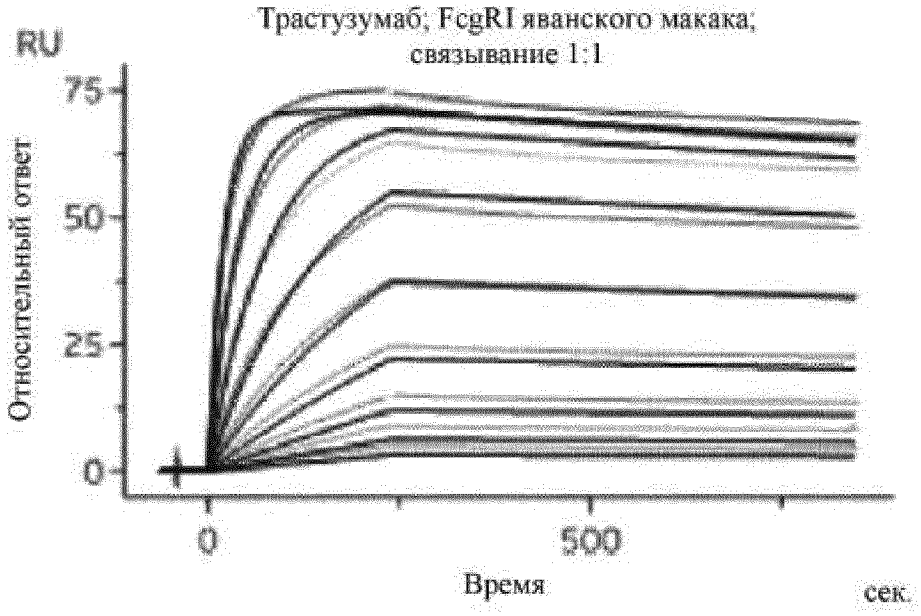


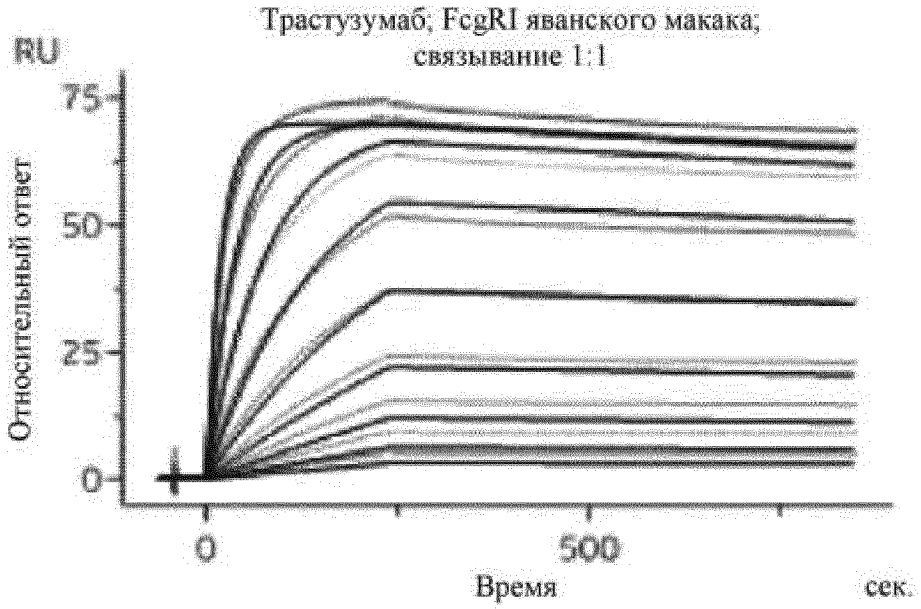




**AB0192**

**$K_D$ = 1,9 ± 0,3 нМ**

**ФИГ. 238 продолжение**

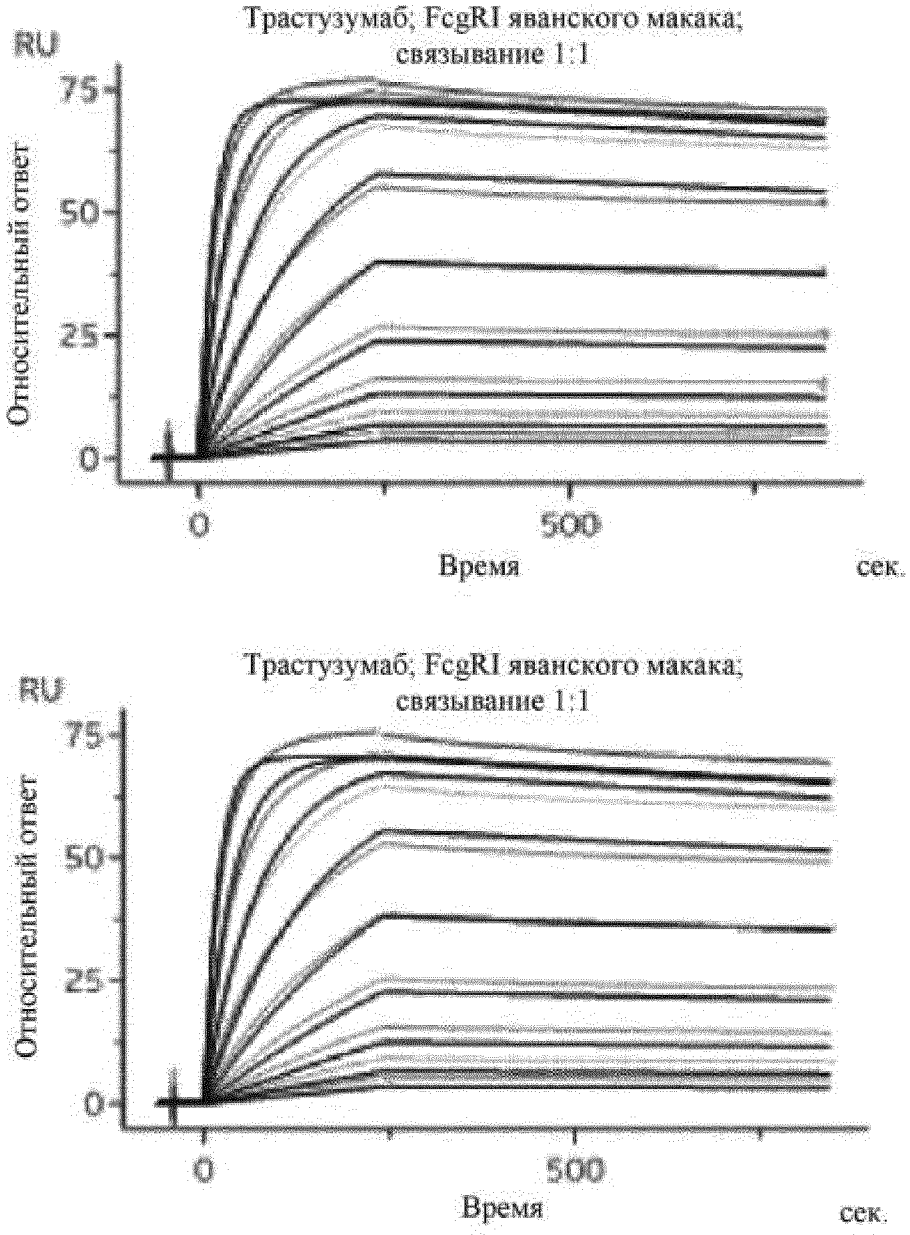



**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1,0 ± 0,1 нМ**

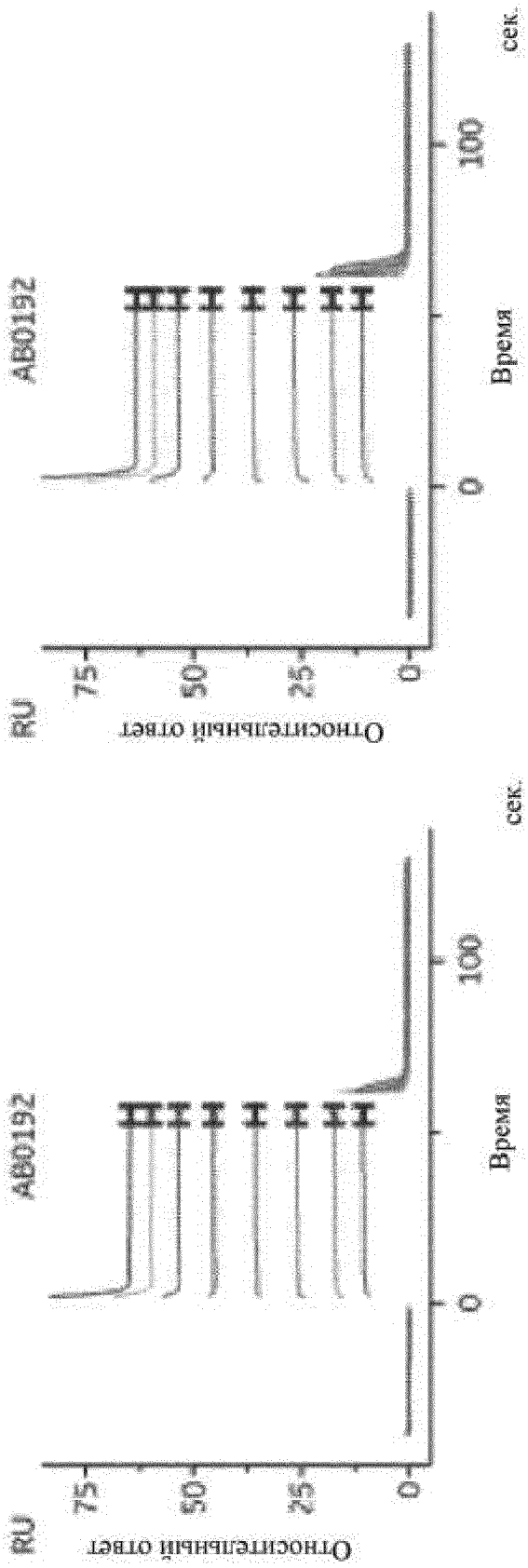
**ФИГ. 238 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1,0 ± 0,1 нМ**

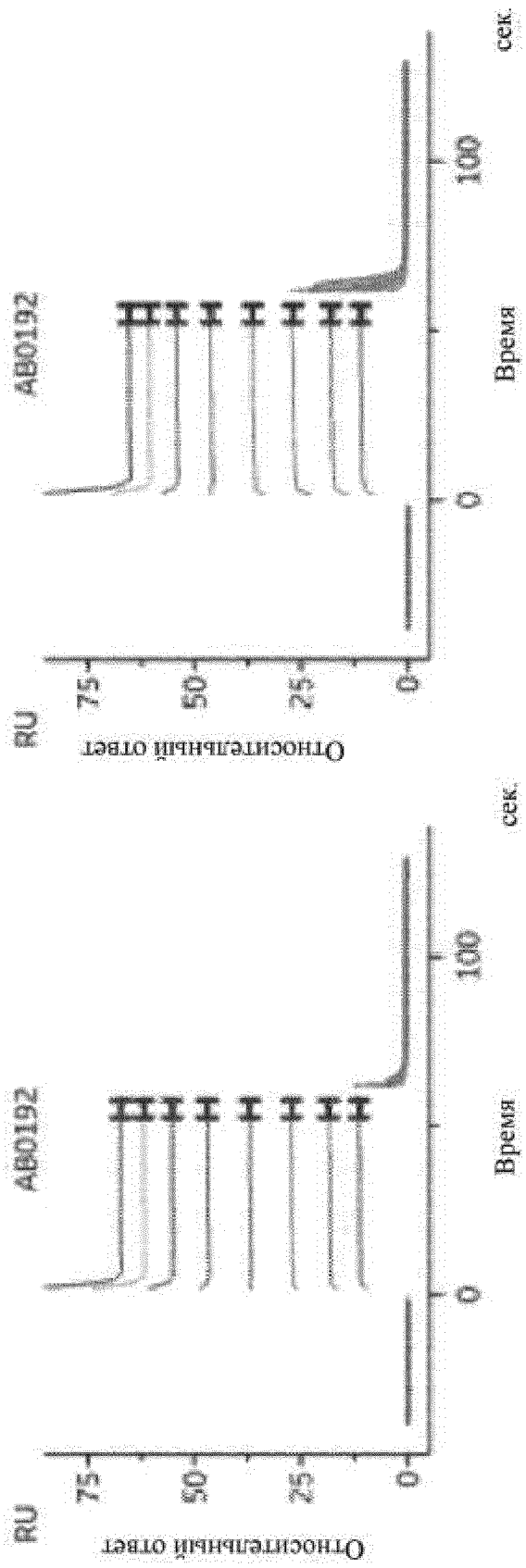
**ФИГ. 238 продолжение**




**AB0192**

$K_D$ = 1011,3 ± 63,3 нМ

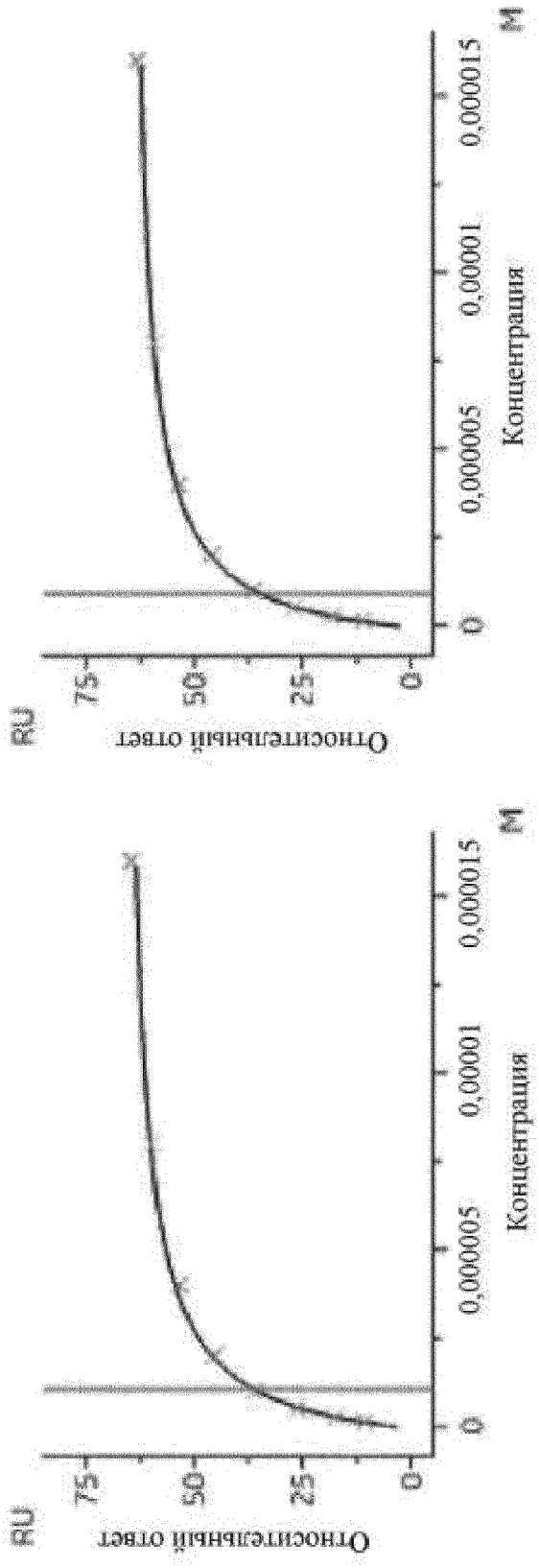
ФИГ. 239




**AB0192**

**$K_D$ = 1011,3 ± 63,3 нМ**

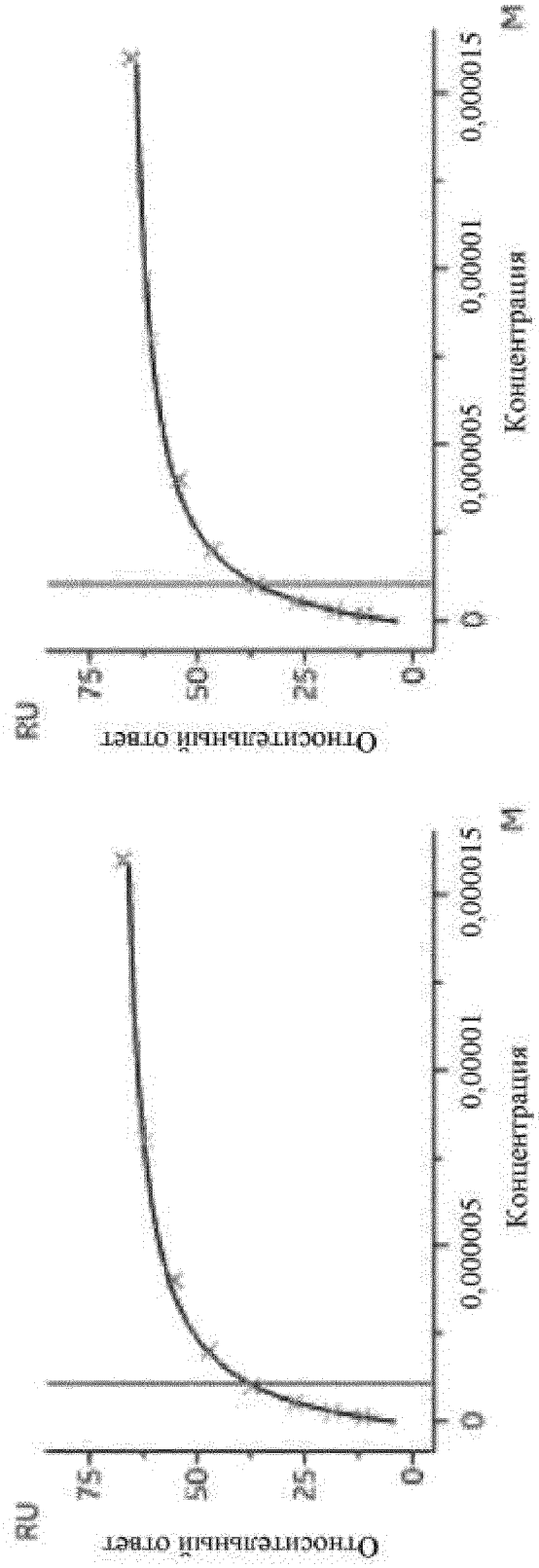
**ФИГ. 239 продолжение**




**AB0192**

$K_D$ = 1011,3 ± 63,3 нМ

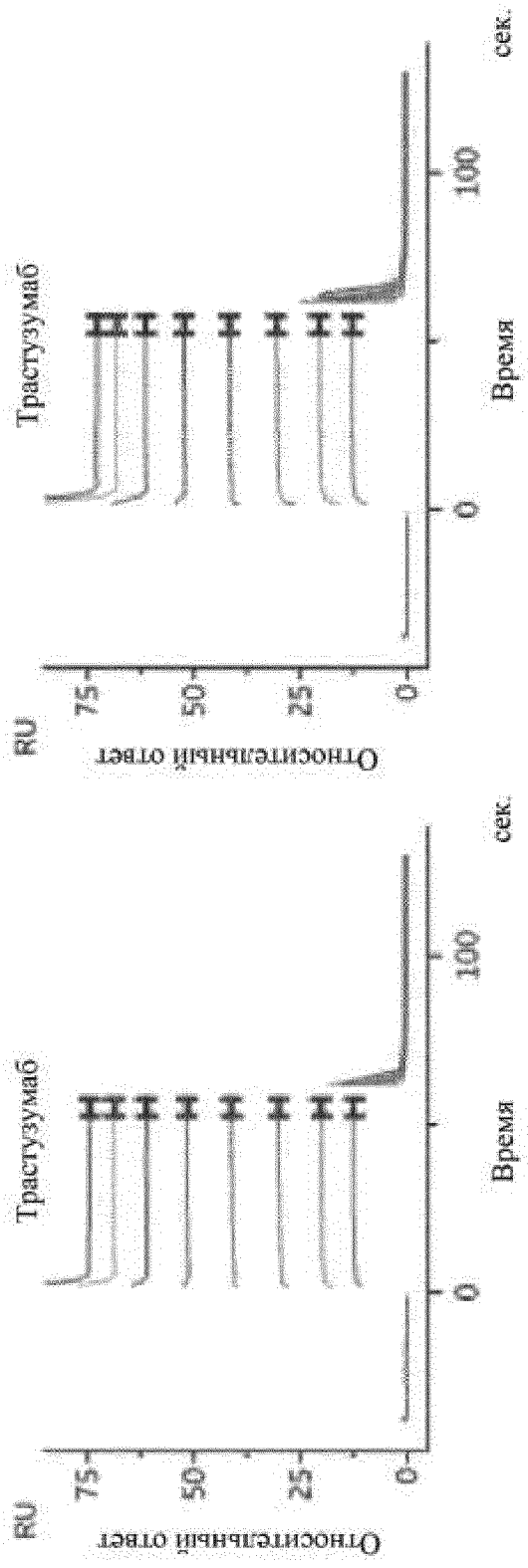
**ФИГ. 239 продолжение**




**AB0192**

**$K_D$ = 1011,3 ± 63,3 нМ**

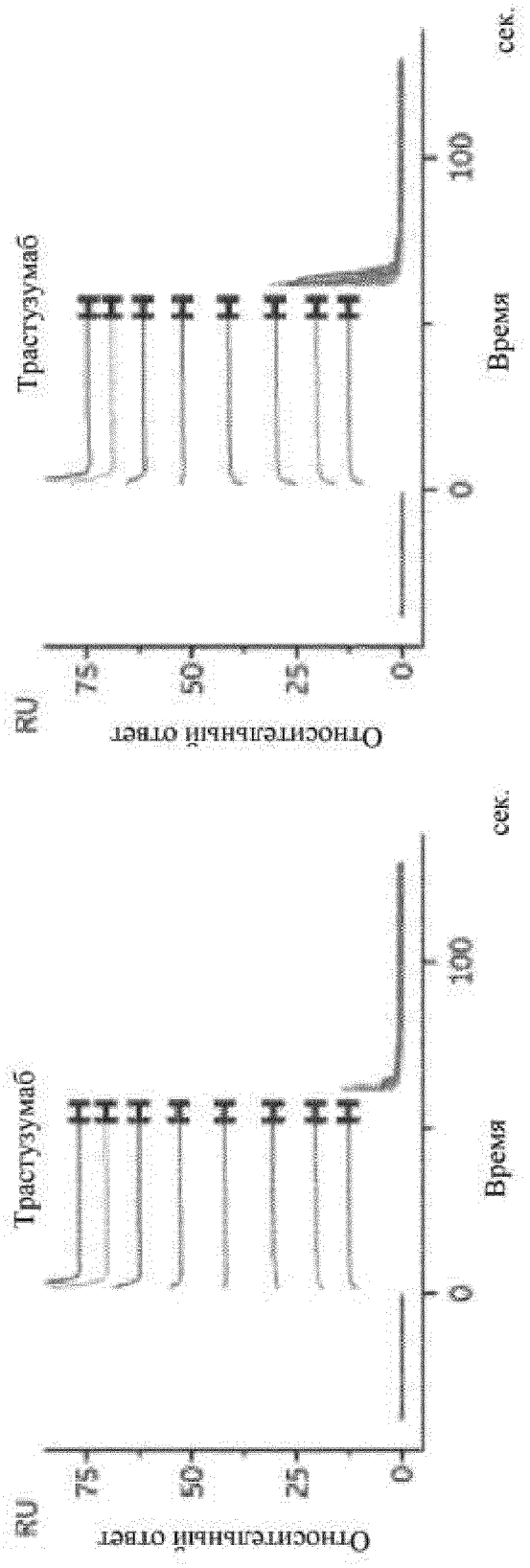
**ФИГ. 239 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1045,1 ± 62,2 нМ**

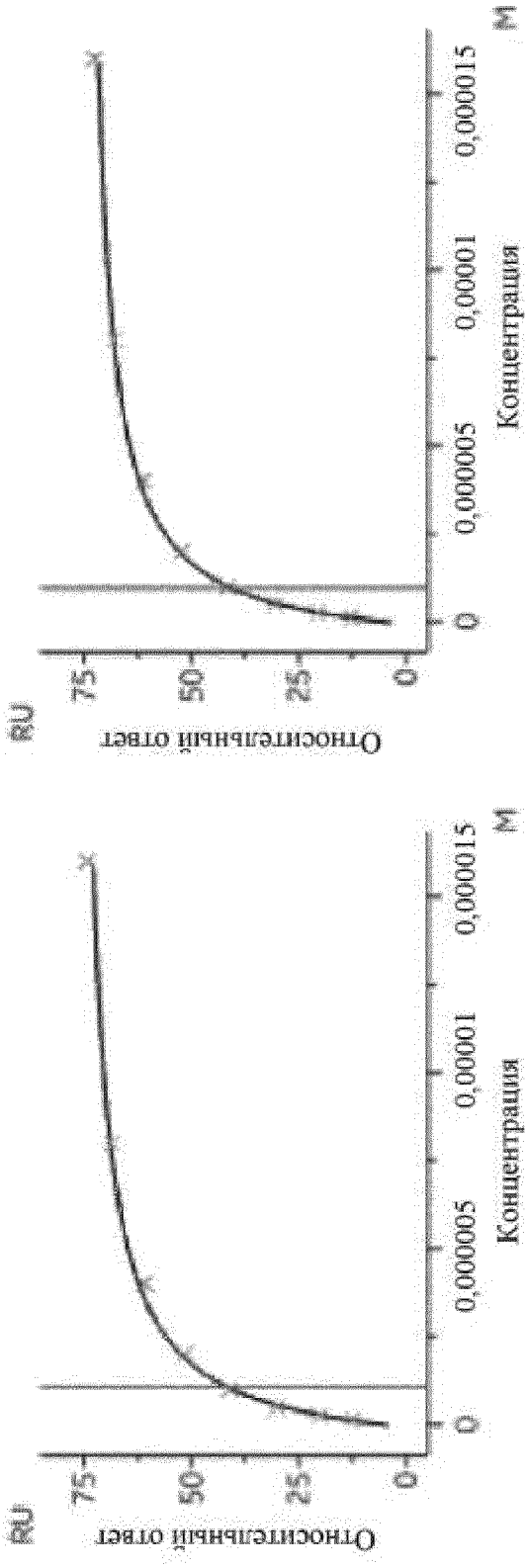
**ФИГ. 239 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1045,1 ± 62,2 нМ**

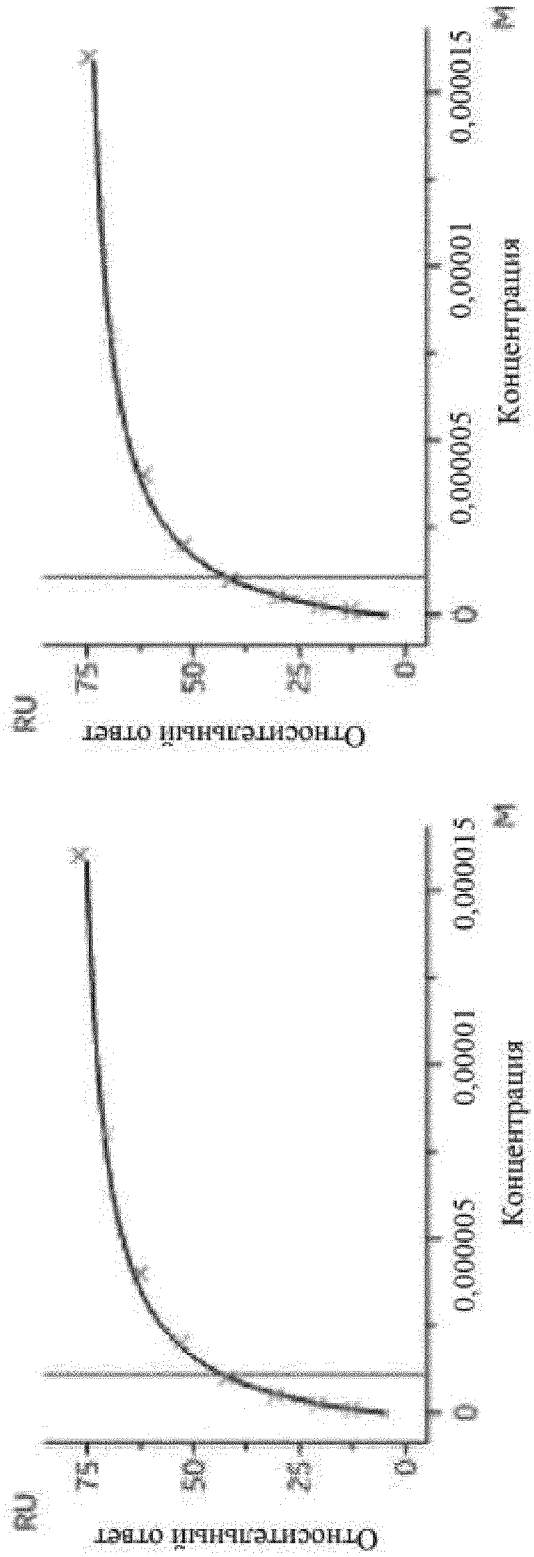
**ФИГ. 239 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1045,1 ± 62,2 нМ**

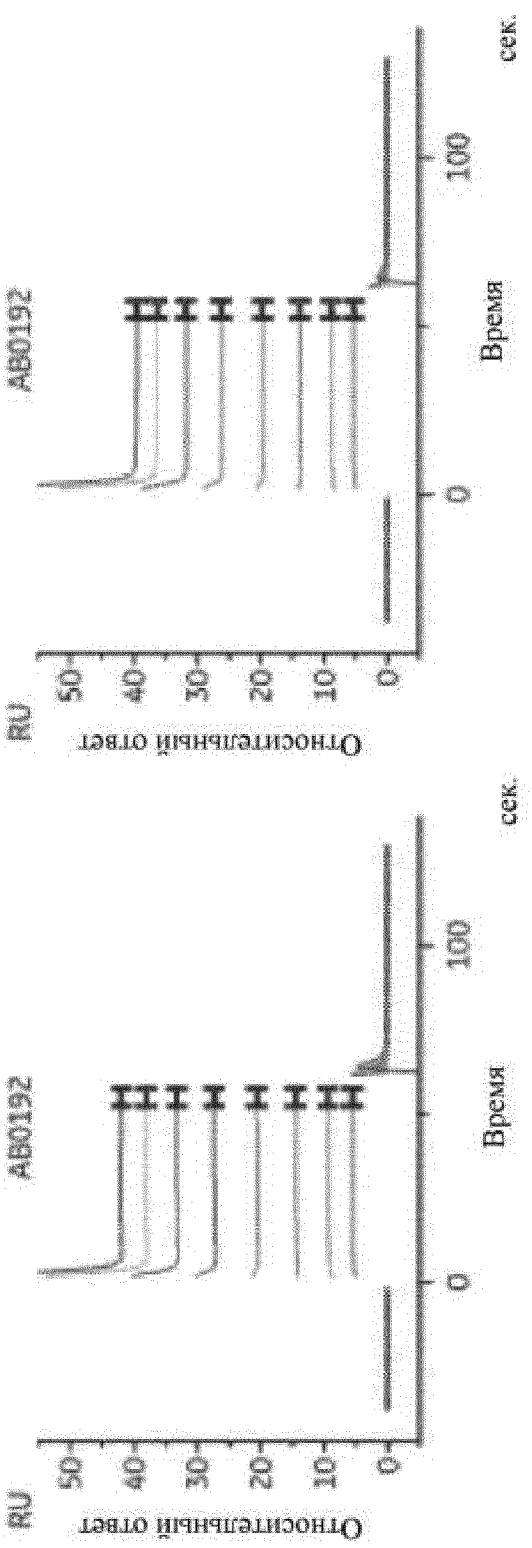
**ФИГ. 239 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1045,1 ± 62,2 нМ**

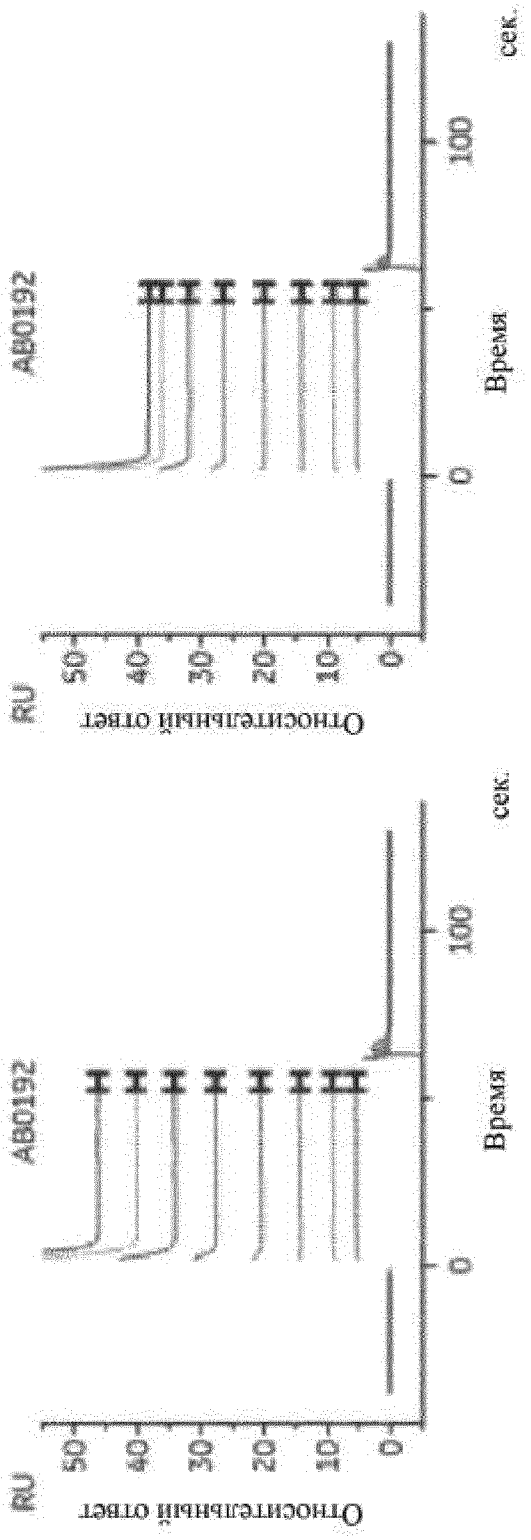
**ФИГ. 239 продолжение**




**AB0192**

$K_D$ = 1398,8 ± 286,1 нМ

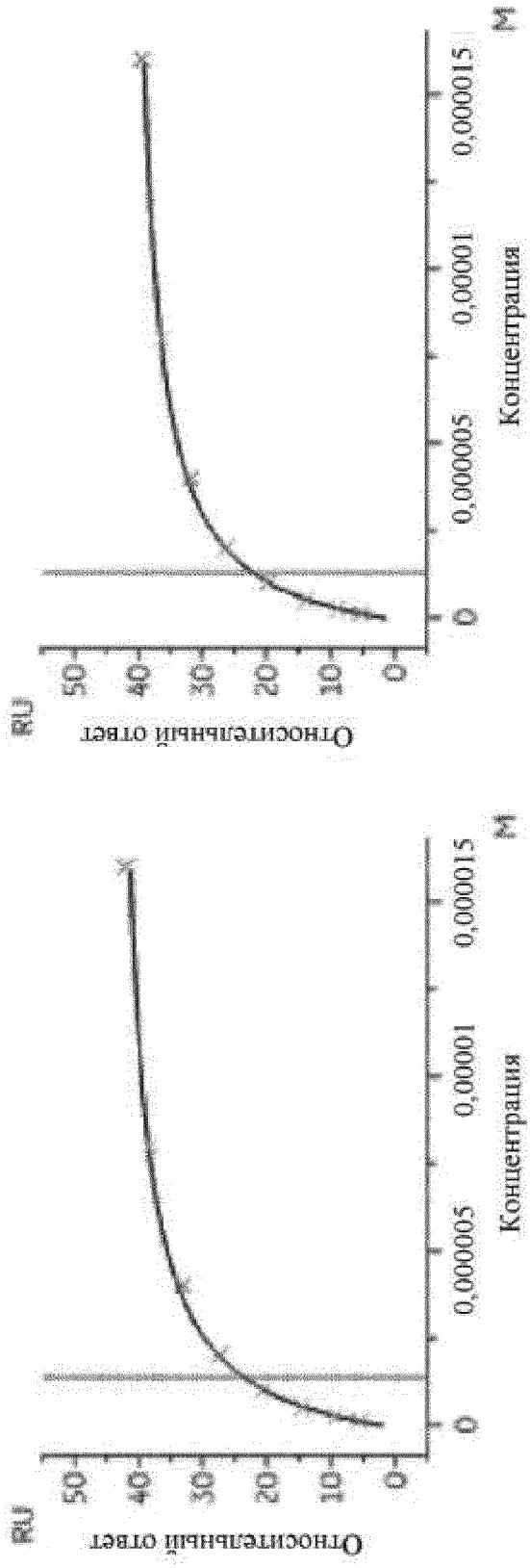
**ФИГ. 240**



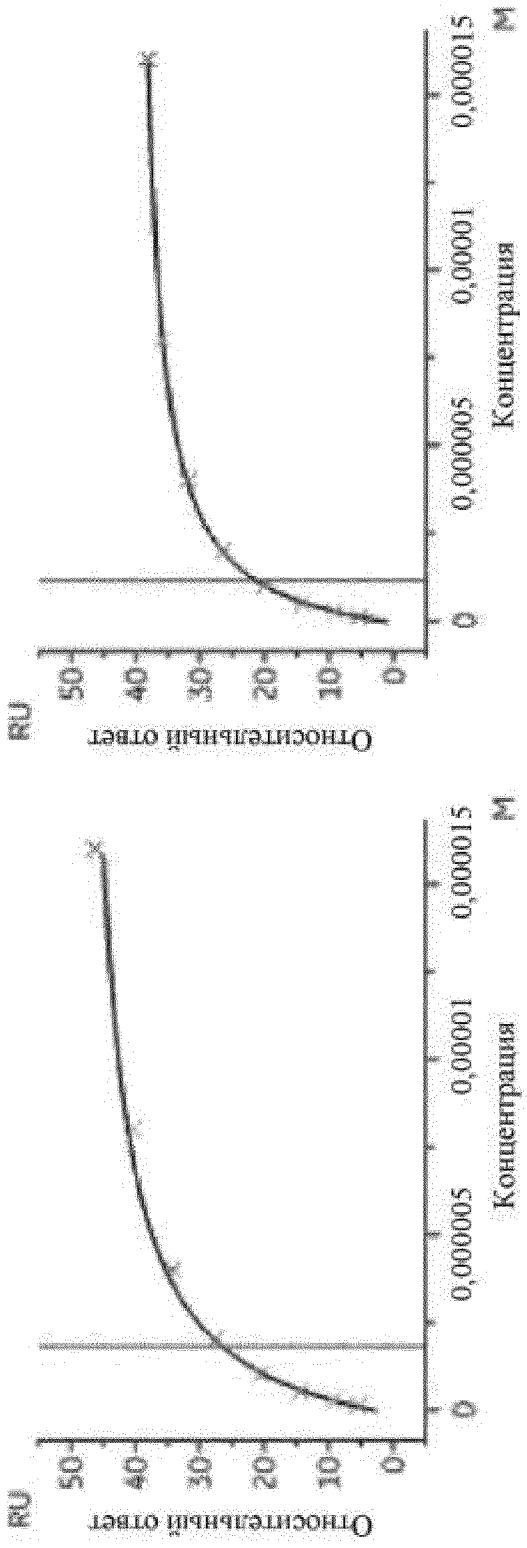

**AB0192**

**$K_D$ = 1398,8 ± 286,1 нМ**

**ФИГ. 240 продолжение**



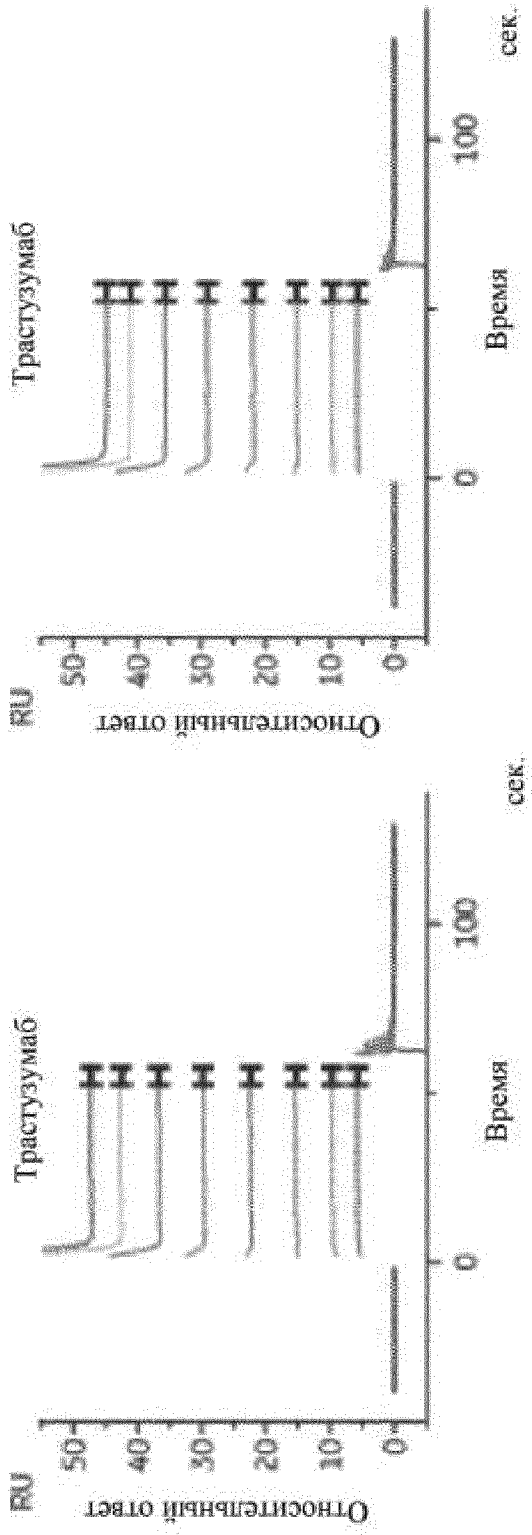

ФИГ. 240 продолжение




**AB0192**

$K_D$ = 1398,8 ± 286,1 нМ

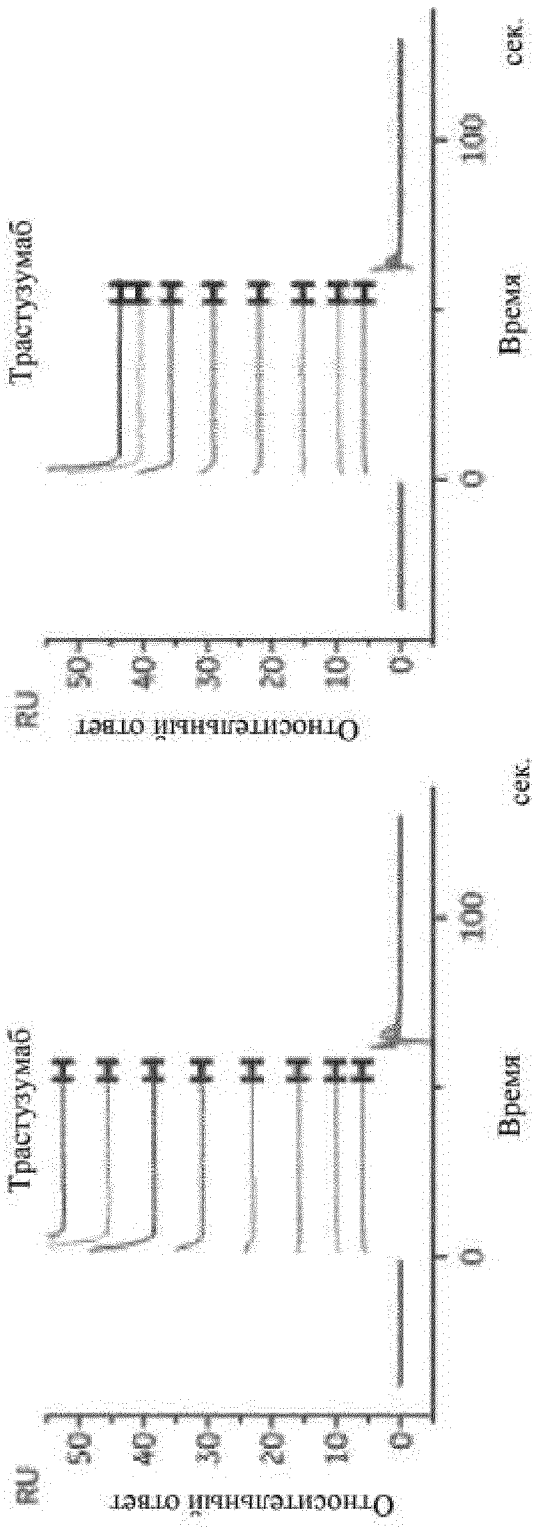
**ФИГ. 240 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1493,2 ± 265,9 нМ**

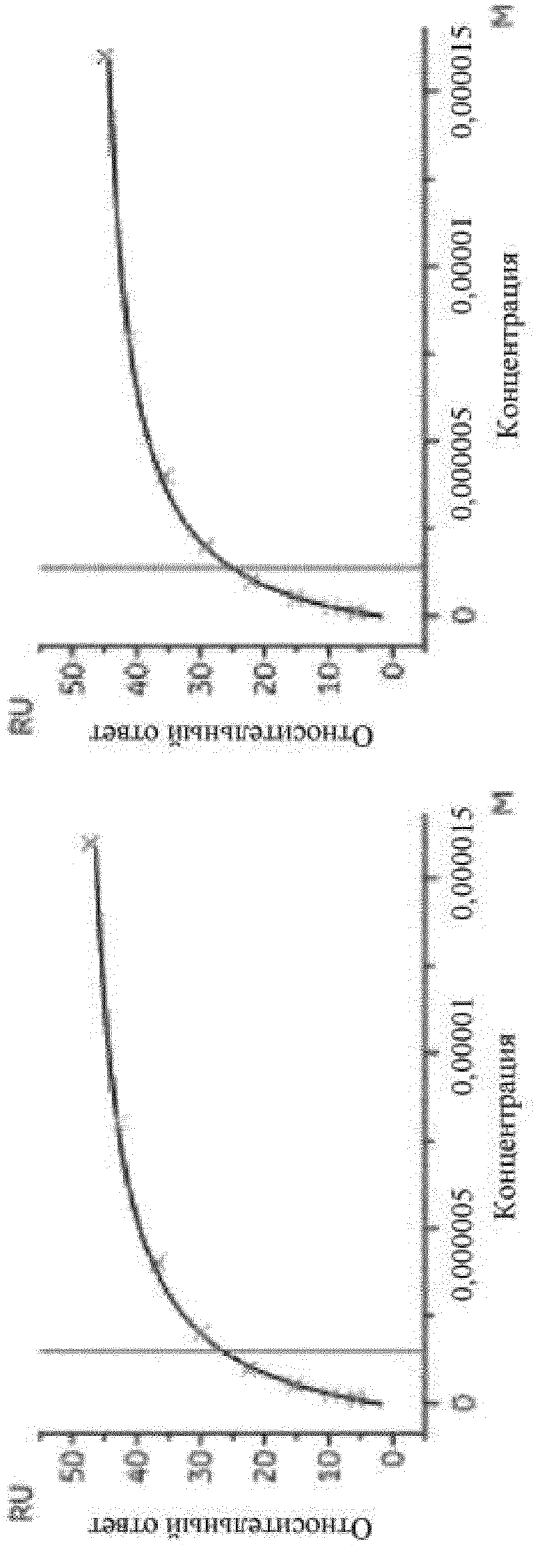
**ФИГ. 240 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1493,2 ± 265,9 нМ**

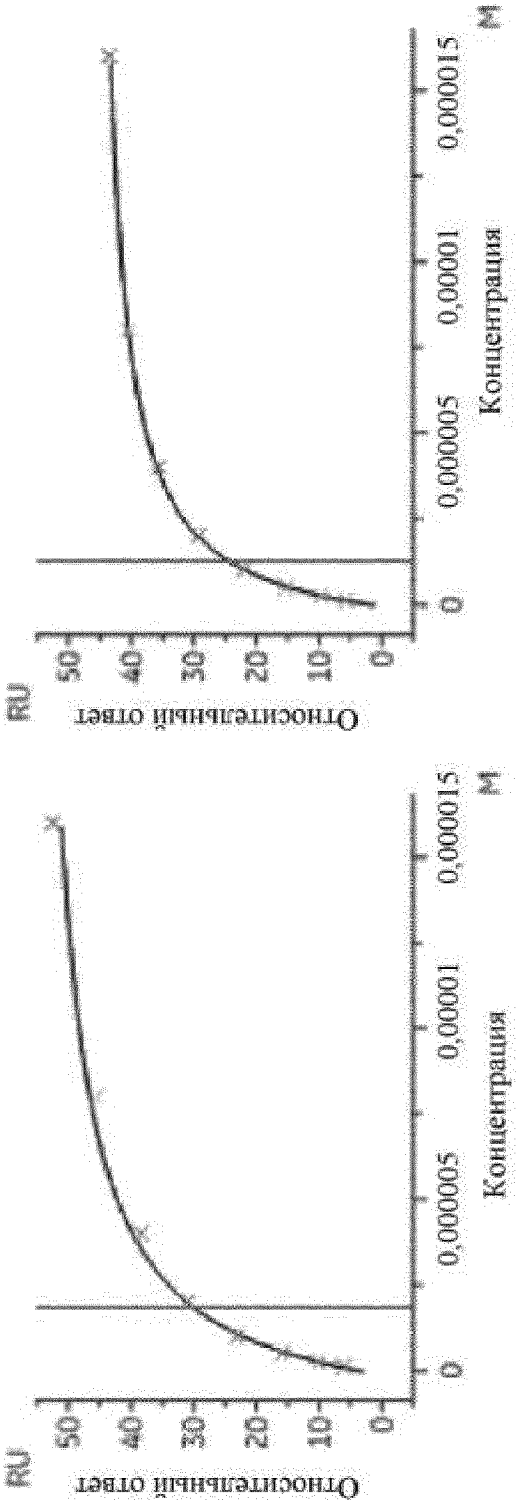
**ФИГ. 240 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1493,2 ± 265,9 нМ**

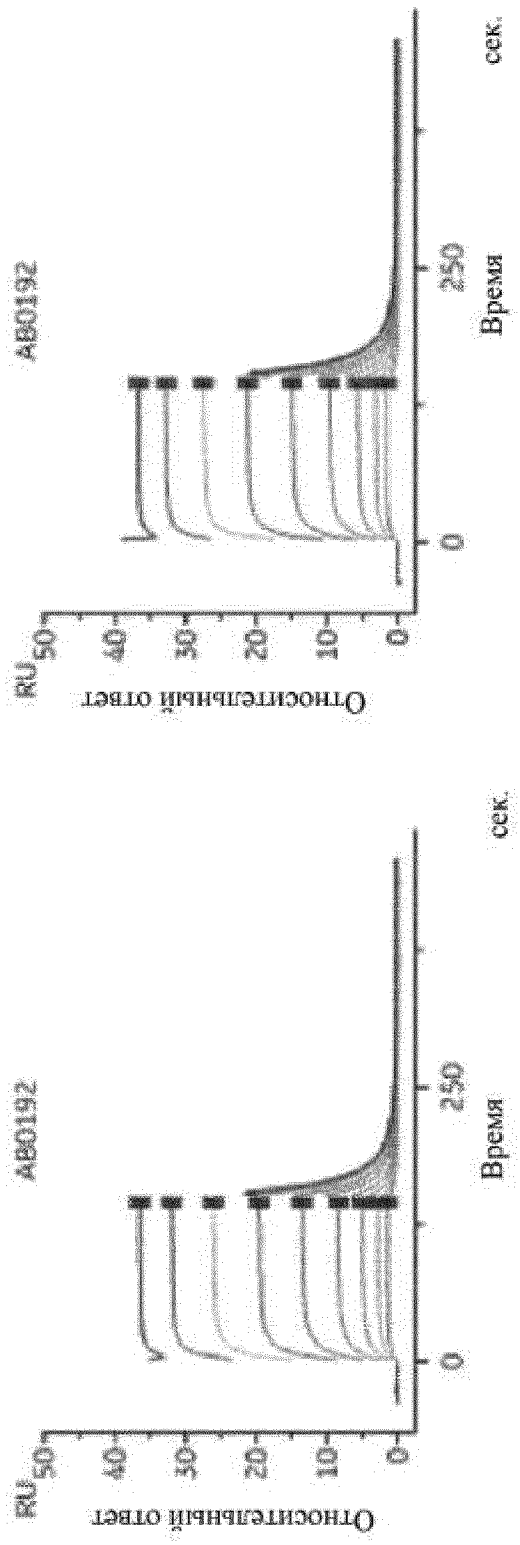
**ФИГ. 240 продолжение**




**Трастузумаб**

$K_D$ = 1493,2 ± 265,9 нМ

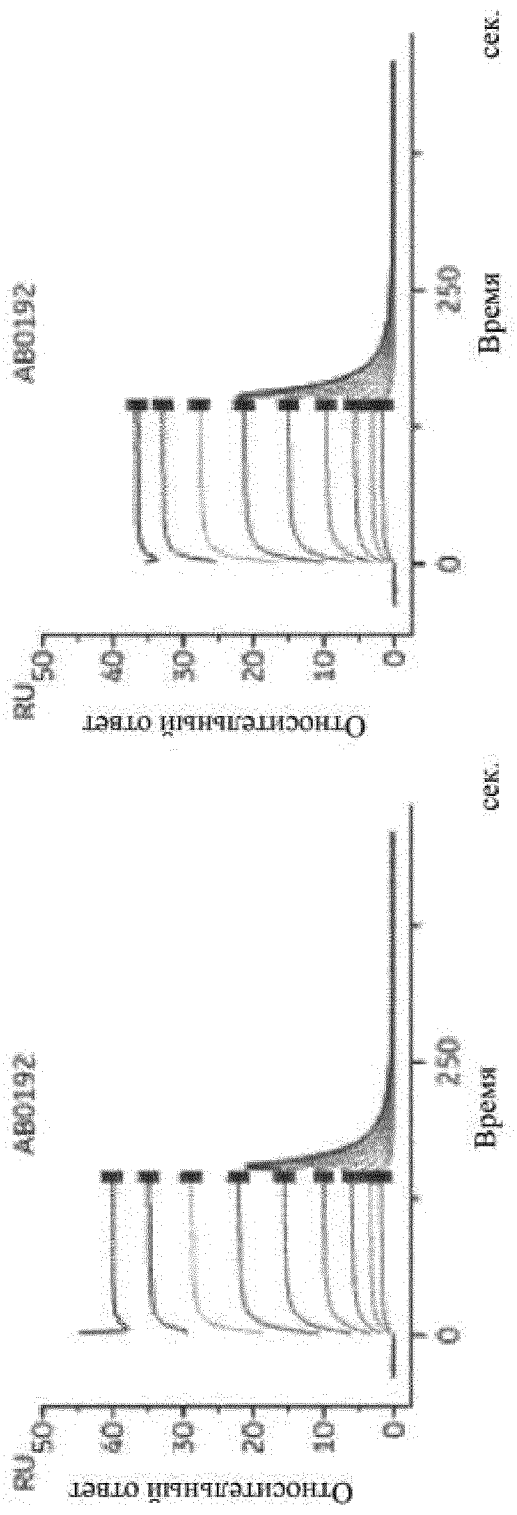
**ФИГ. 240 продолжение**




**AB0192**

$K_D$ = 680,0 ± 69,6 нМ

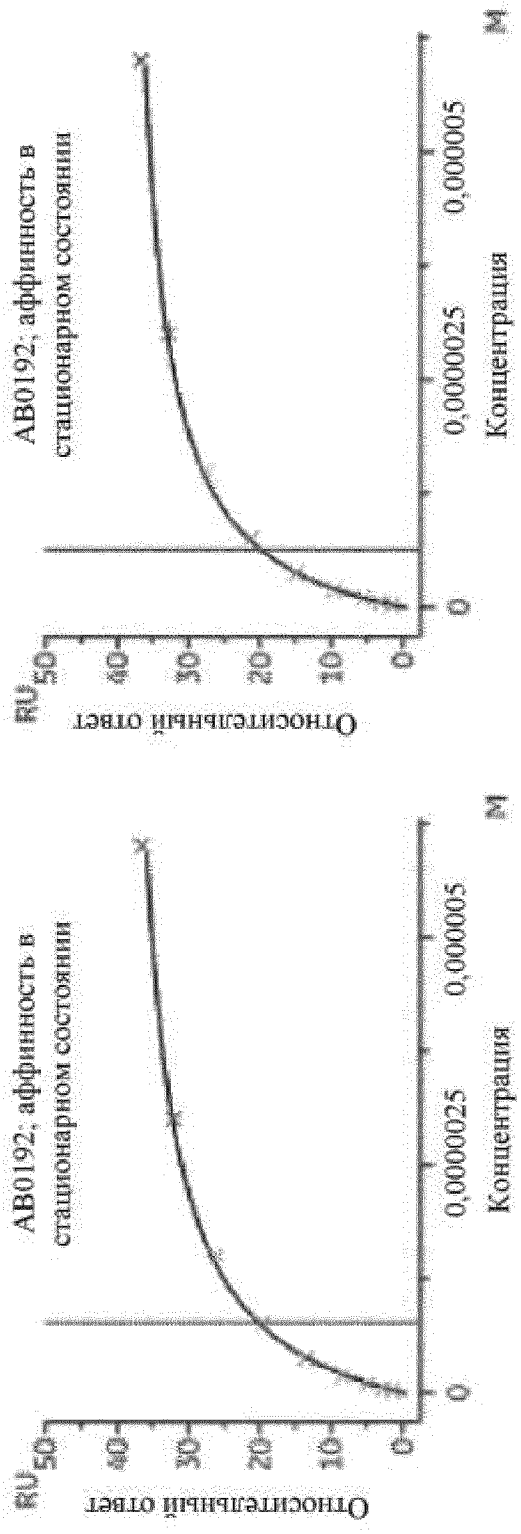
**ФИГ. 241**




**AB0192**

$K_D$ = 680,0 ± 69,6 нМ

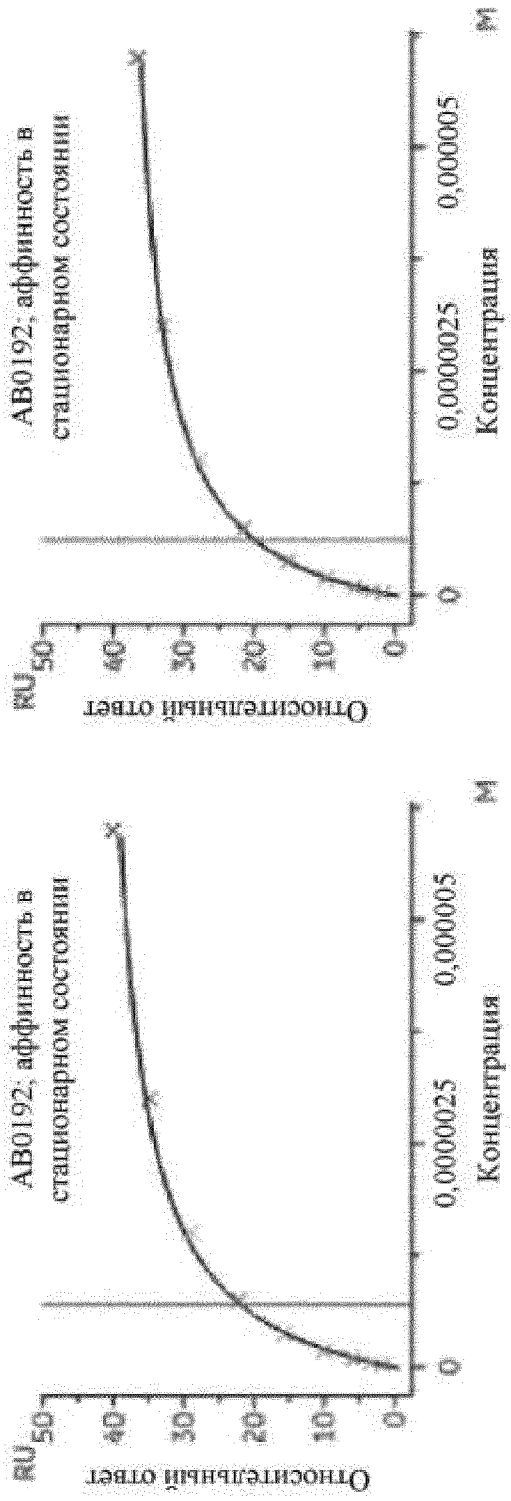
**ФИГ. 241 продолжение**




**AB0192**

$K_D$ = 680,0 ± 69,6 нМ

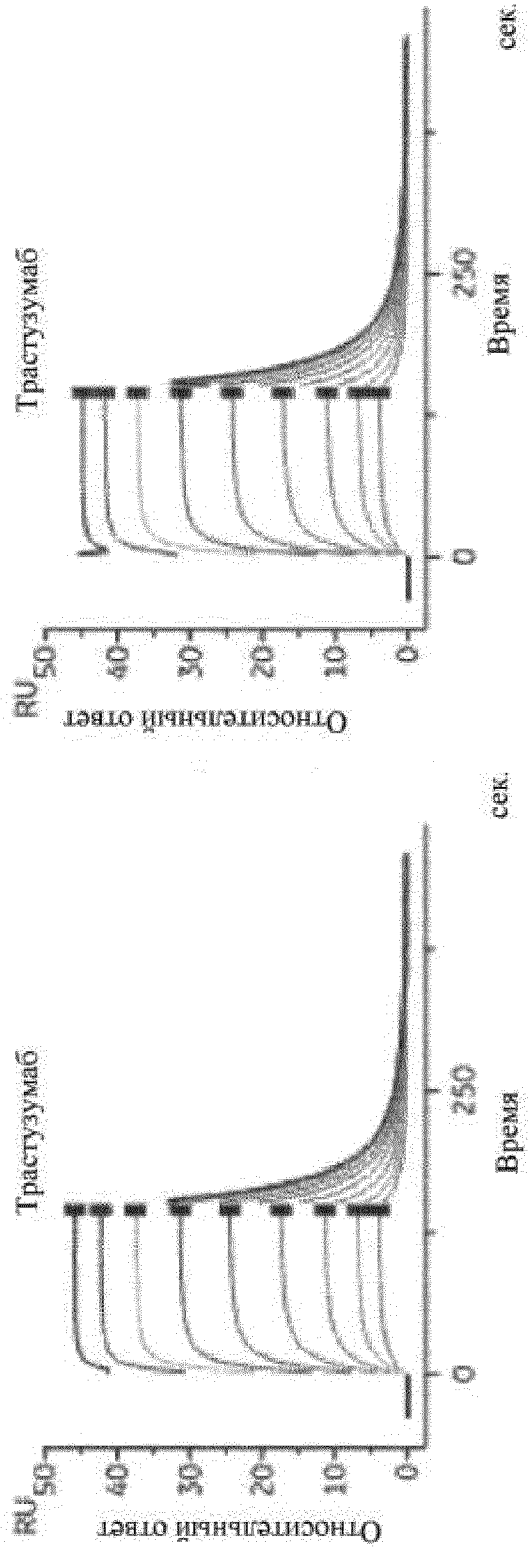
**ФИГ. 241 продолжение**




**AB0192**

$K_D$ = 680,0 ± 69,6 нМ

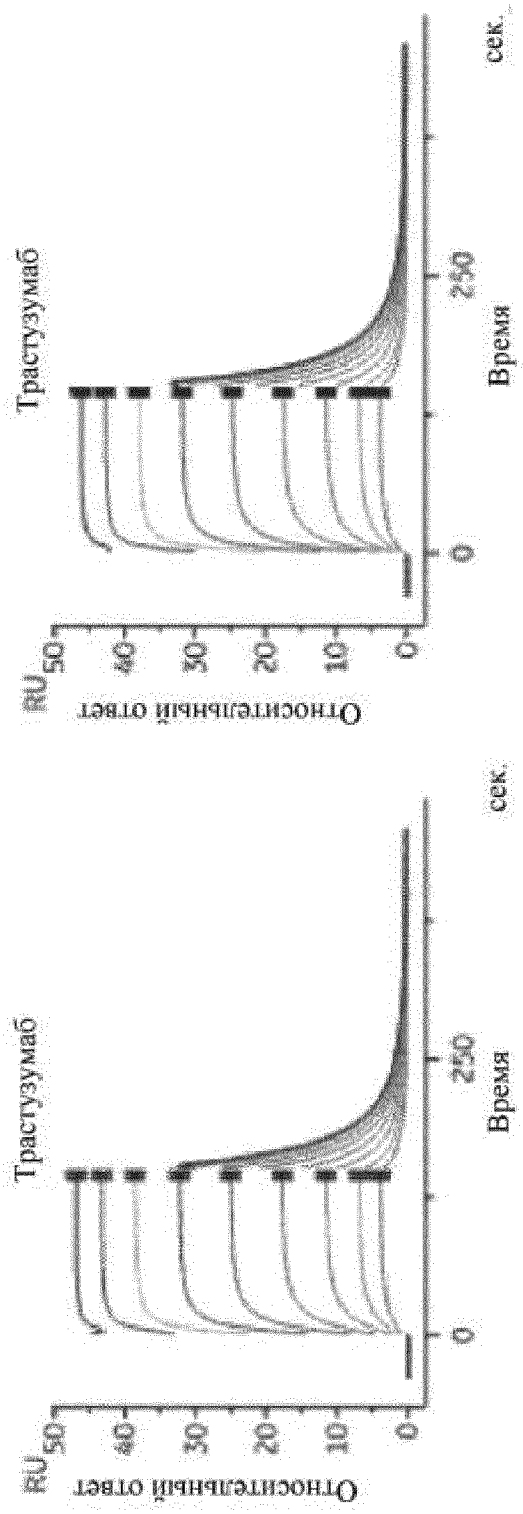
**ФИГ. 241 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 331,4 ± 3,3 нМ**

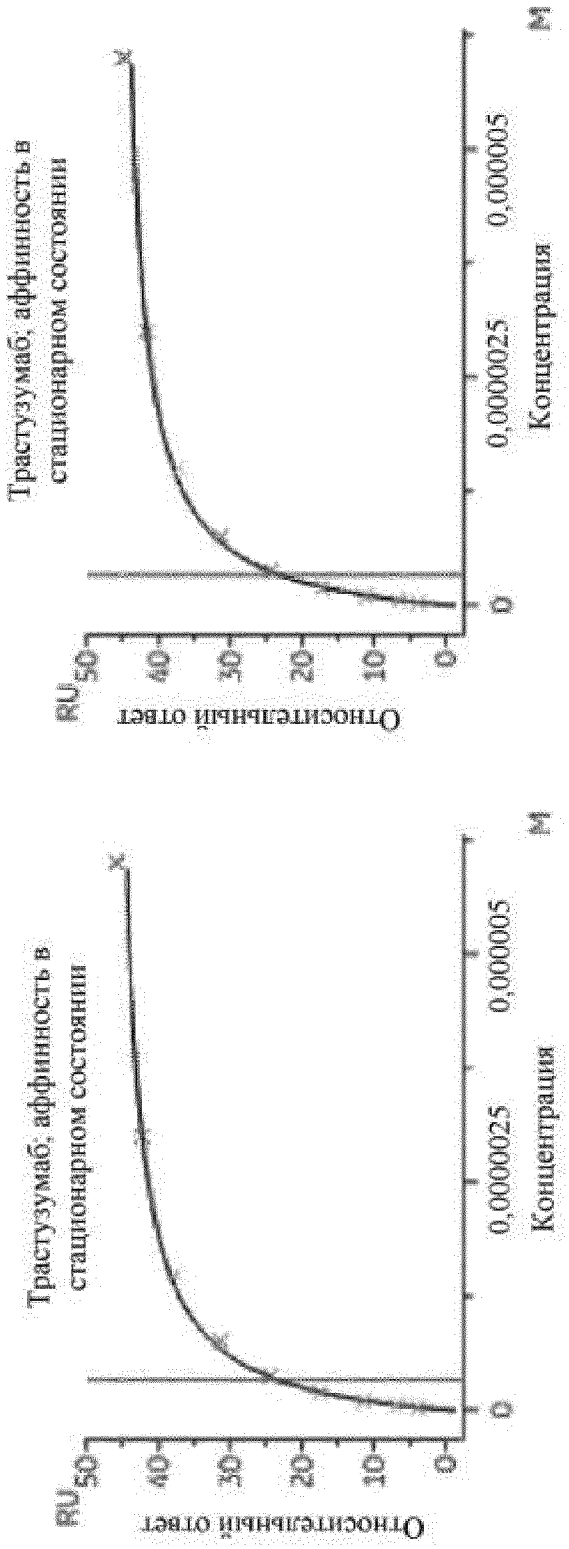
**ФИГ. 241 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 331,4 ± 3,3 нМ**

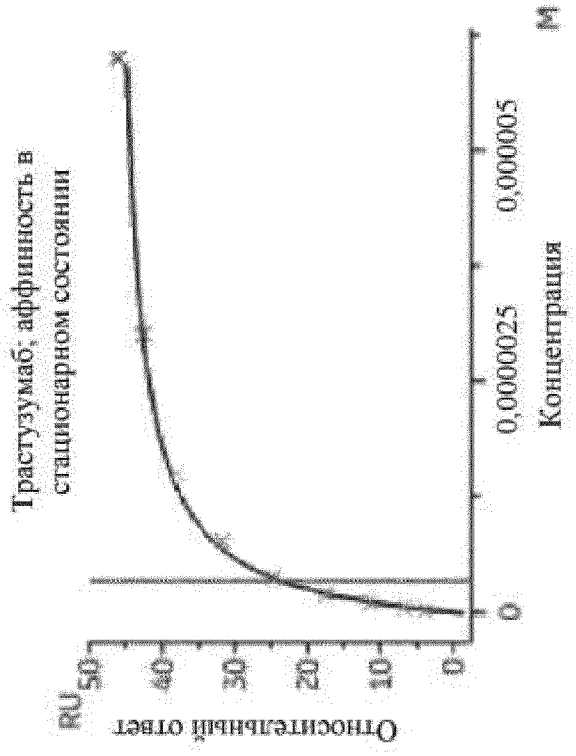
**ФИГ. 241 продолжение**

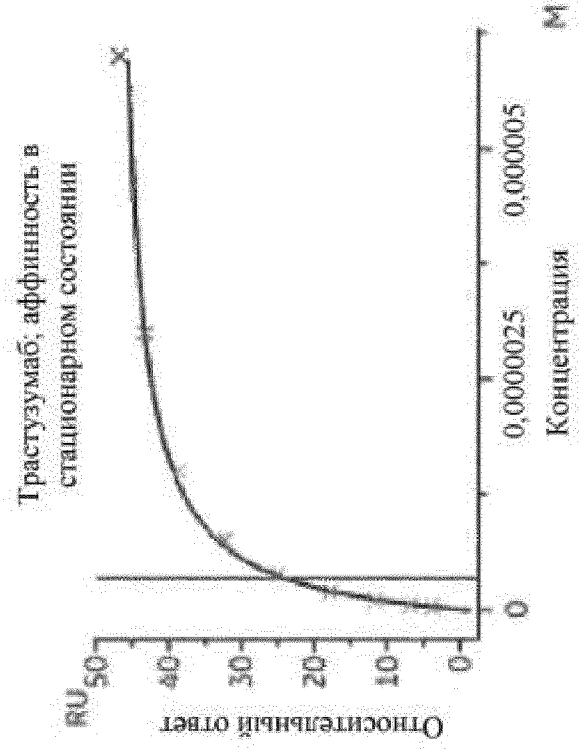



**Трастузумаб**

**$K_D$ = 331,4 ± 3,3 нМ**

**ФИГ. 241 продолжение**

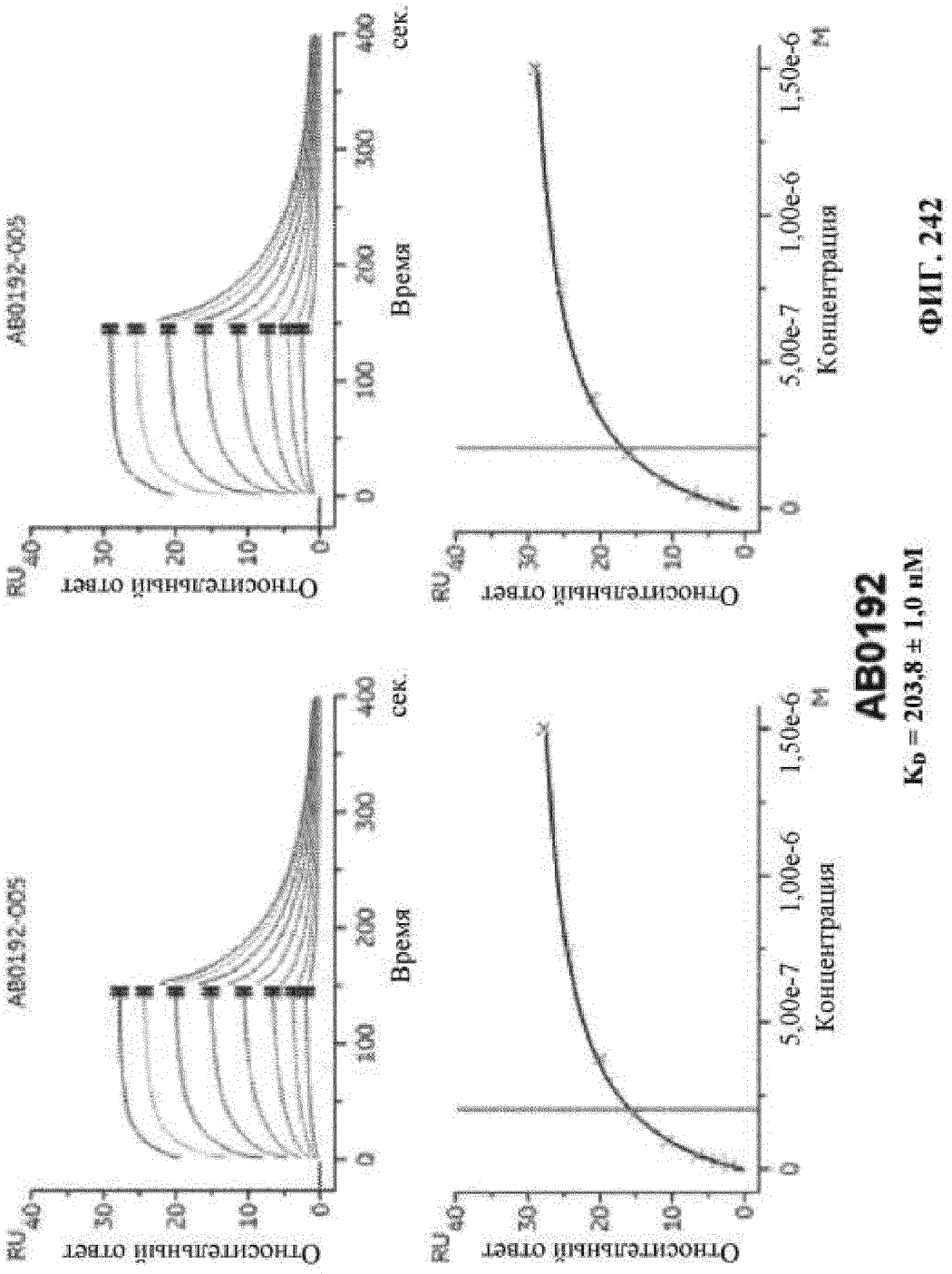


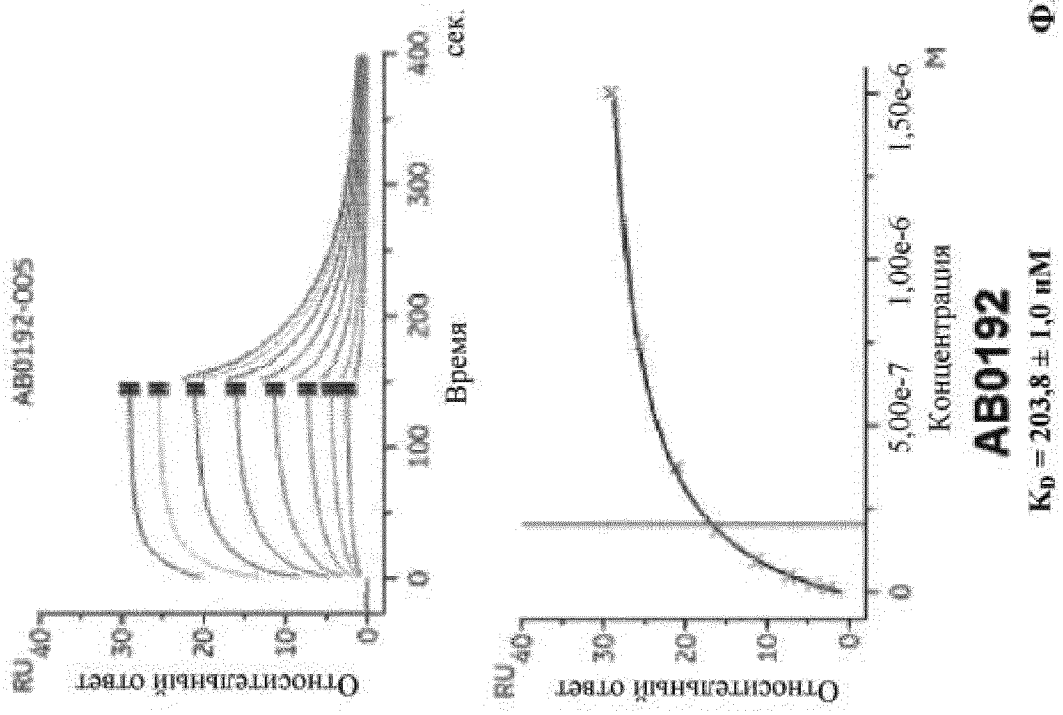

**Трастузумаб**

**$K_D$ = 331,4 ± 3,3 нМ**

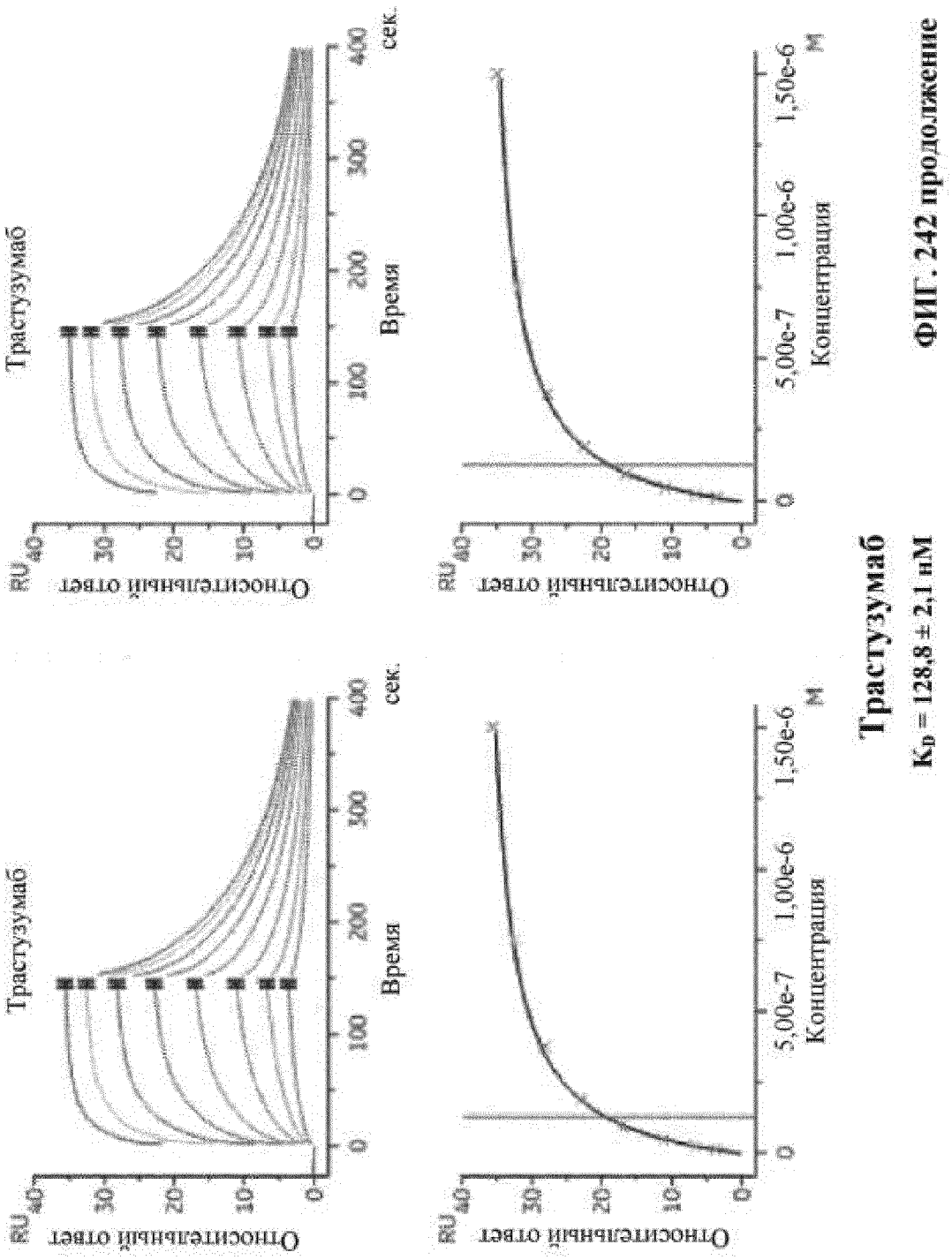
**ФИГ. 241 продолжение**


AB0192-005
Относительный ответ
RU
Время
сек.
Концентрация
M
AB0192
$K_D$ = 203,8 ± 1,0 нМ

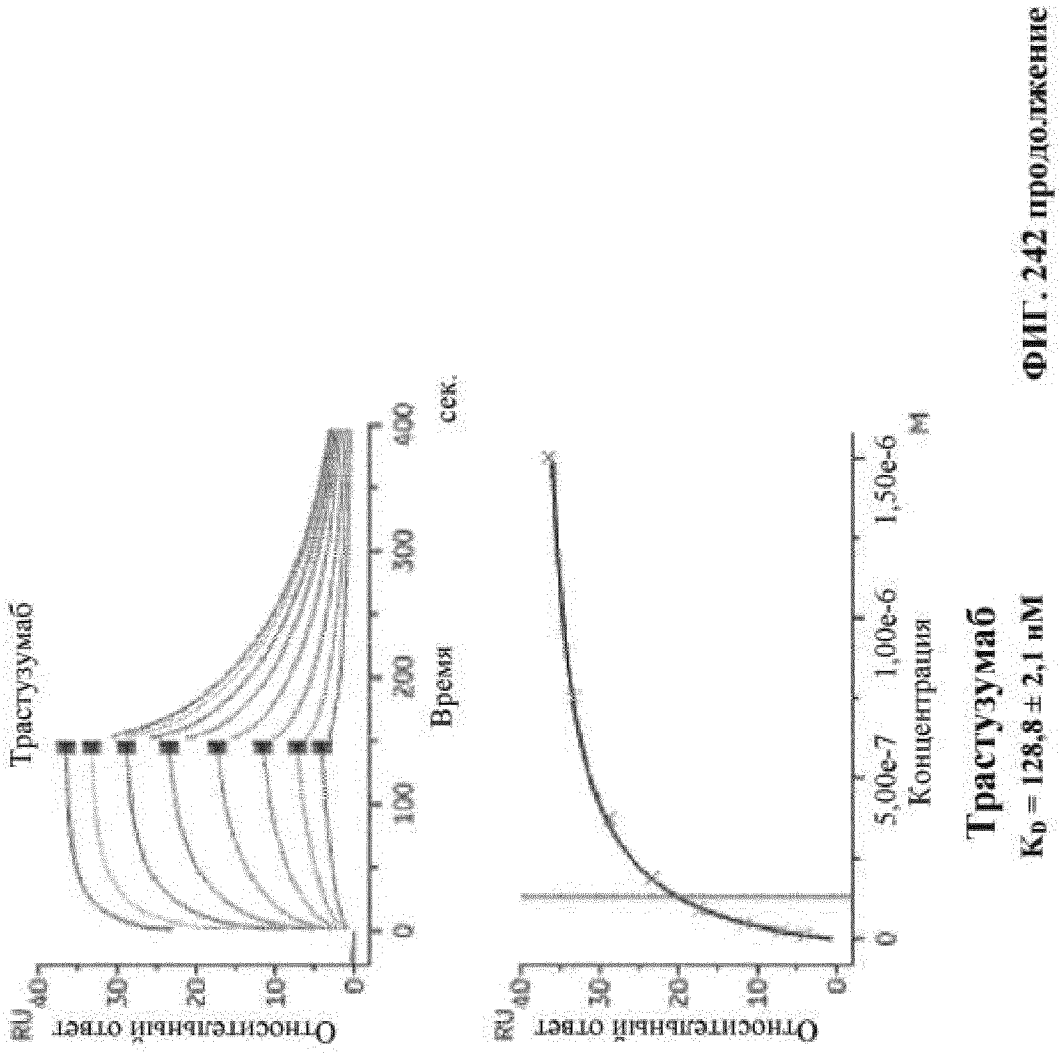
ФИГ. 242



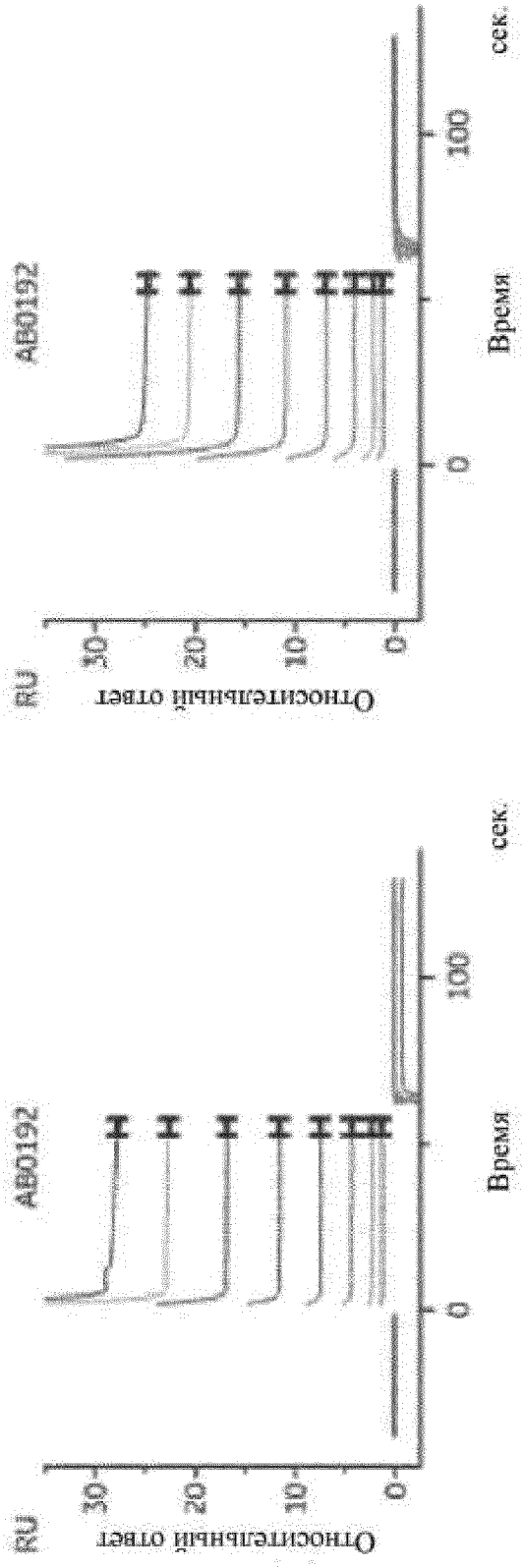

ФИГ. 242 продолжение




ФИГ. 242 продолжение



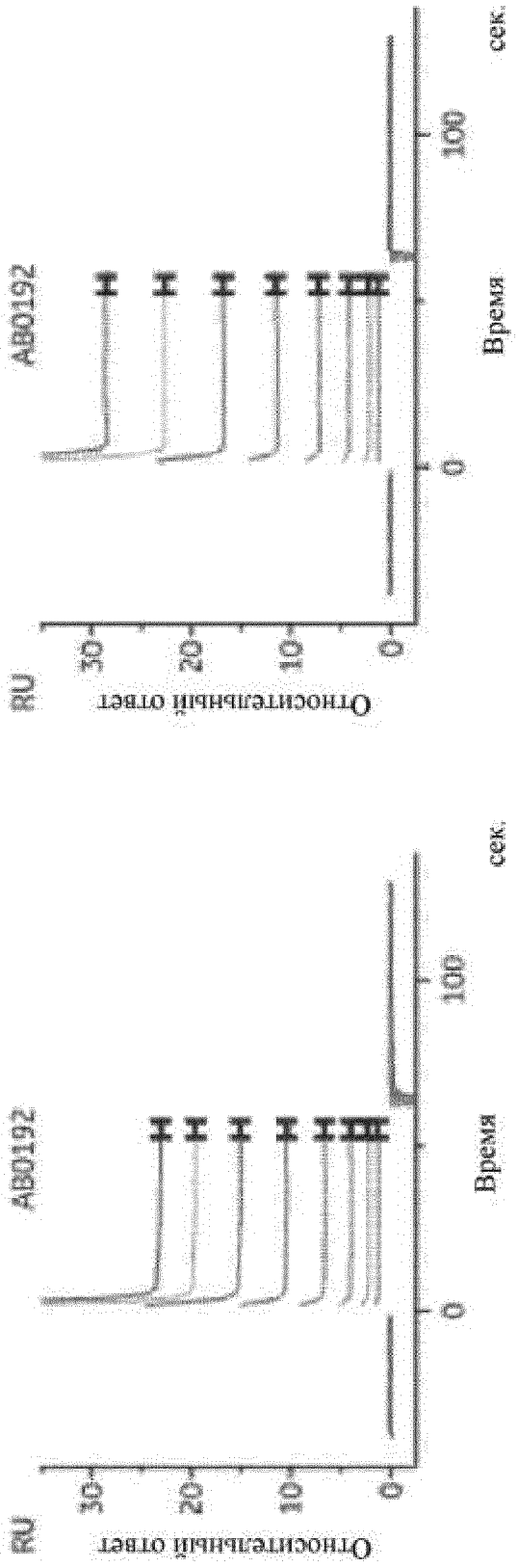

ФИГ. 242 продолжение




**AB0192**

$K_D$ = 6,1 ± 0,8 мкМ

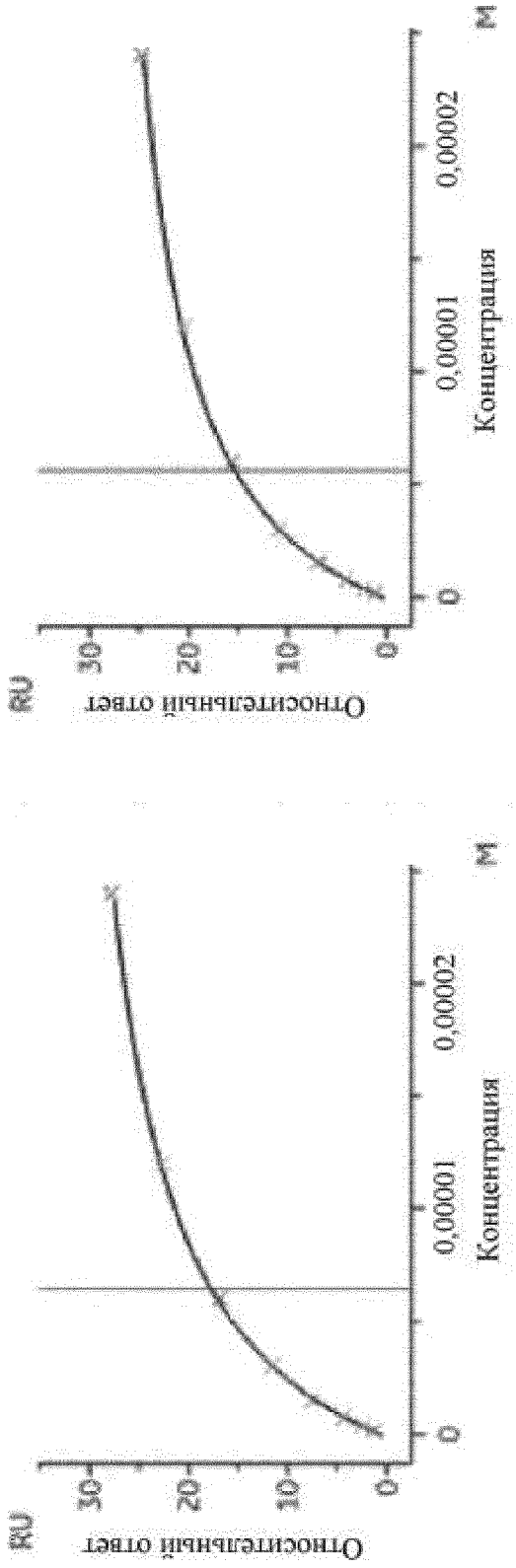
**ФИГ. 243**



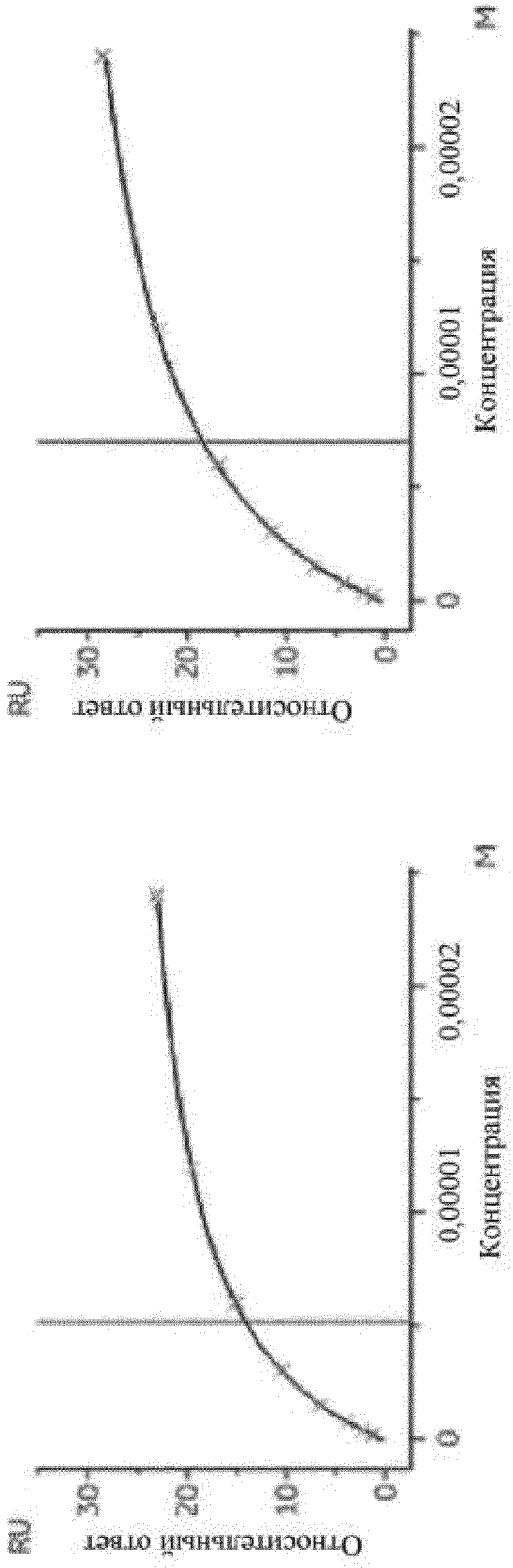

**AB0192**

$K_D$ = 6,1 ± 0,8 мкМ

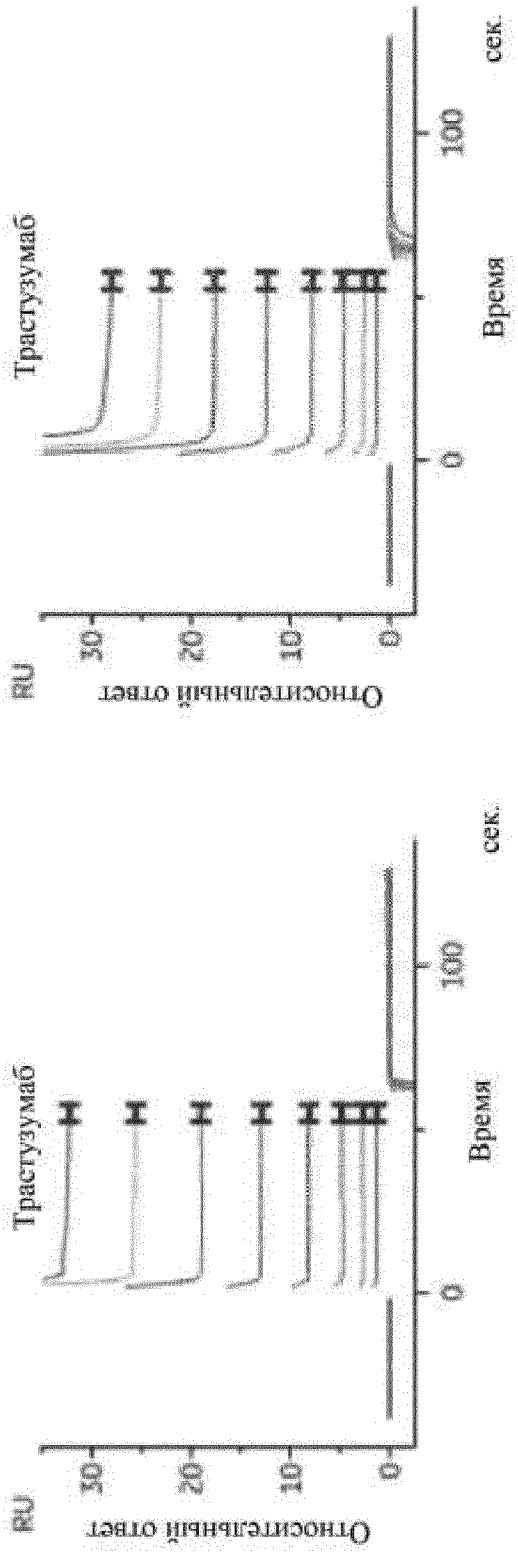
**ФИГ. 243 продолжение**




ФИГ. 243 продолжение



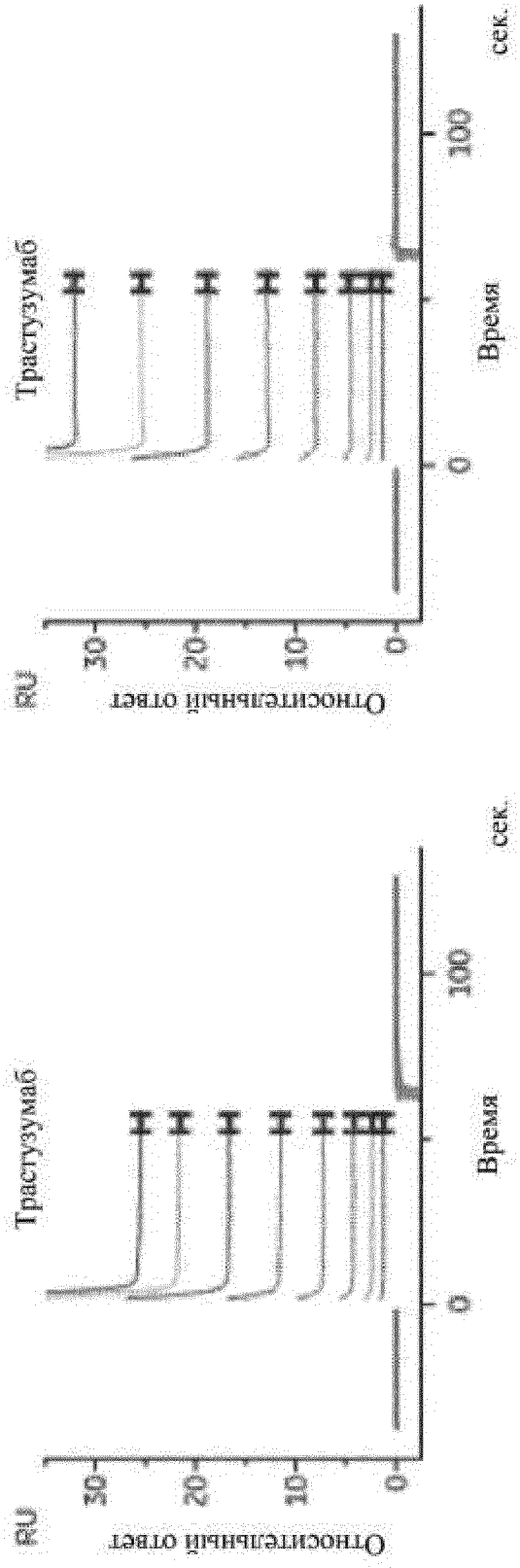

ФИГ. 243 продолжение




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 6,3 ± 1,0 мкМ**

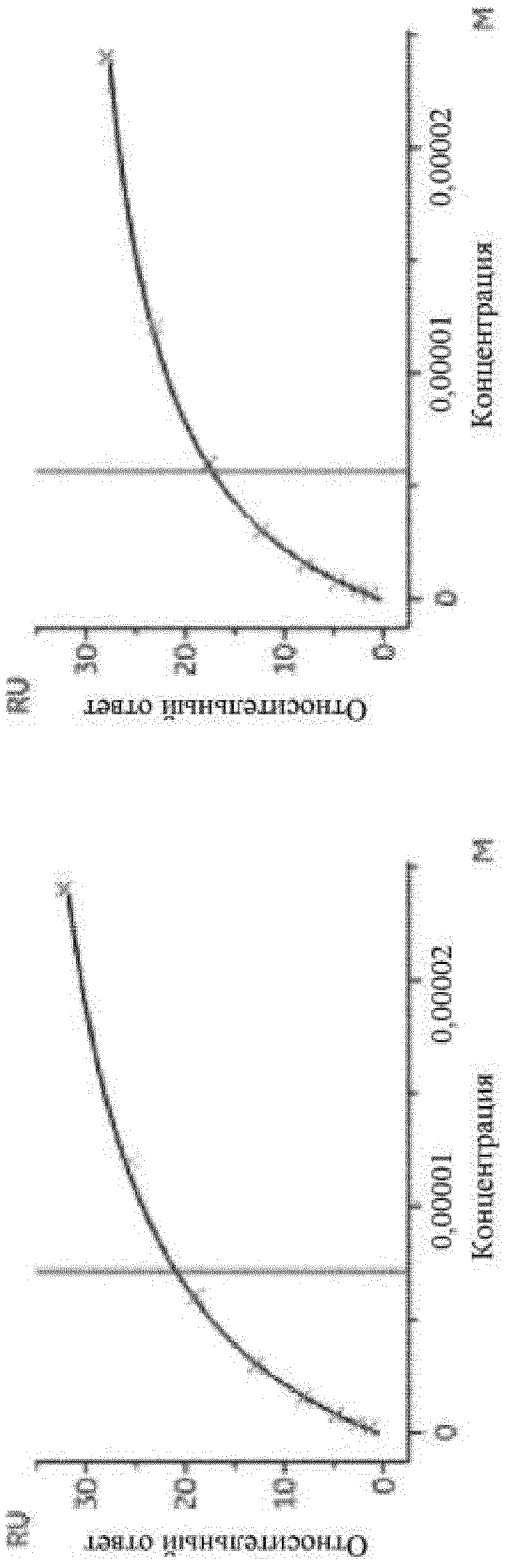
**ФИГ. 243 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 6,3 ± 1,0 мкМ**

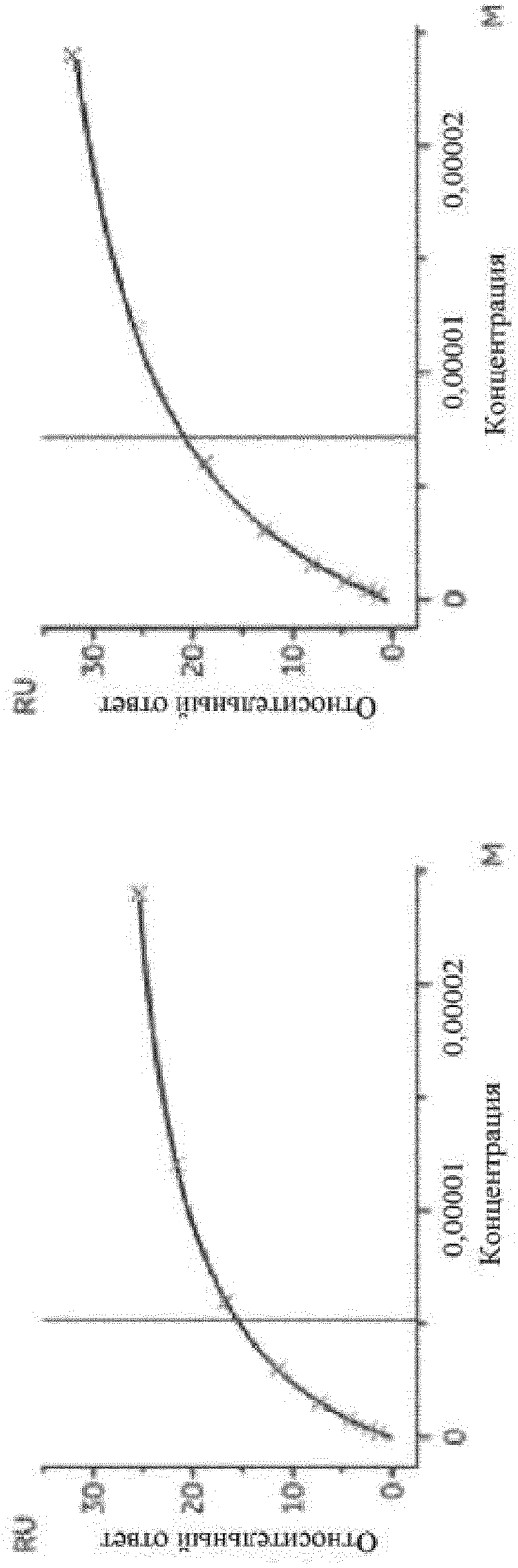
**ФИГ. 243 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 6,3 ± 1,0 мкМ**

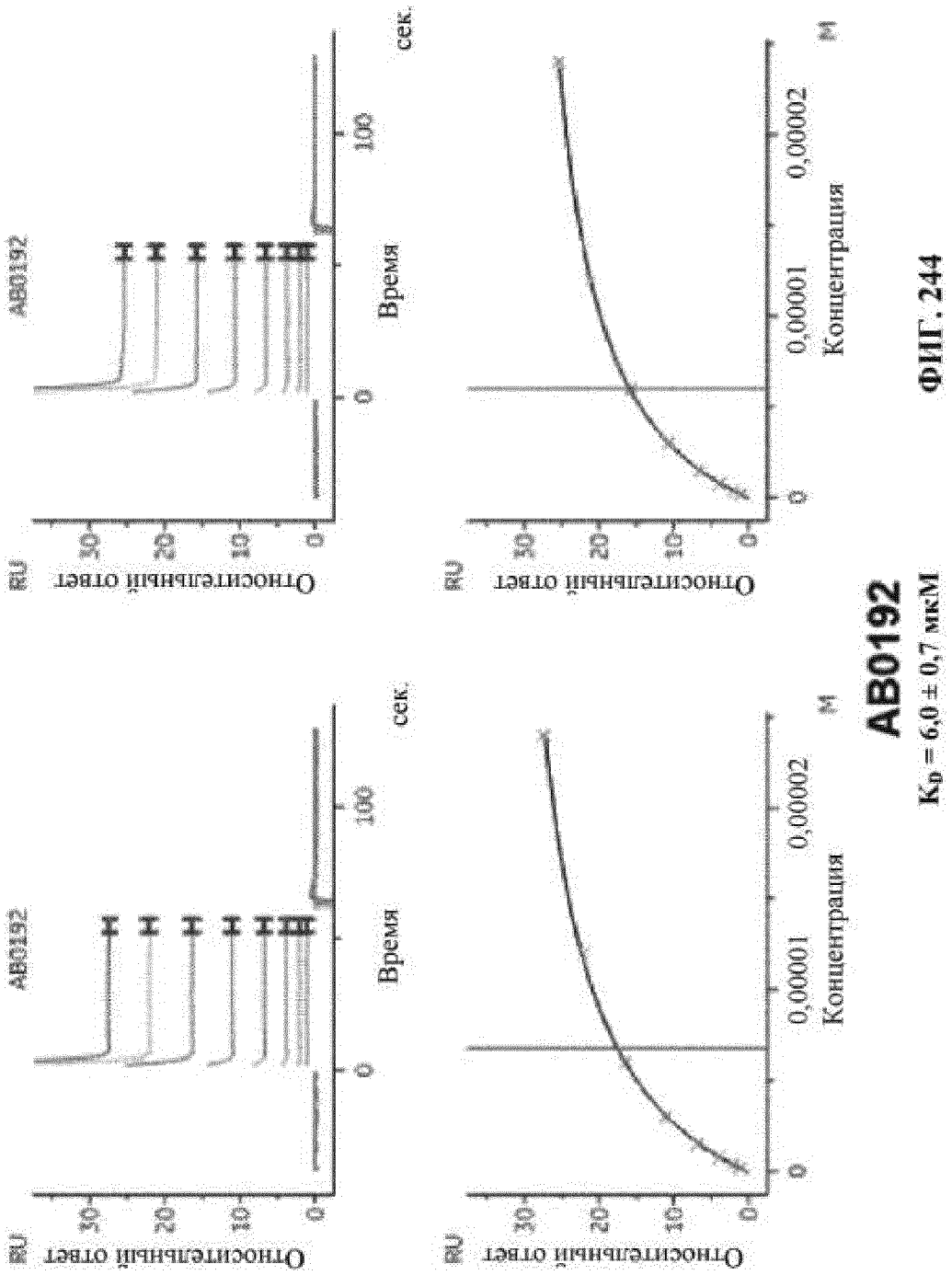
**ФИГ. 243 продолжение**



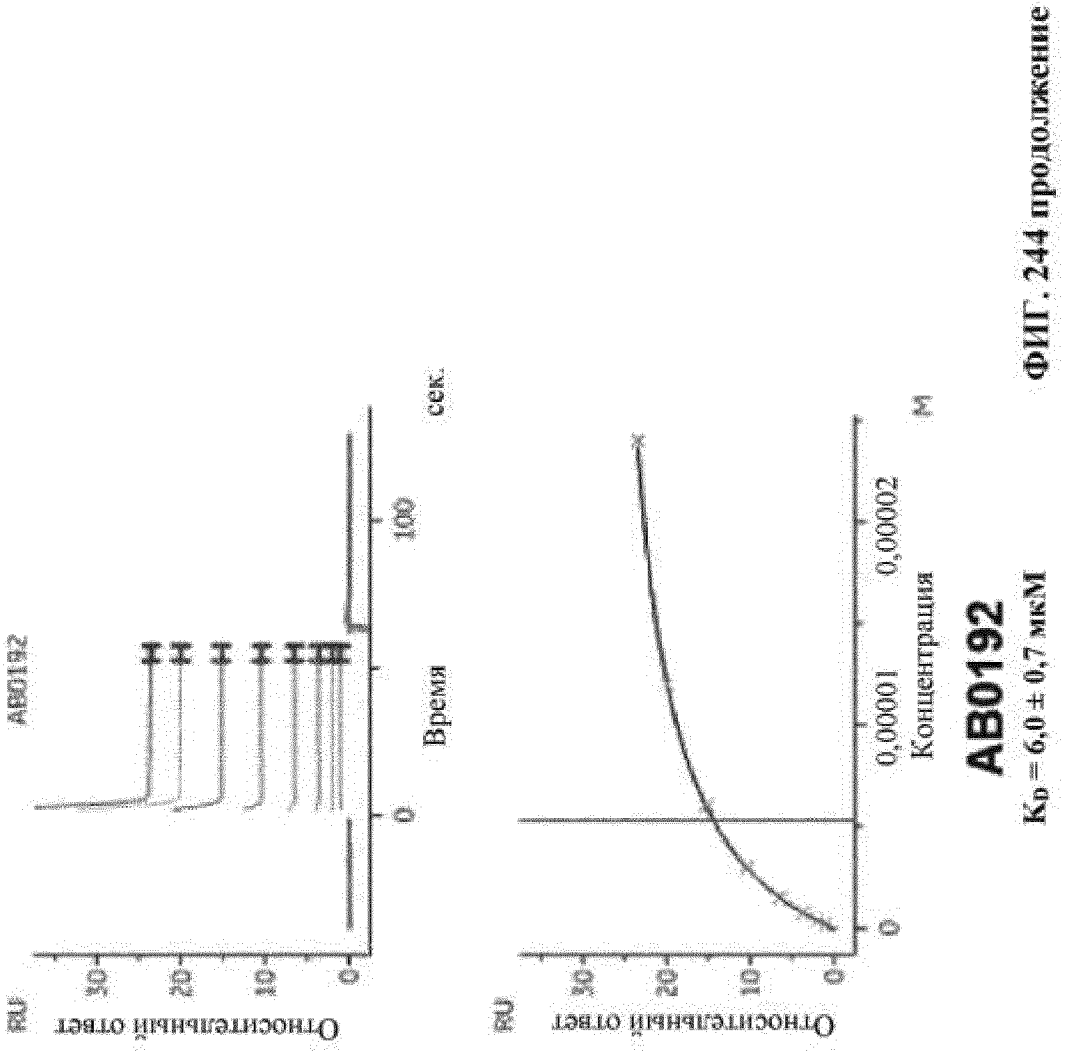

**Трастузумаб**

**$K_D$ = 6,3 ± 1,0 мкМ**

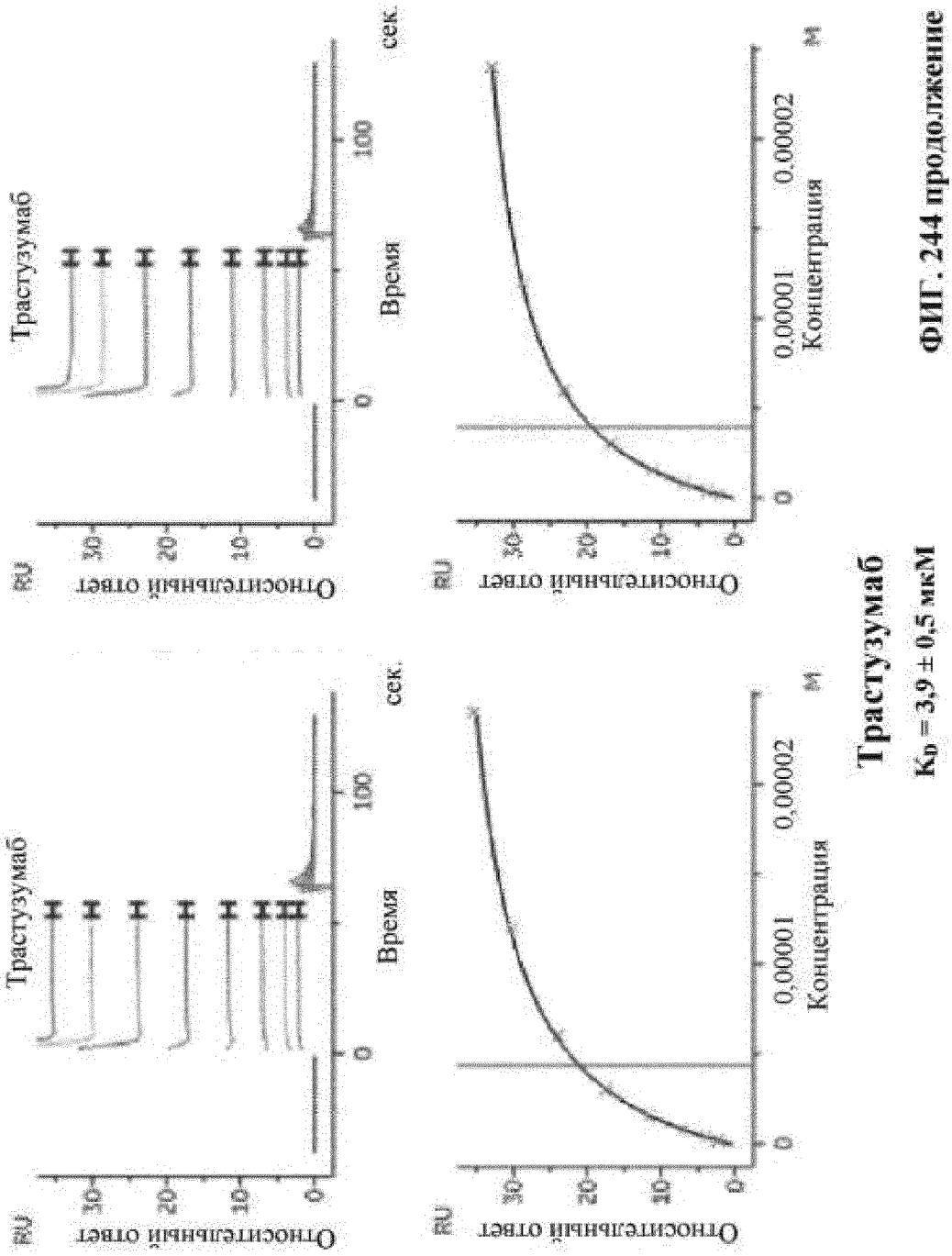
**ФИГ. 243 продолжение**


AB0192
Относительный ответ
RU
Время
сек.
Концентрация
M
$K_D$ = 6,0 ± 0,7 мкМ

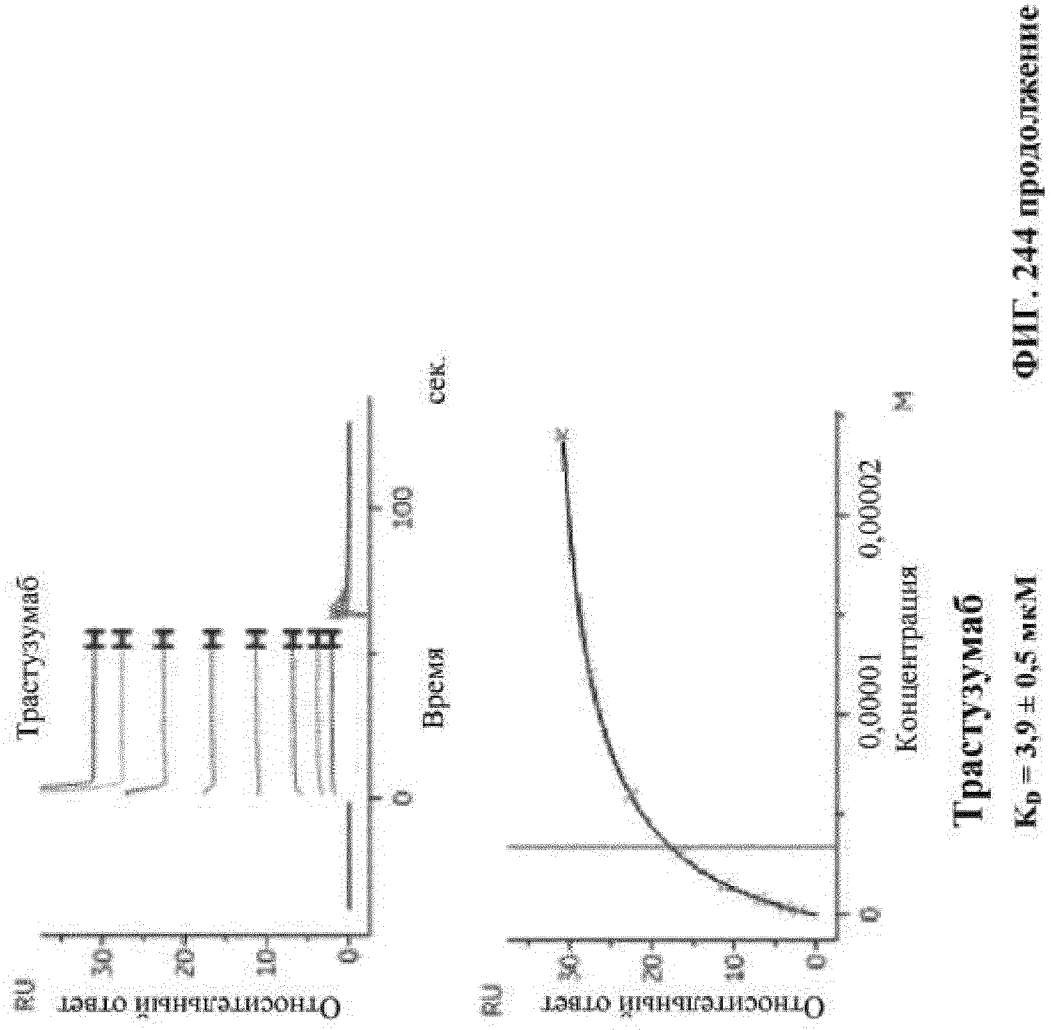
ФИГ. 244



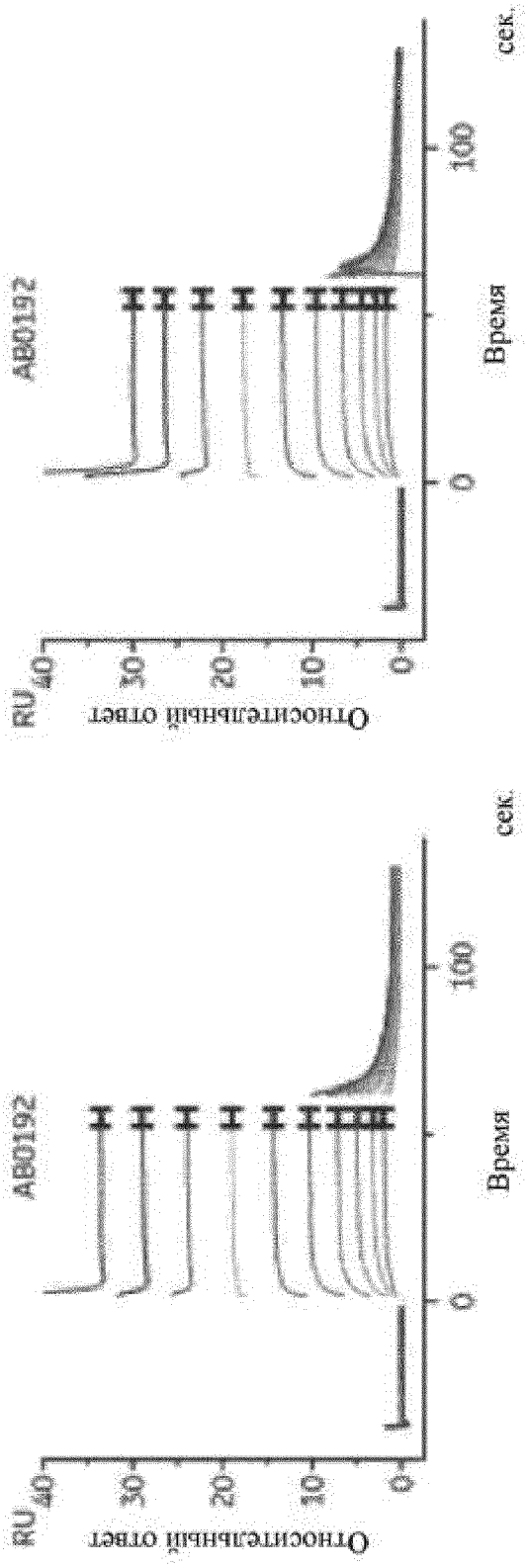

ФИГ. 244 продолжение




ФИГ. 244 продолжение

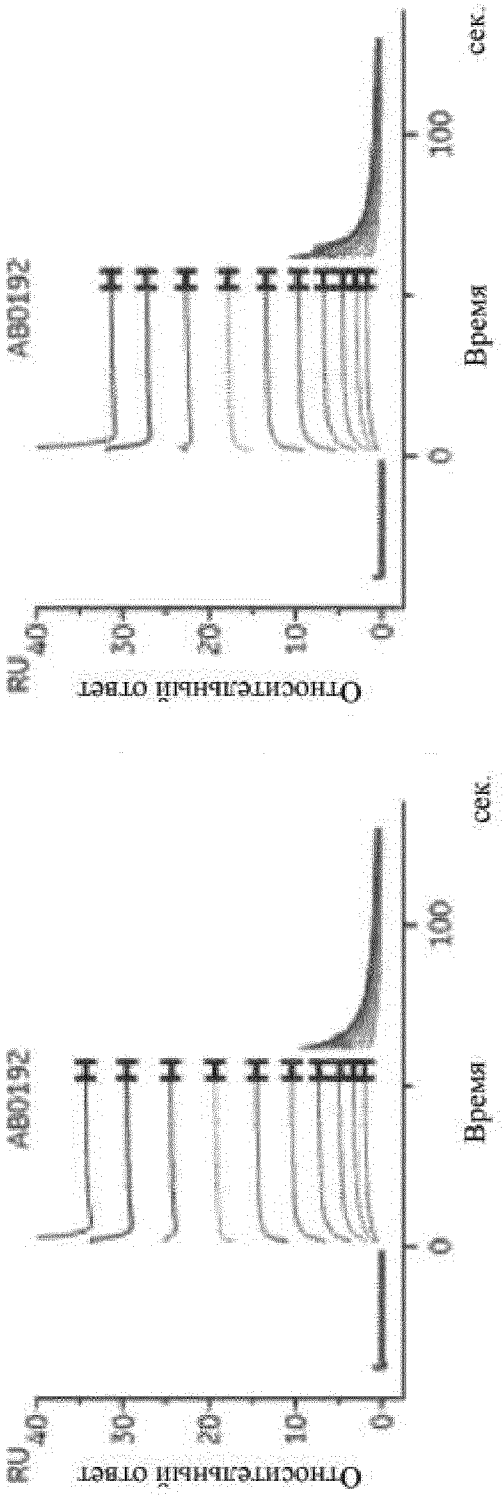



ФИГ. 244 продолжение




**AB0192**
$K_D$ = 1,5 ± 0,1 мкМ

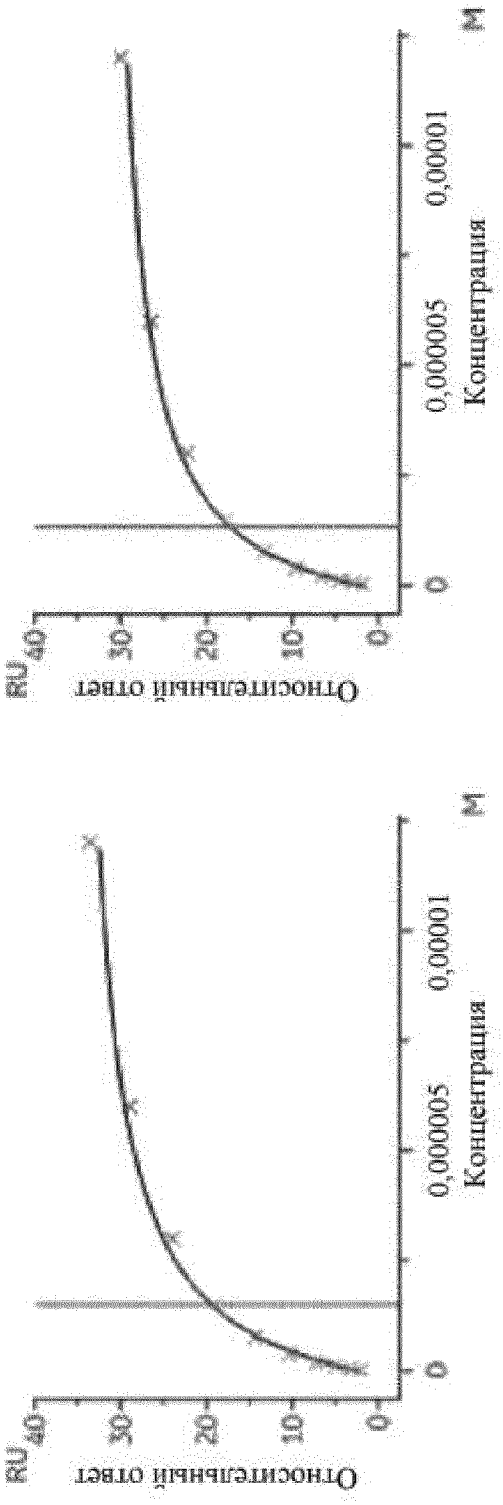
ФИГ. 245



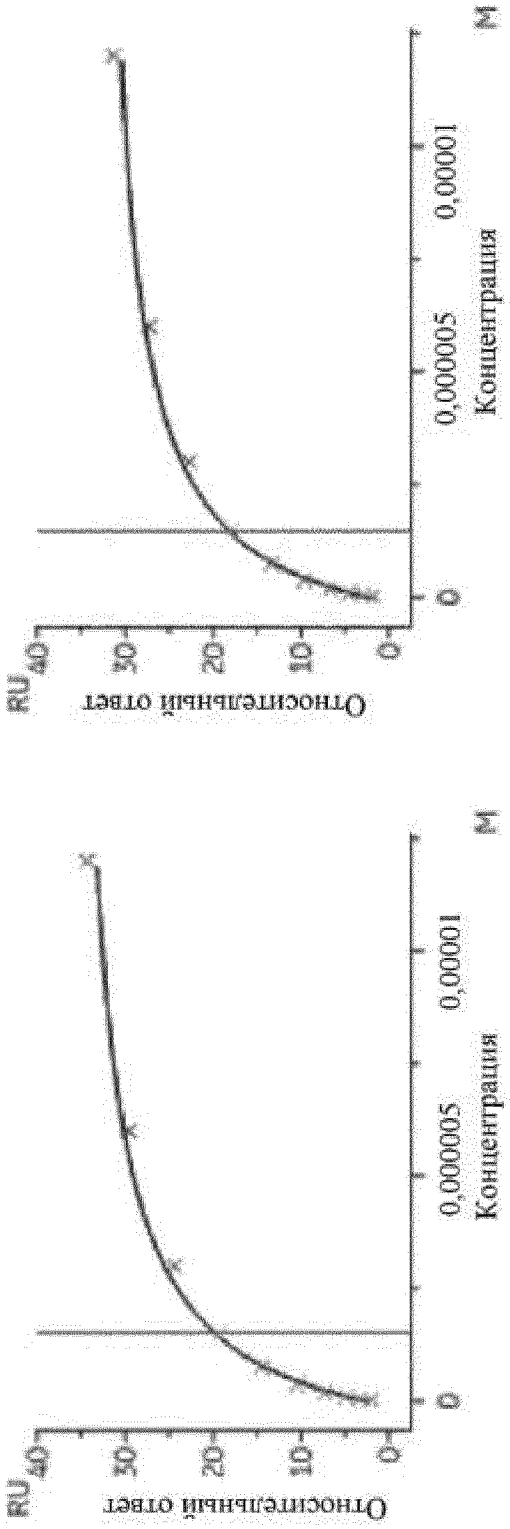

**AB0192**

$K_D$ = 1,5 ± 0,1 мкМ

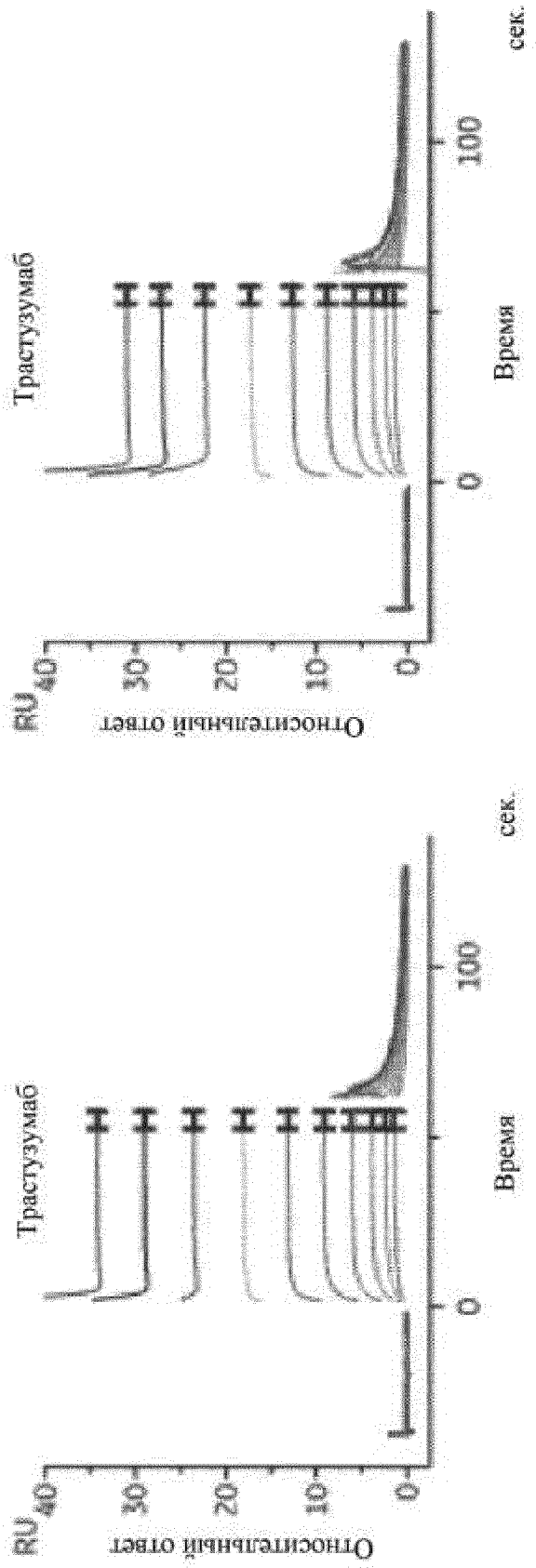
**ФИГ. 245 продолжение**




ФИГ. 245 продолжение



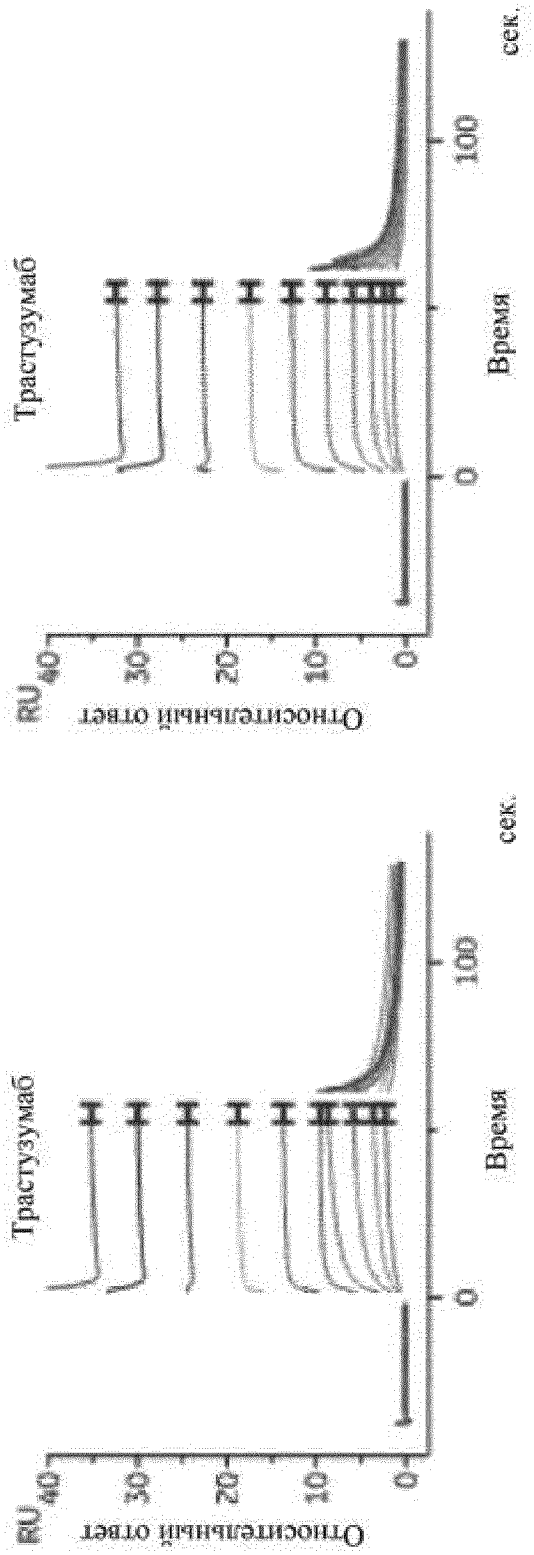

ФИГ. 245 продолжение




**Трастузумаб**

$K_D$ = 1,7 ± 0,2 мкМ

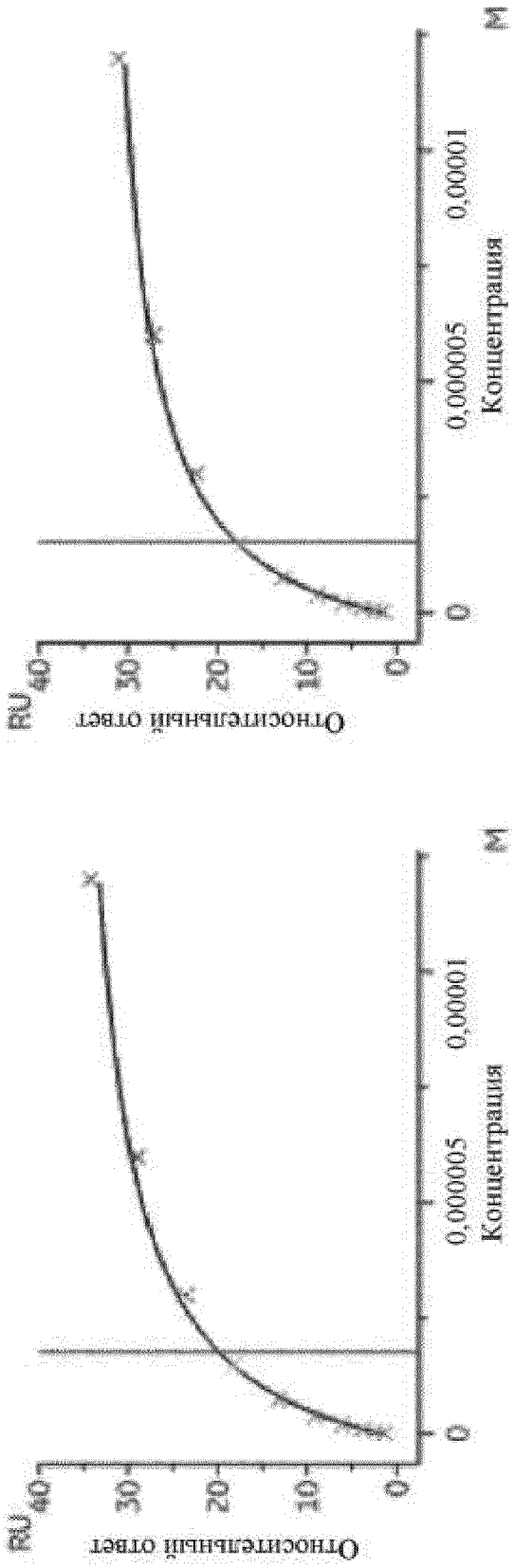
**ФИГ. 245 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1,7 ± 0,2 мкМ**

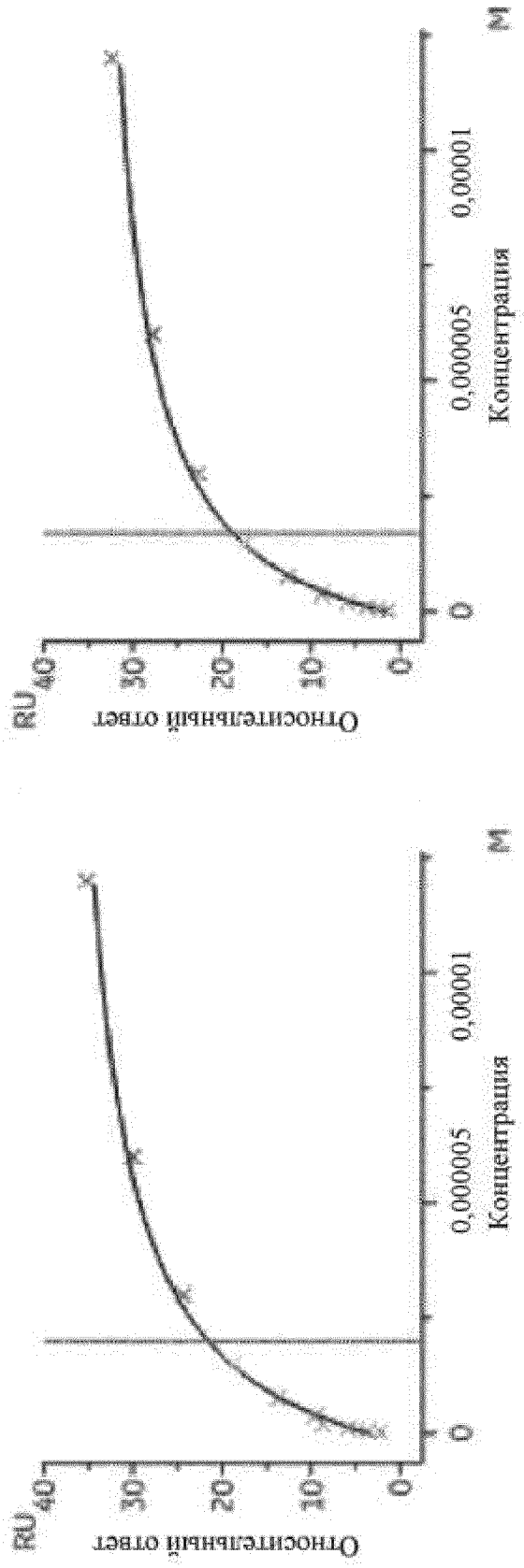
**ФИГ. 245 продолжение**




**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1,7 ± 0,2 мкМ**

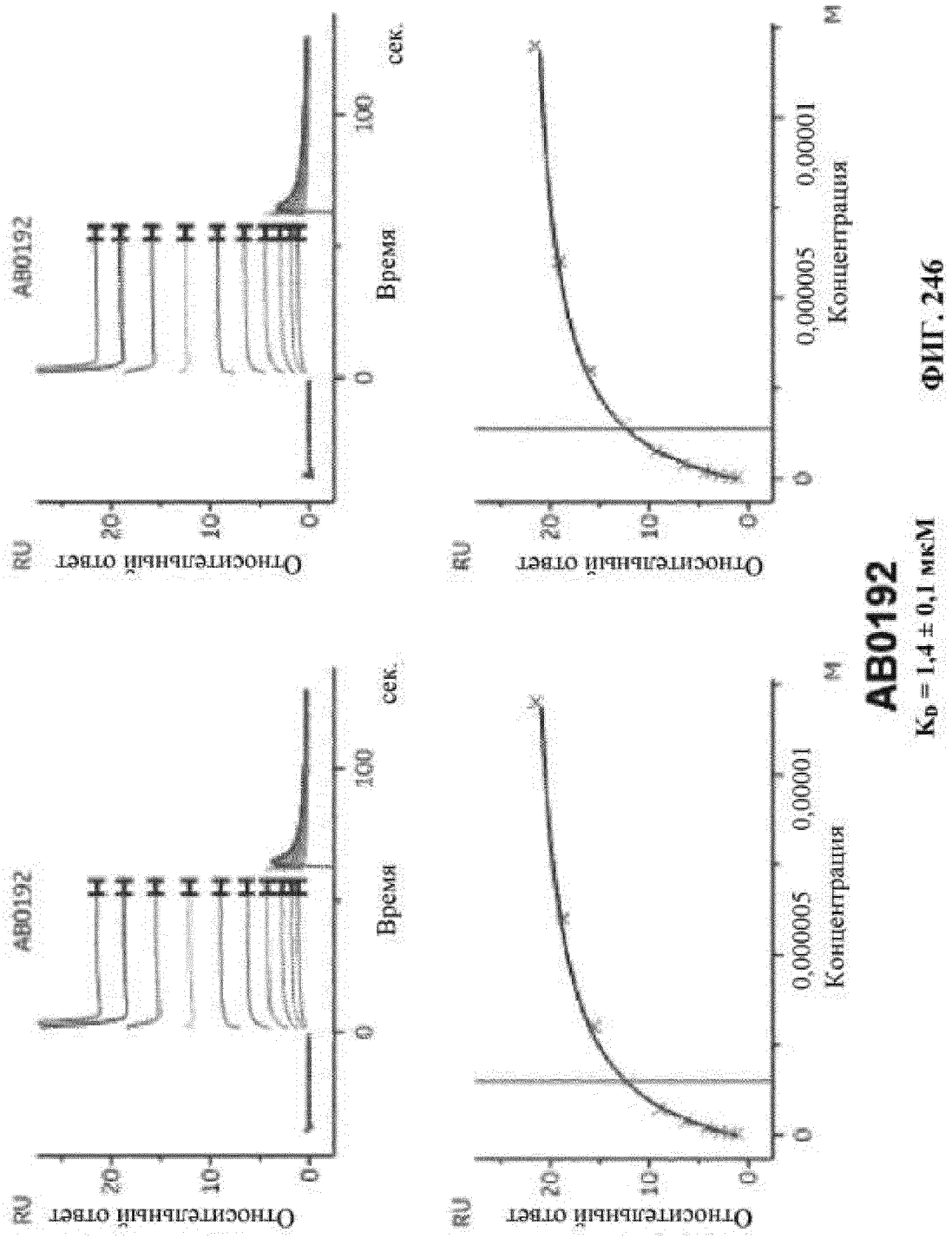
**ФИГ. 245 продолжение**



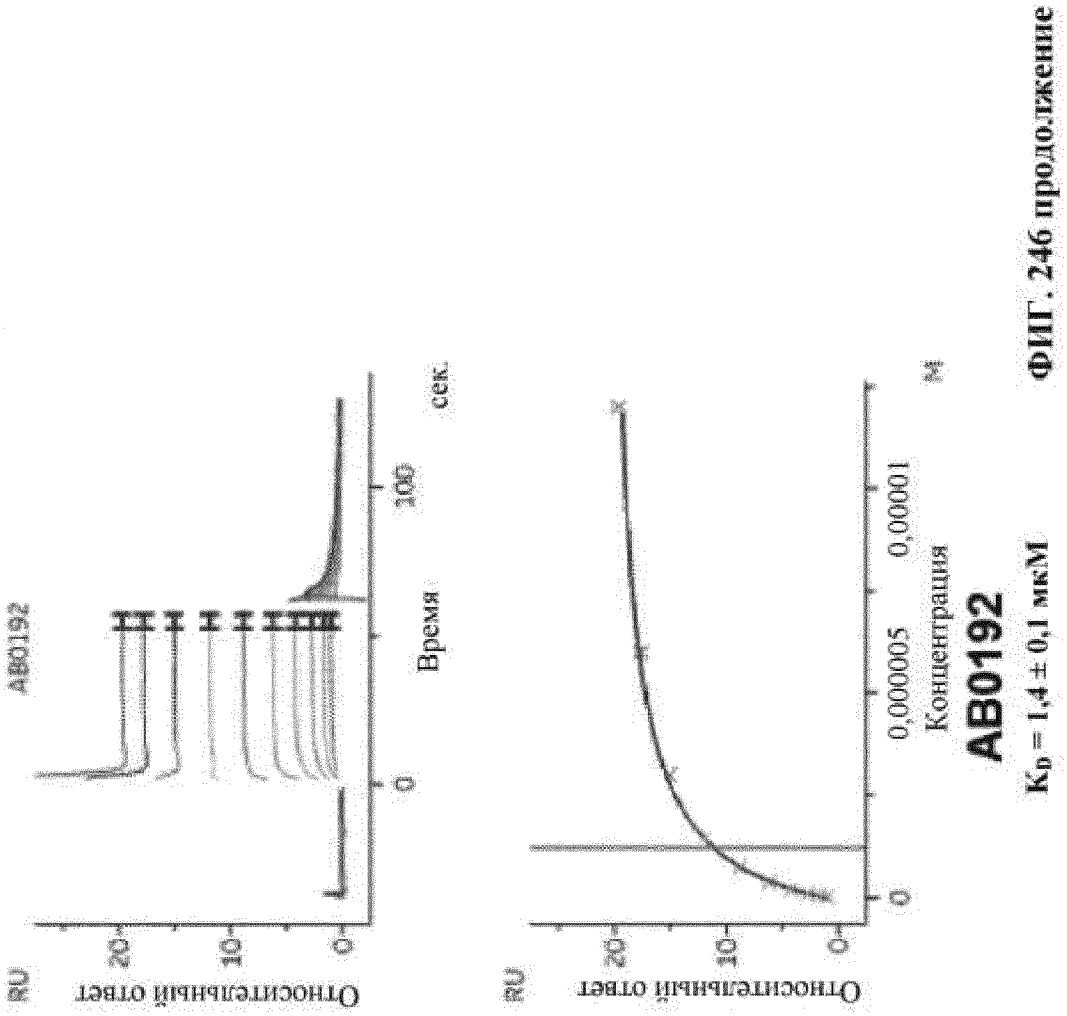

**Трастузумаб**

**$K_D$ = 1,7 ± 0,2 мкМ**

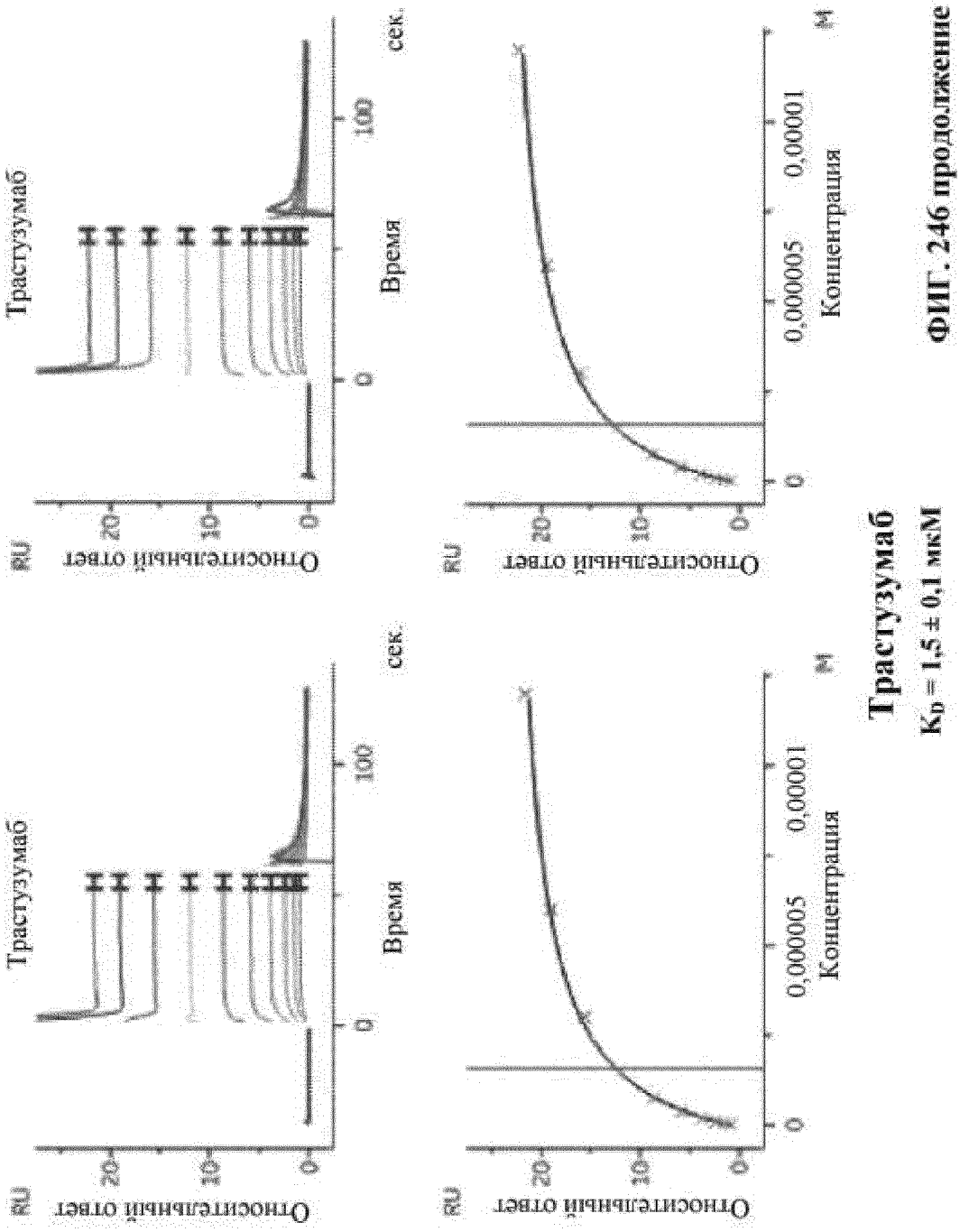
**ФИГ. 245 продолжение**


AB0192
Относительный ответ
RU
Время
сек.
Концентрация
M
$K_D$ = 1,4 ± 0,1 мкМ

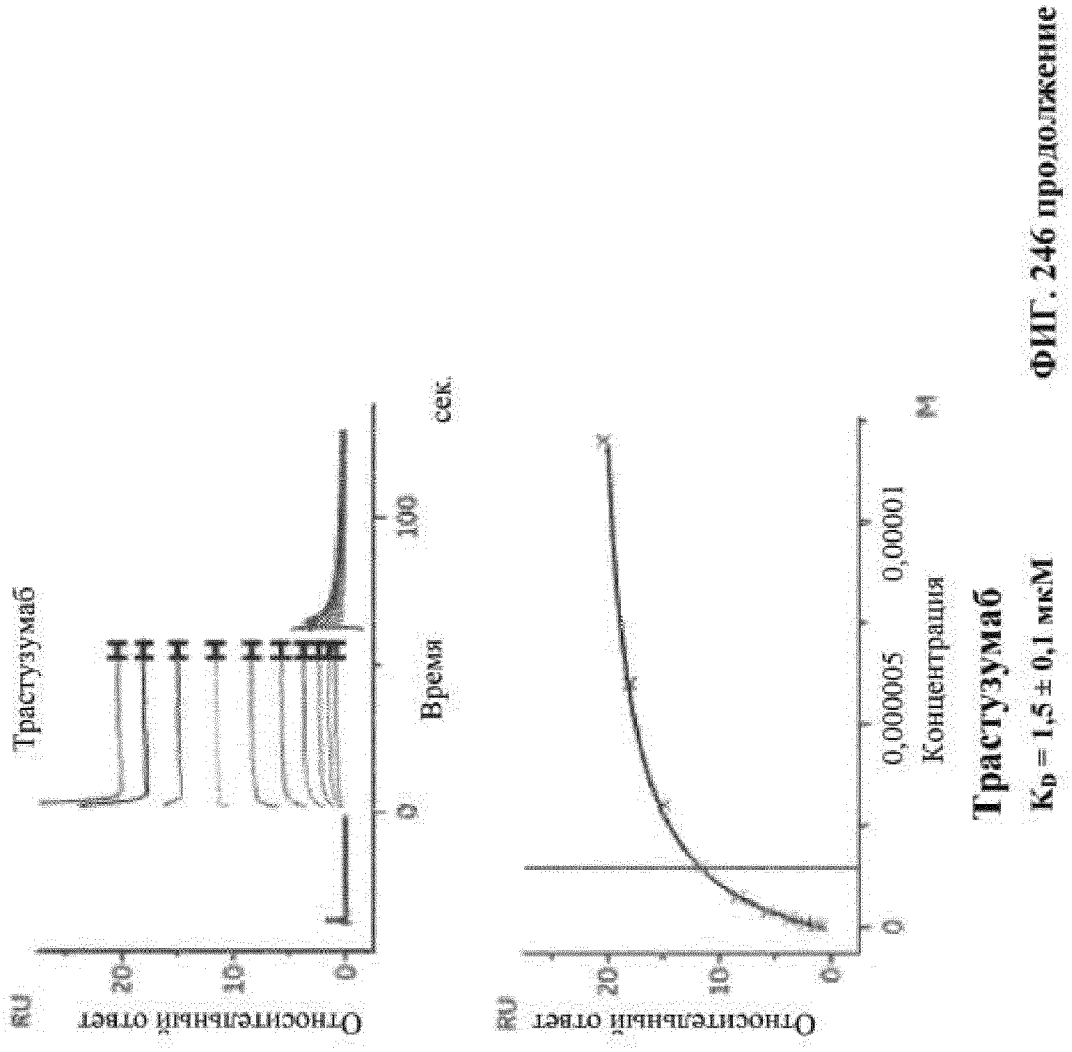
ФИГ. 246




ФИГ. 246 продолжение

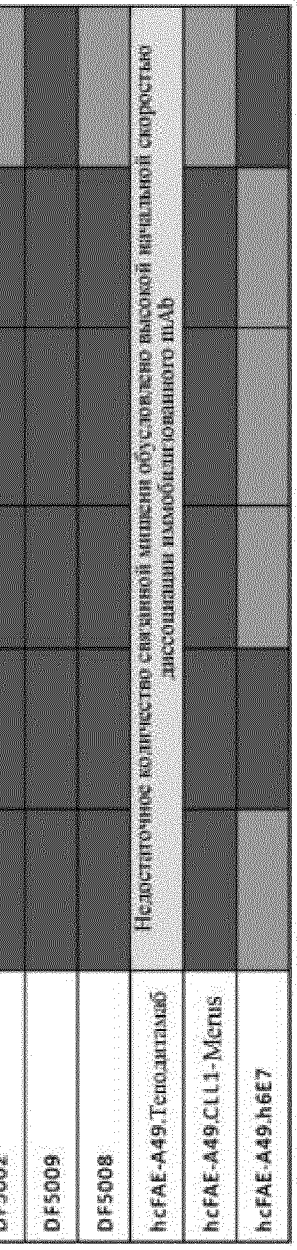



**ФИГ. 246 продолжение**



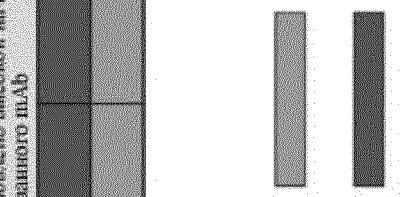

ФИГ. 246 продолжение

ФИГ. 247

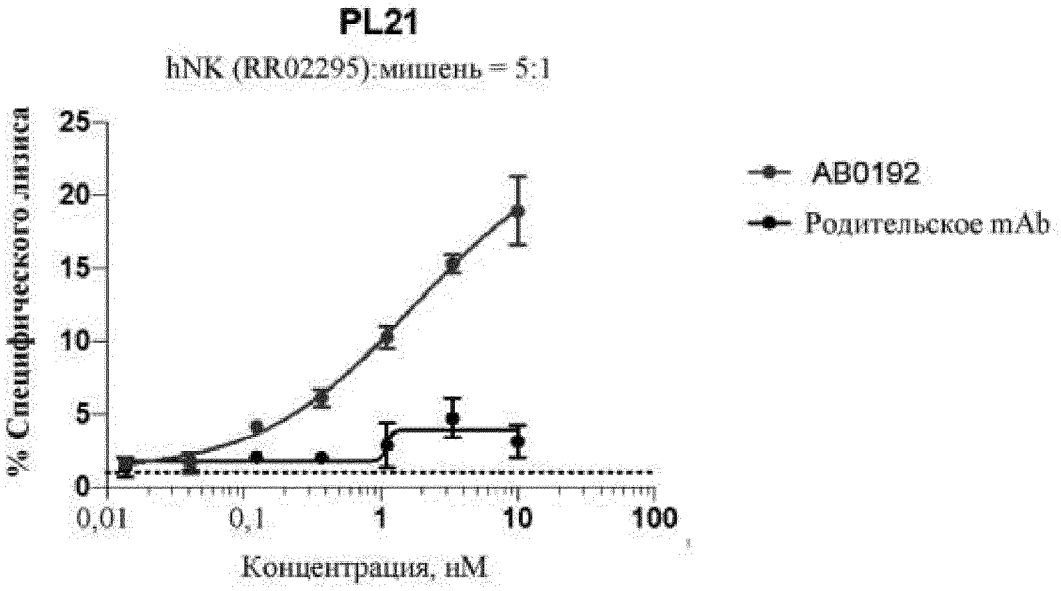



| | AB0237 | AB0192 | AB0089 | hcFAE-A49. Теподитамаб | hcFAE-A49.CLL1-Menis** | hcFAE-A49.h6E7*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DF5002 | | | | | | |
| DF5009 | | | | | | |
| DF5008 | | | | | | |
| hcFAE-A49.Теподитамаб | Недостаточное количество связанной мишени обусловлено высокой начальной скоростью диссоциации иммобилизованного mAb | | | | | |
| hcFAE-A49.CLL1-Menis | | | | | | |
| hcFAE-A49.h6E7 | | | | | | |

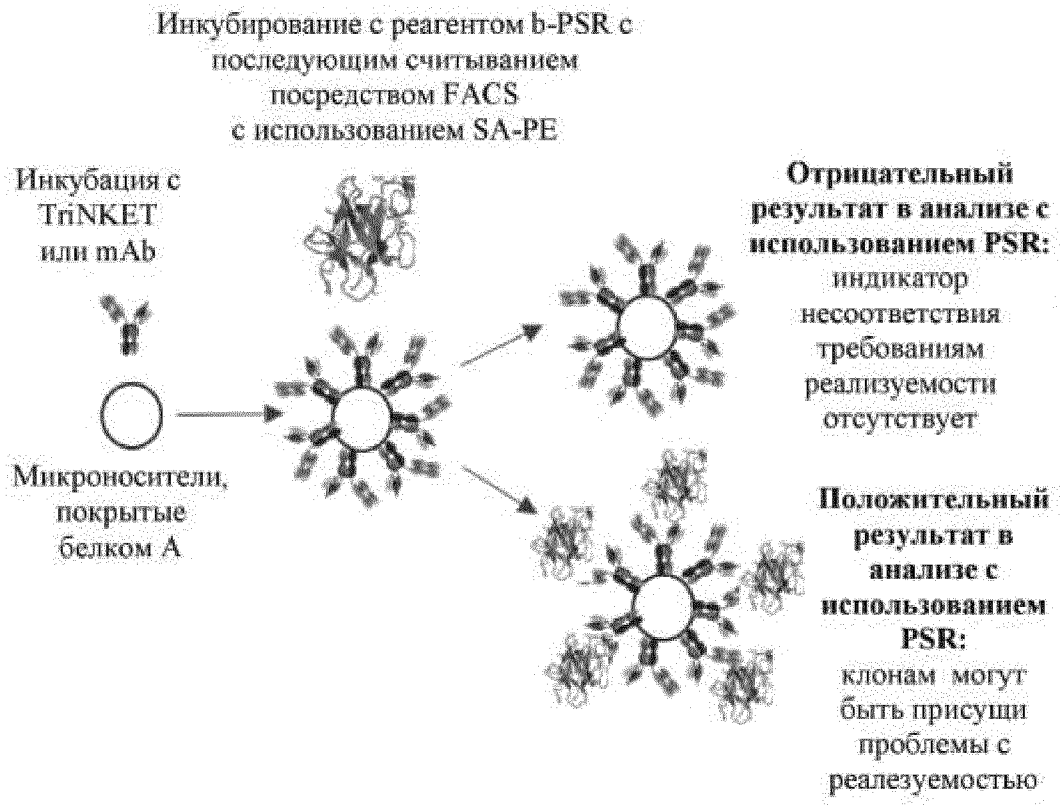
* Duobody на основе CLEC12A-связывающего плеча из теподитамаба (Menis)
** Duobody на основе CLEC12A-связывающего плеча из mAb CLL1-Menis
***Duobody на основе связывающей молекулы от Genentech

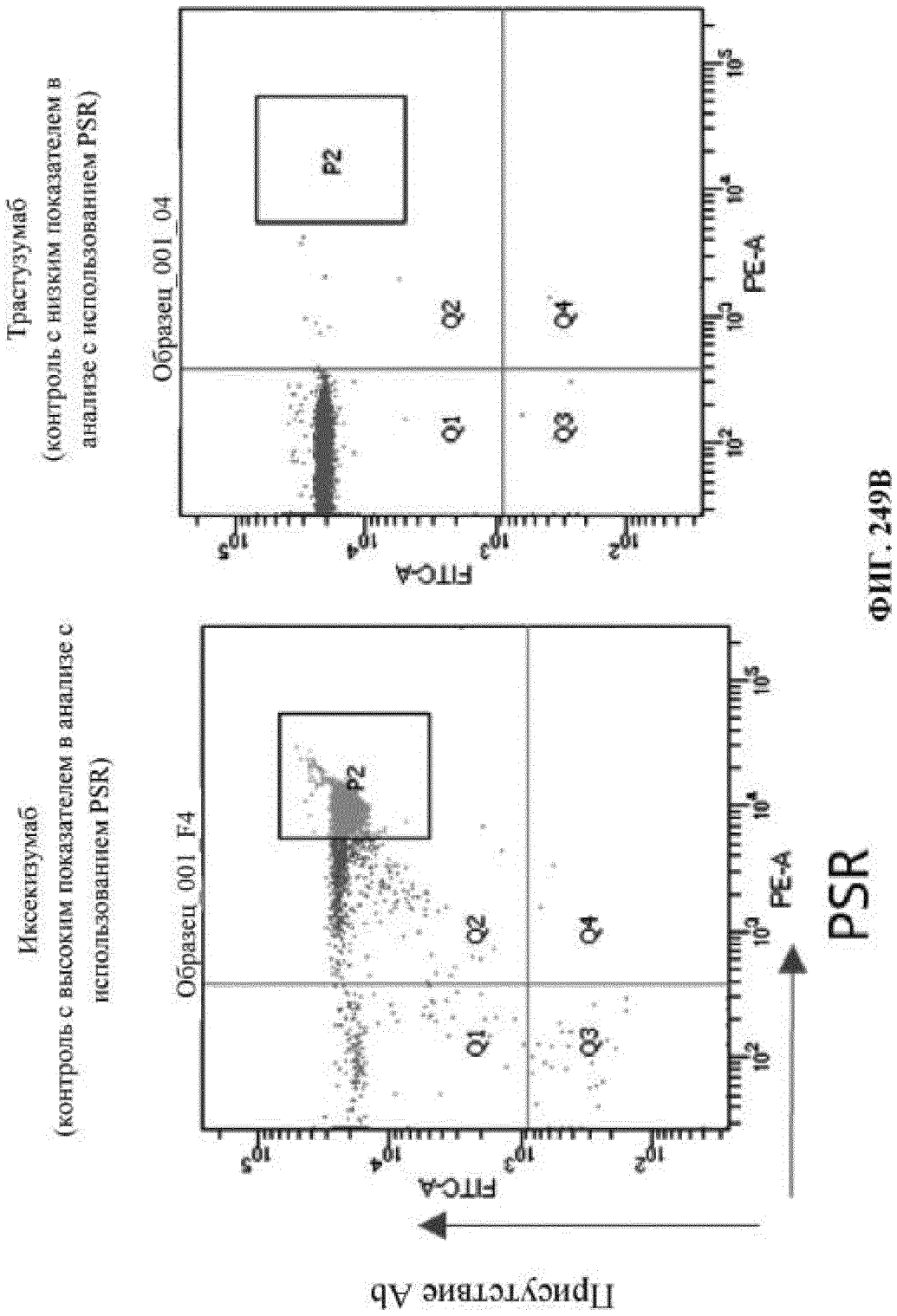


**ФИГ. 248**

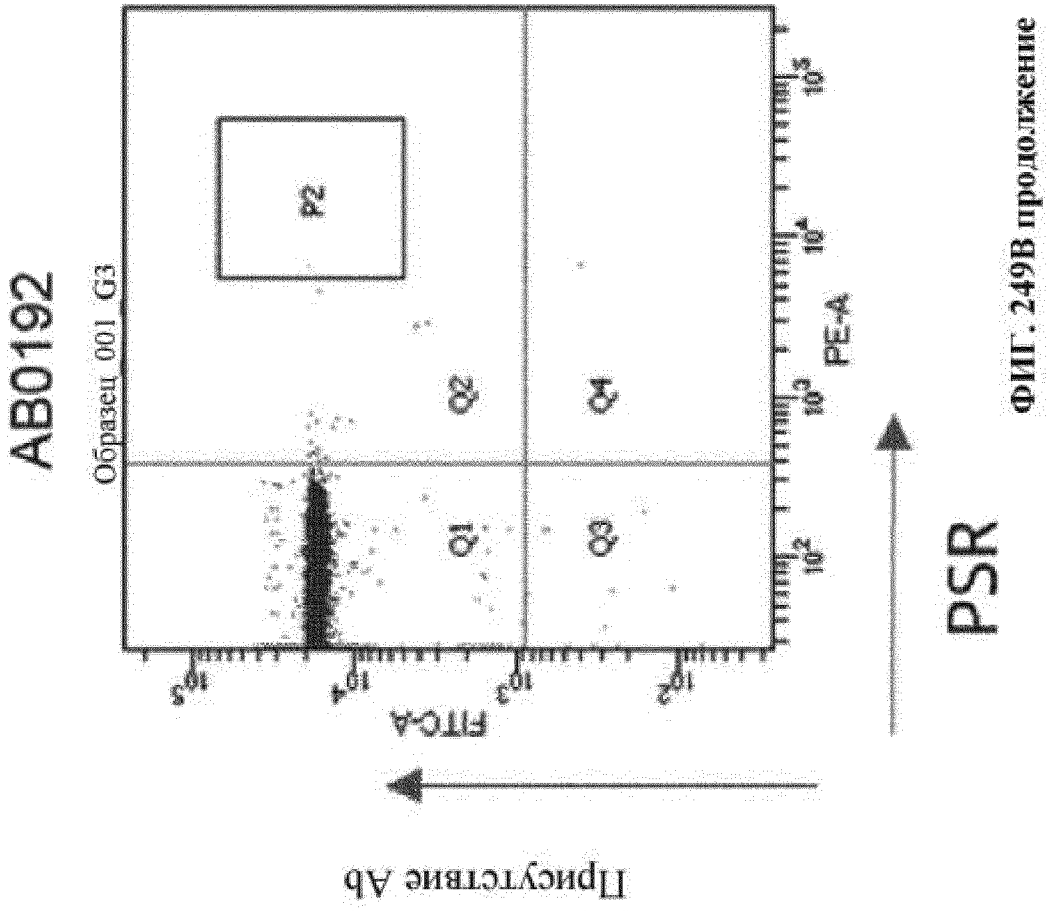



**ФИГ. 249А**



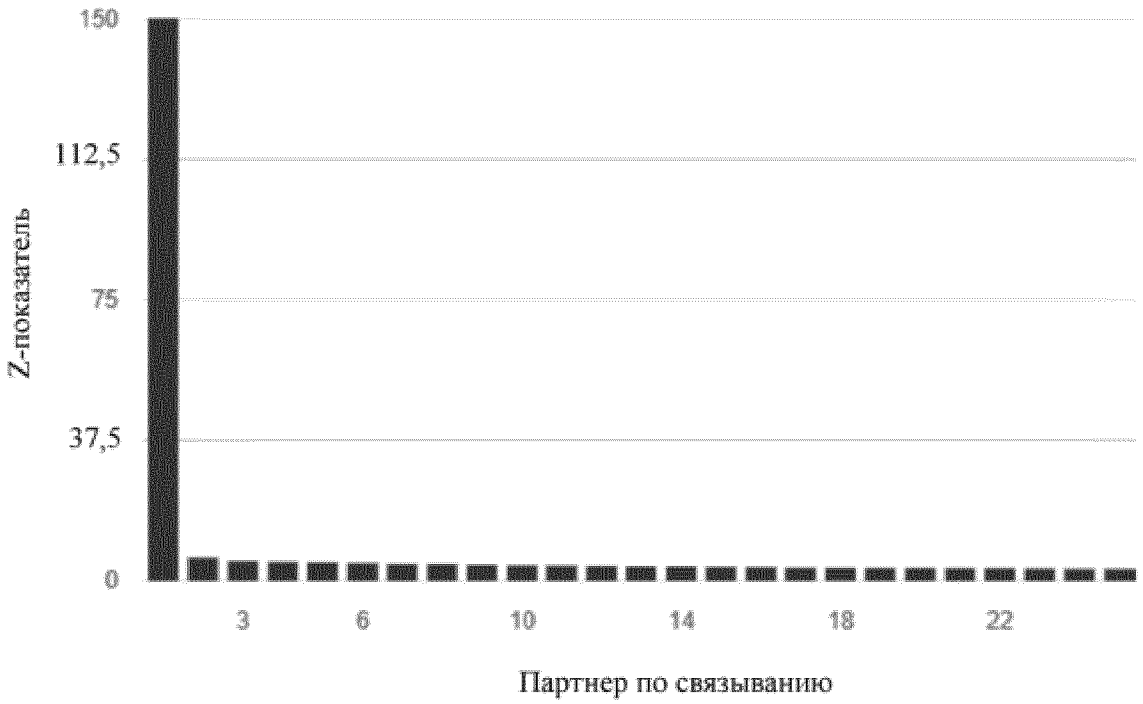

Трастузумаб
(контроль с низким показателем в анализе с использованием PSR)
Образец_001_04
P2
Q1
Q2
Q3
Q4
FITC-A
PE-A
Иксекизумаб
(контроль с высоким показателем в анализе с использованием PSR)
Образец_001_F4
P2
Q1
Q2
Q3
Q4
FITC-A
PE-A
PSR
Присутствие Ab

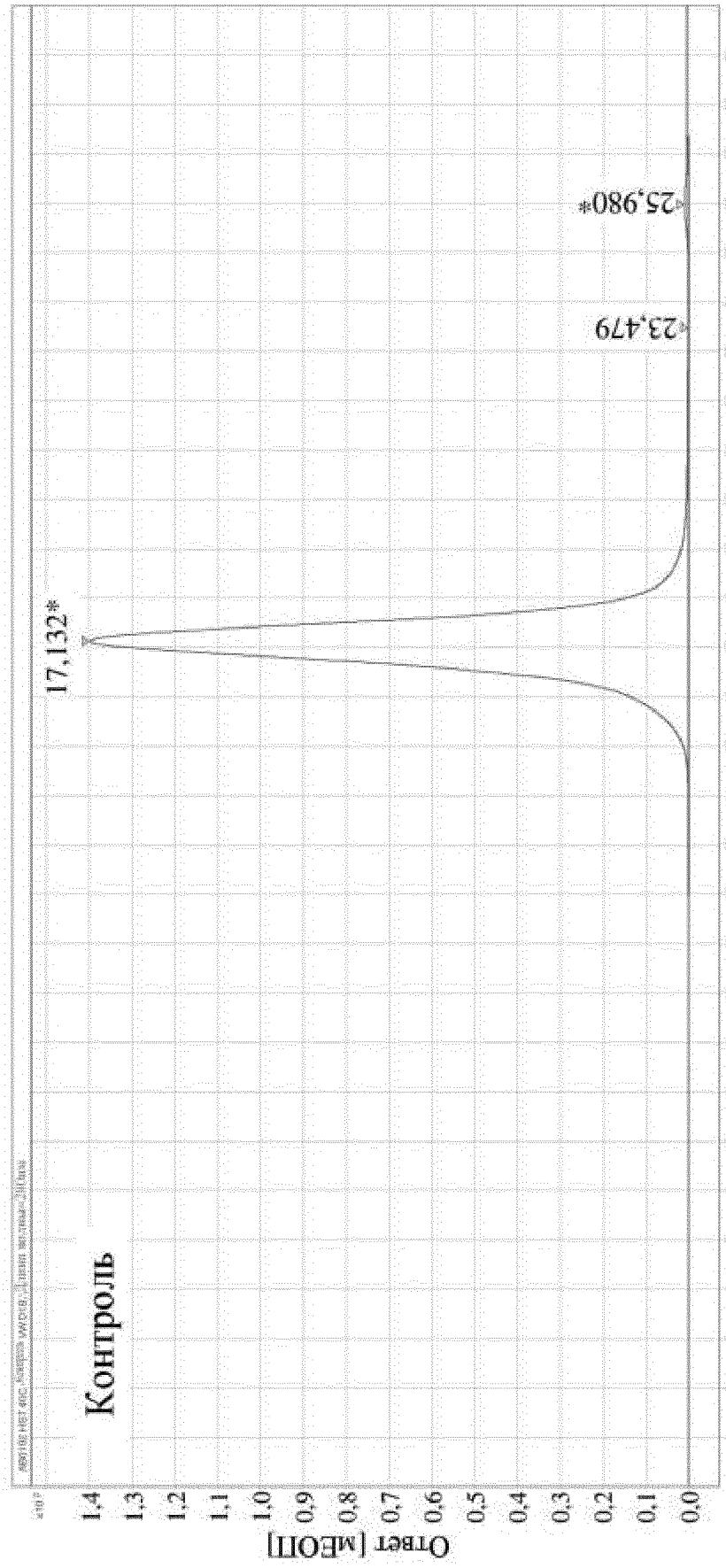
ФИГ. 249B



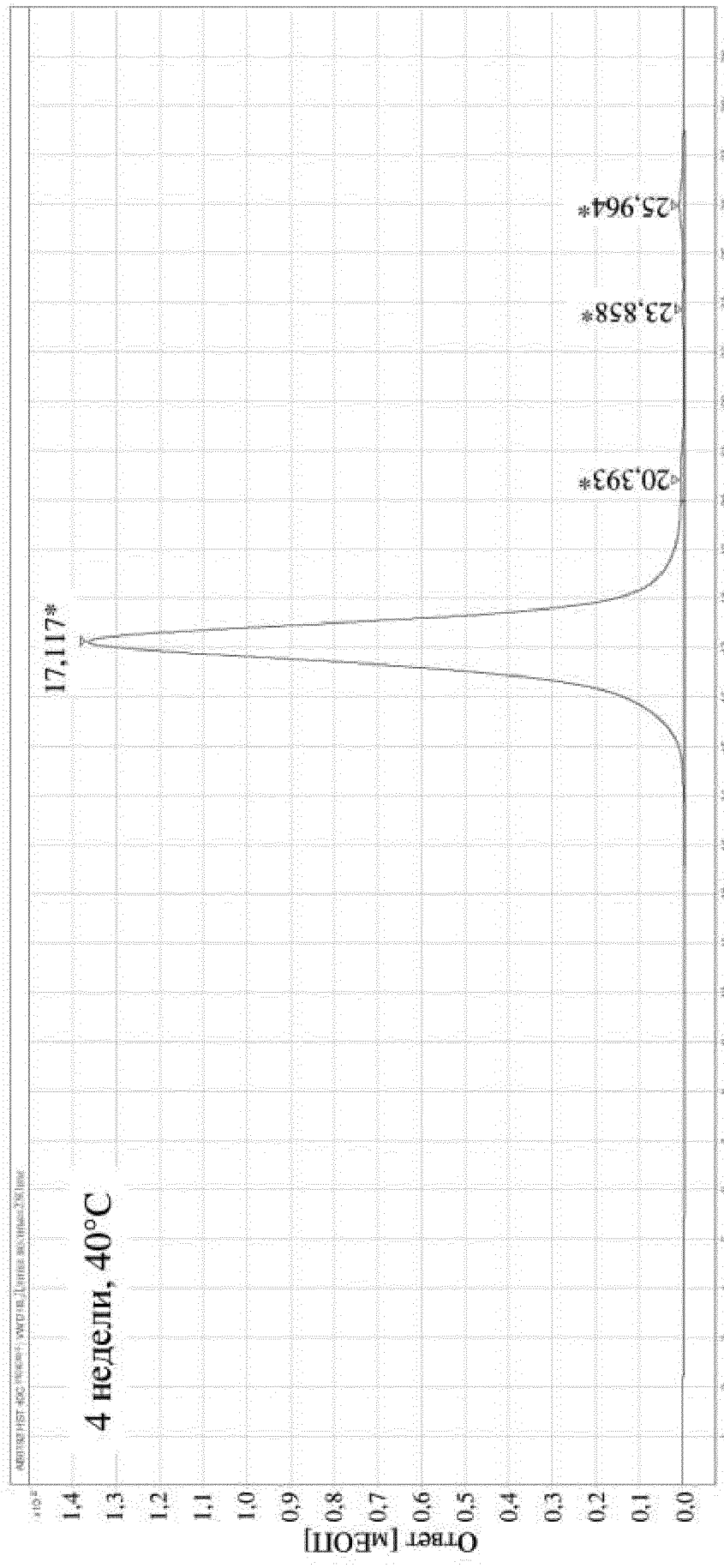

ФИГ. 249В продолжение

**ФИГ. 250**

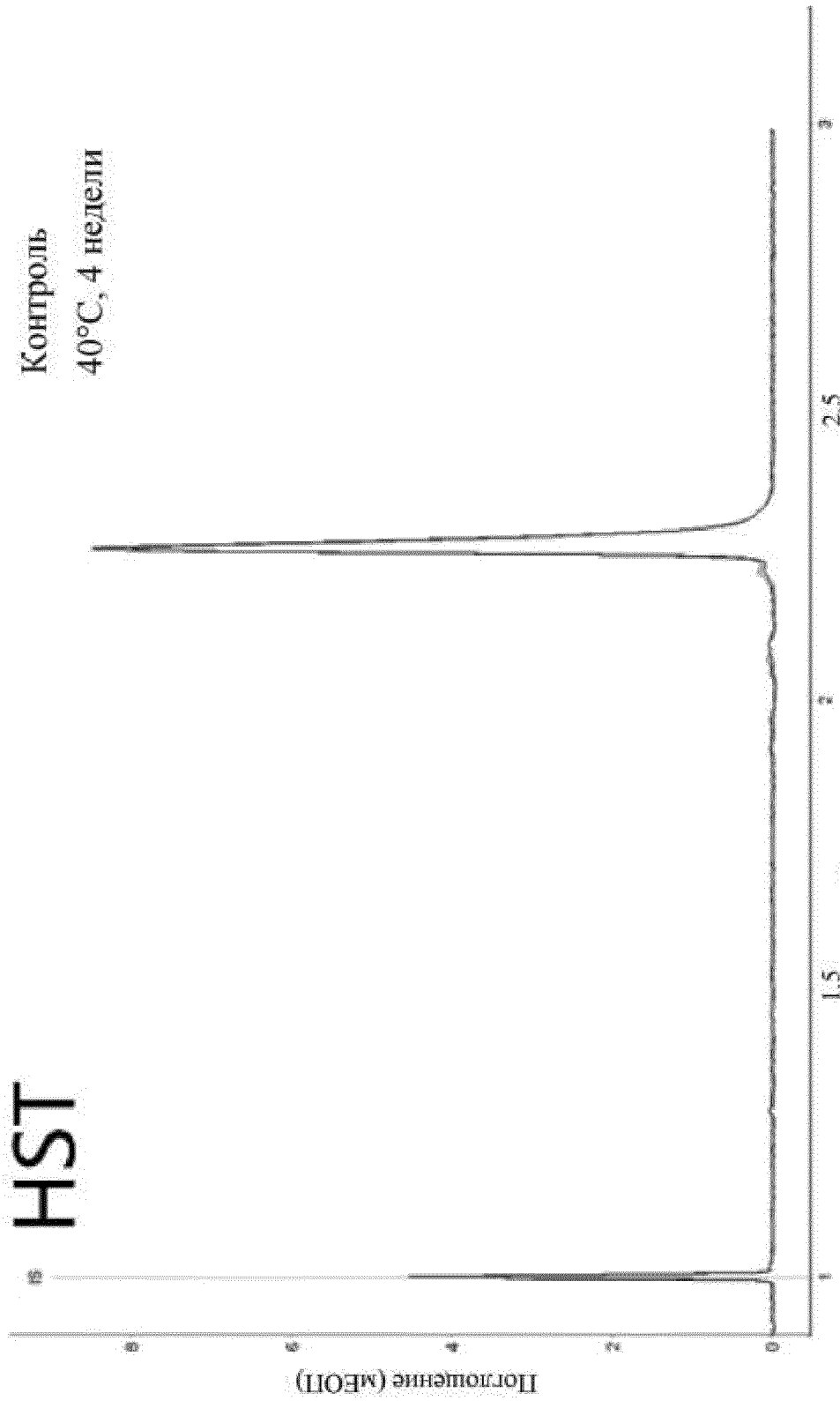

150
112,5
75
37,5
0
Z-показатель
3
6
10
14
18
22
Партнер по связыванию


Контроль
17,132*
23,479
25,980*
Ответ [mEOU]
Время удерживания [мин]

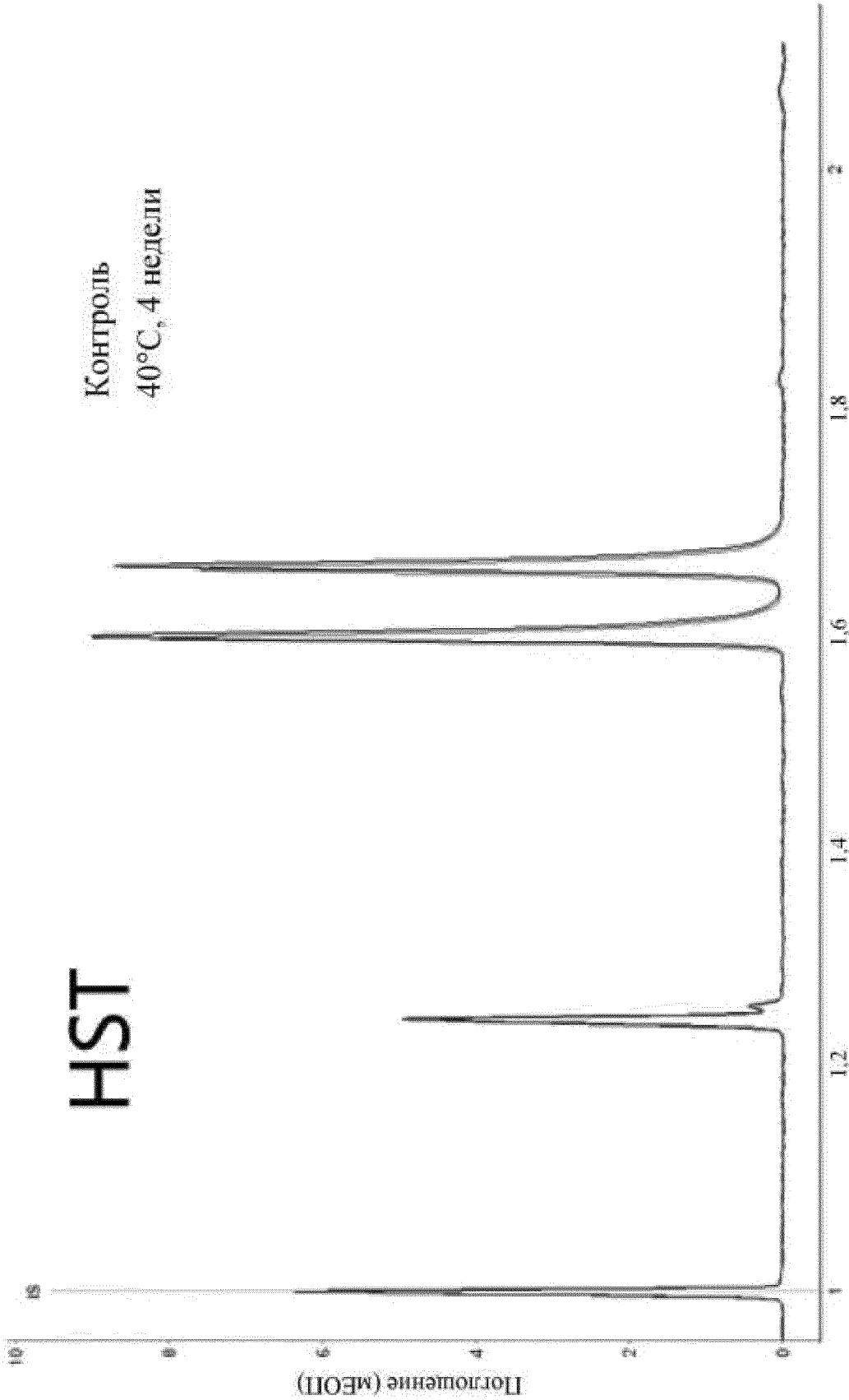
ФИГ. 251



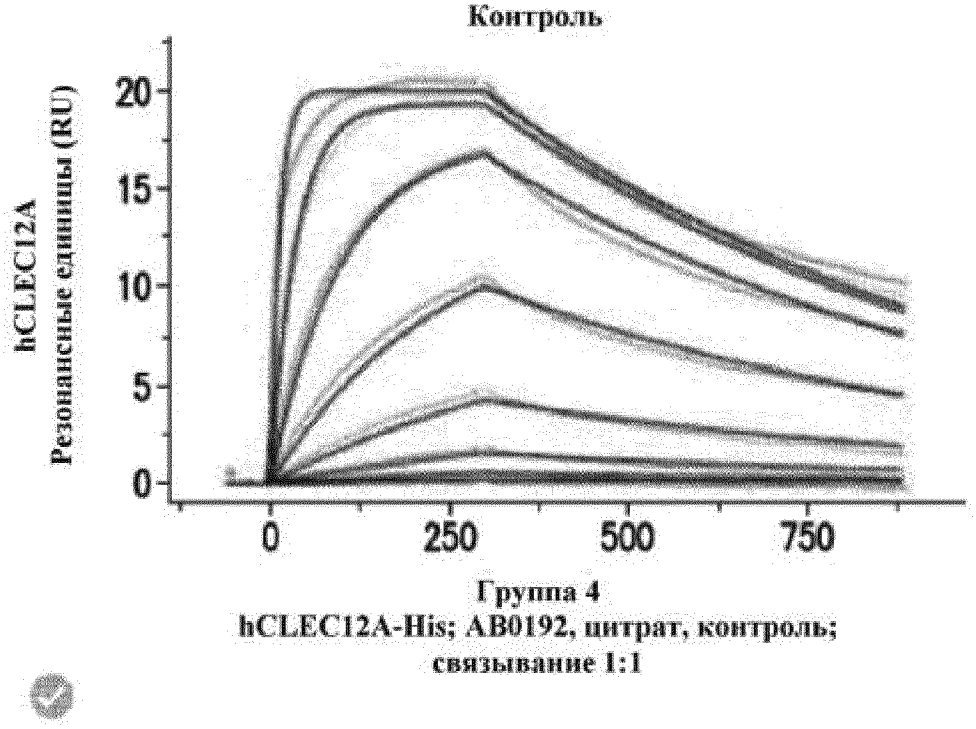

**ФИГ. 251 продолжение**


HST
Контроль
40°C, 4 недели
Поглощение (mEOП)
Относительное время миграции
1,5
2
2,5

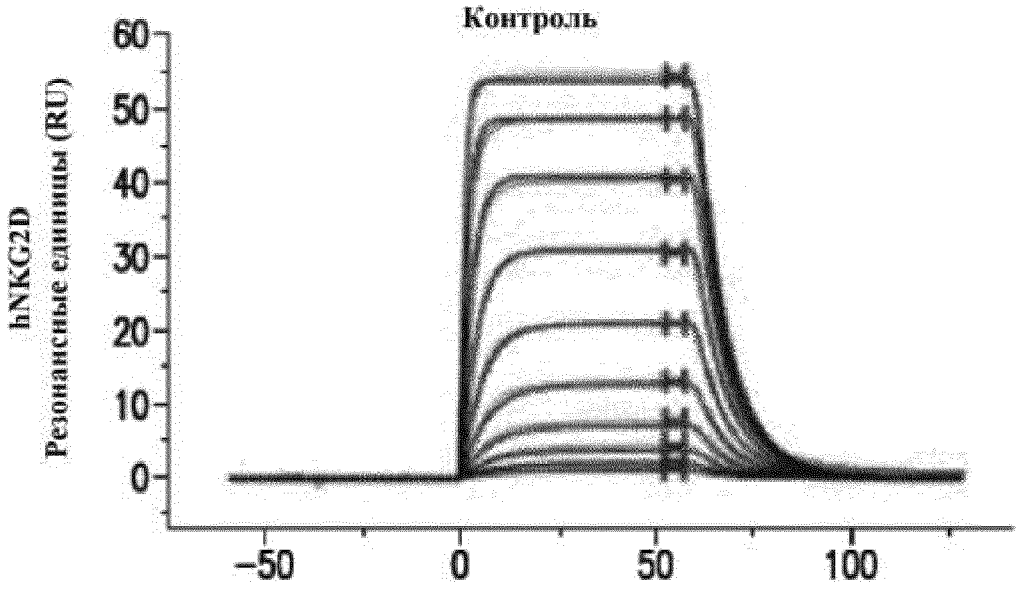
ФИГ. 252



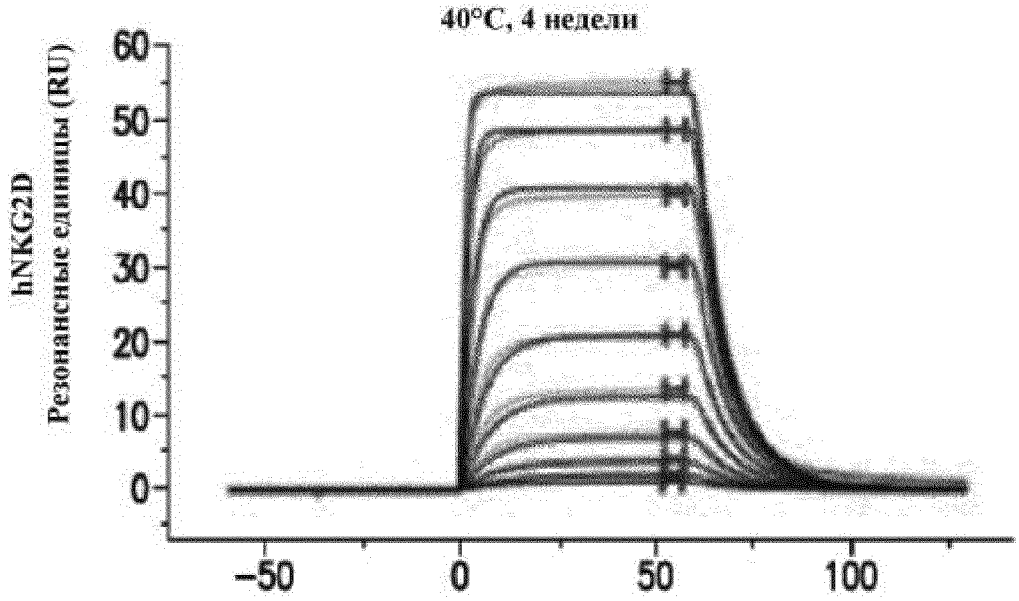

**ФИГ. 252 продолжение**


Контроль
hCLEC12A
Резонансные единицы (RU)
20
15
10
5
0
0
250
500
750
Группа 4
hCLEC12A-His; AB0192, цитрат, контроль;
связывание 1:1
40°C, 4 недели
hCLEC12A
Резонансные единицы (RU)
20
15
10
5
0
0
250
500
750
Группа 11
hCLEC12A-His; AB0192, HST, 40C, 4 недели; связывание 1:1

ФИГ. 253

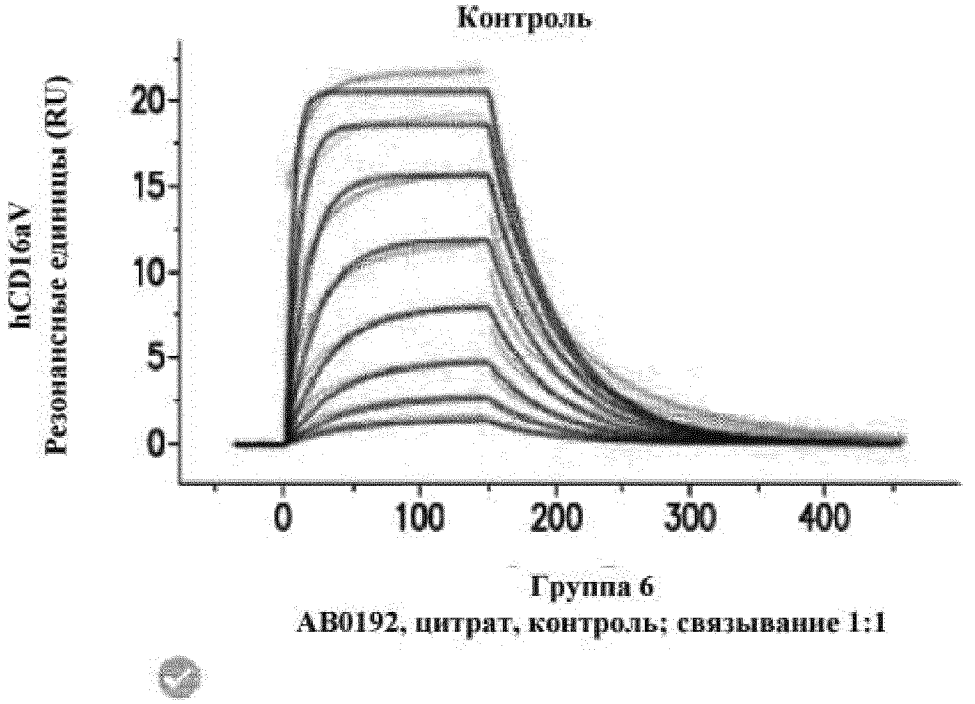



Группа 6
AB0192, цитрат, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

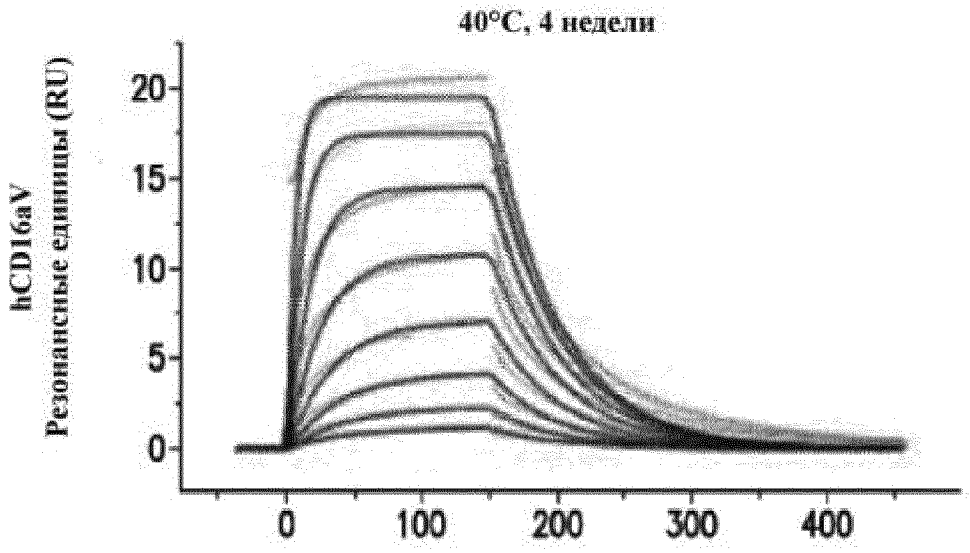



Группа 14
AB0192, HST, 40C, 4 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 253 продолжение



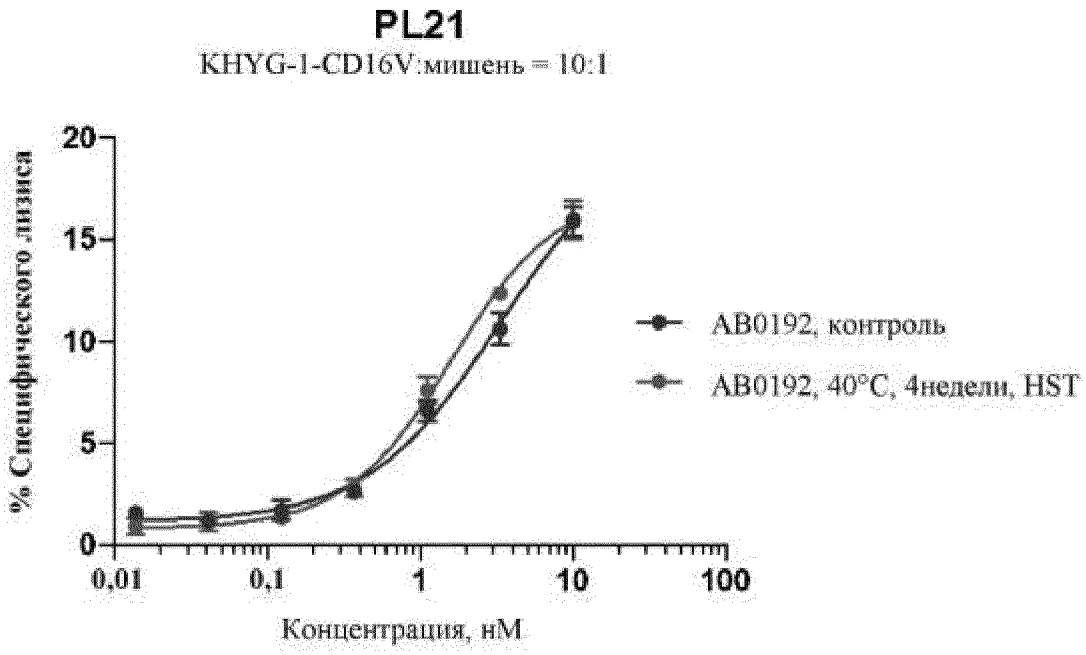

Группа 6
AB0192, цитрат, контроль; связывание 1:1

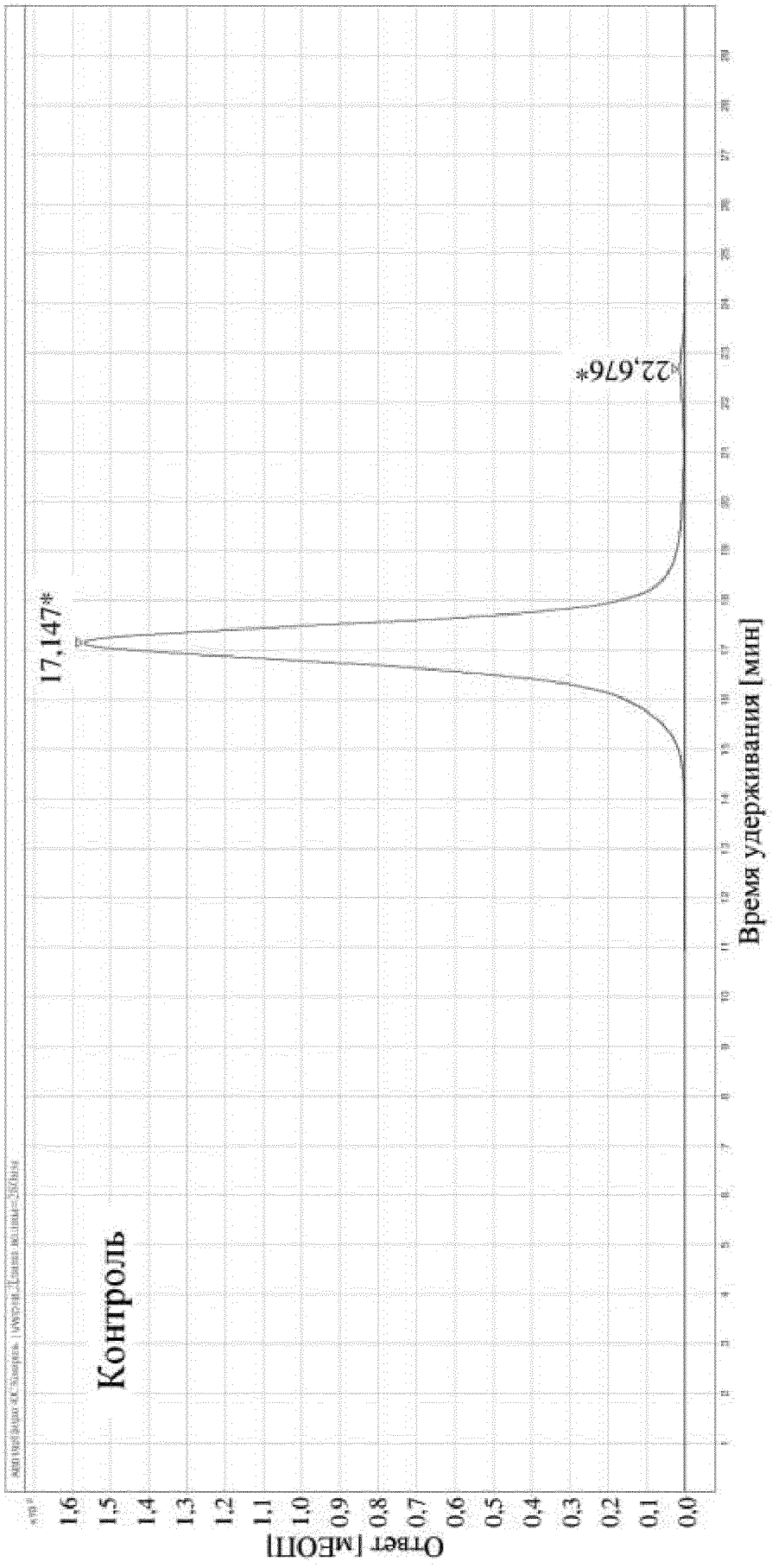



Группа 14
AB0192, HST, 40C, 4 недели; связывание 1:1

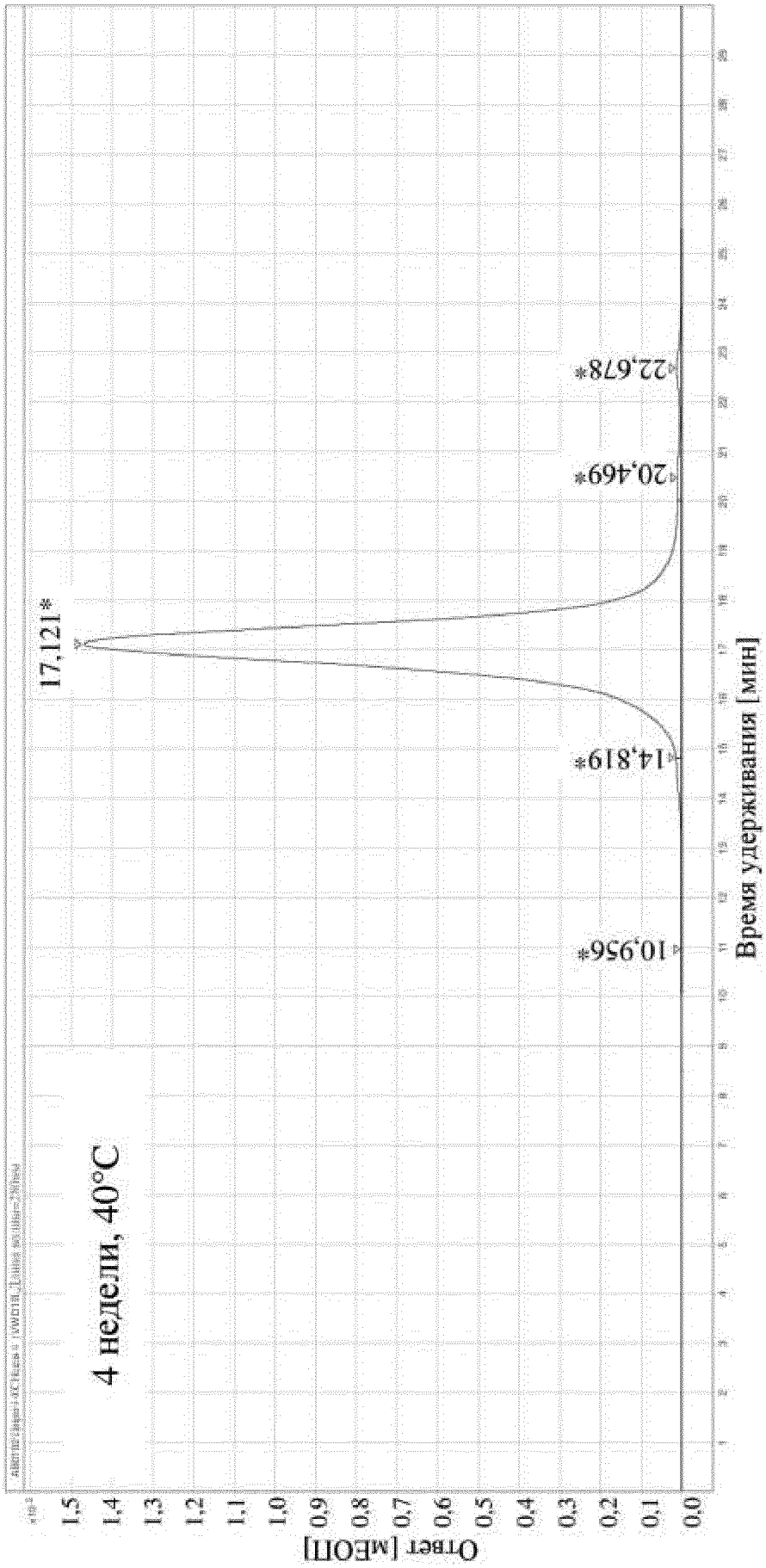
ФИГ. 253 продолжение

**ФИГ. 254**

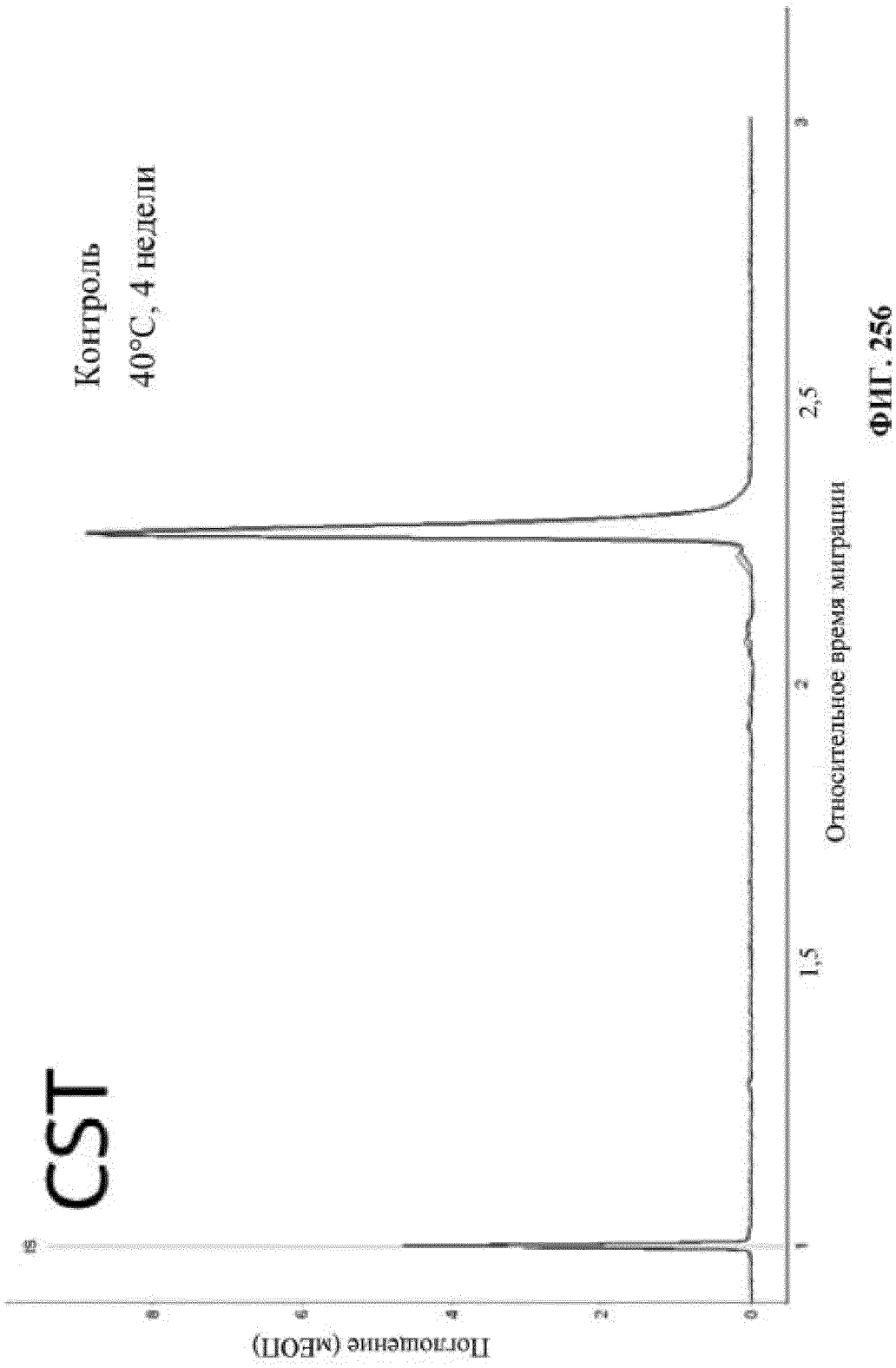

PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
20
15
10
5
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0192, контроль
AB0192, 40°C, 4недели, HST



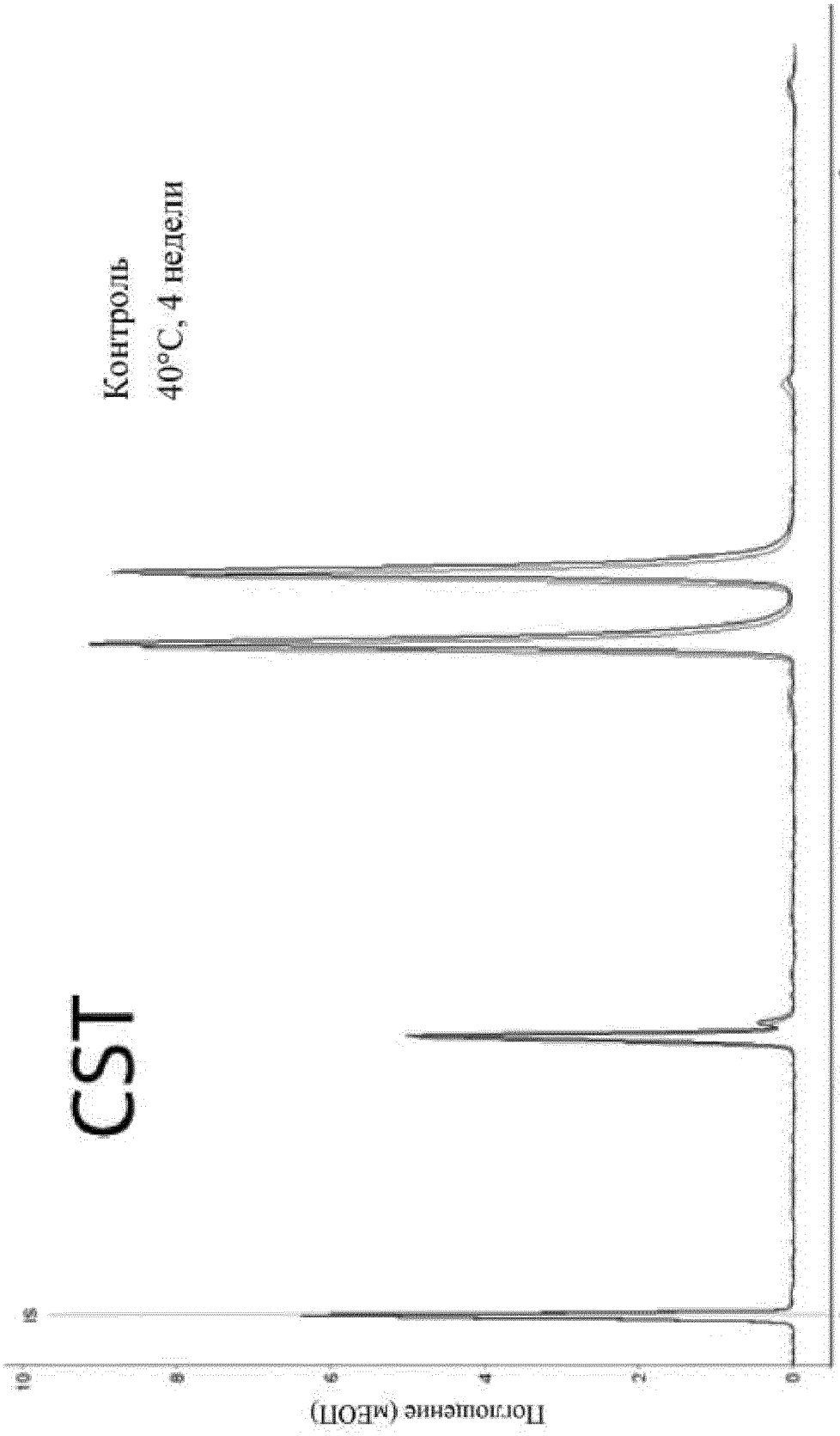

ФИГ. 255



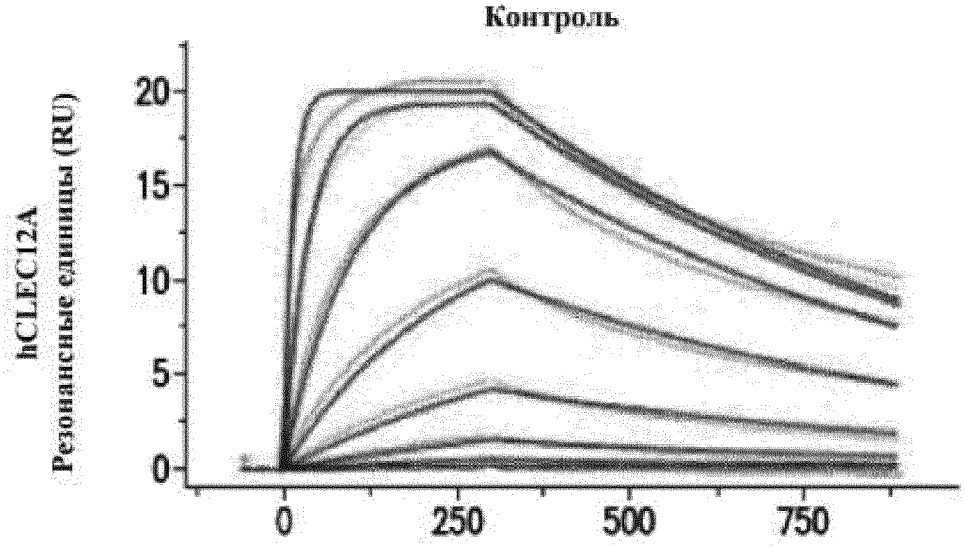

**ФИГ. 255 продолжение**


CST
Контроль
40°C, 4 недели
Поглощение (mБОЛ)
Относительное время миграции
1,5
2
2,5

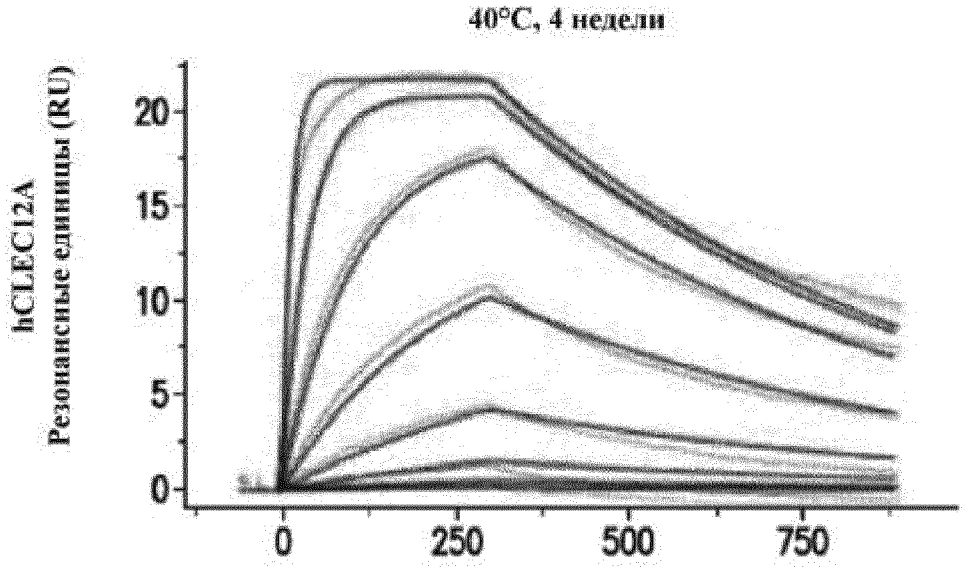
ФИГ. 256




**ФИГ. 256 продолжение**

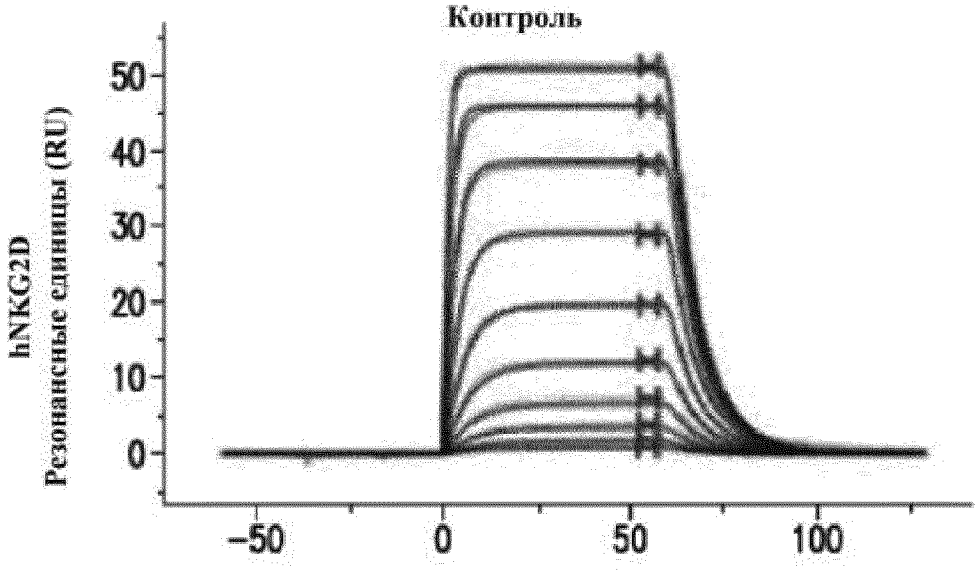



Группа 4
hCLEC12A-His; AB0192, цитрат, контроль; связывание 1:1

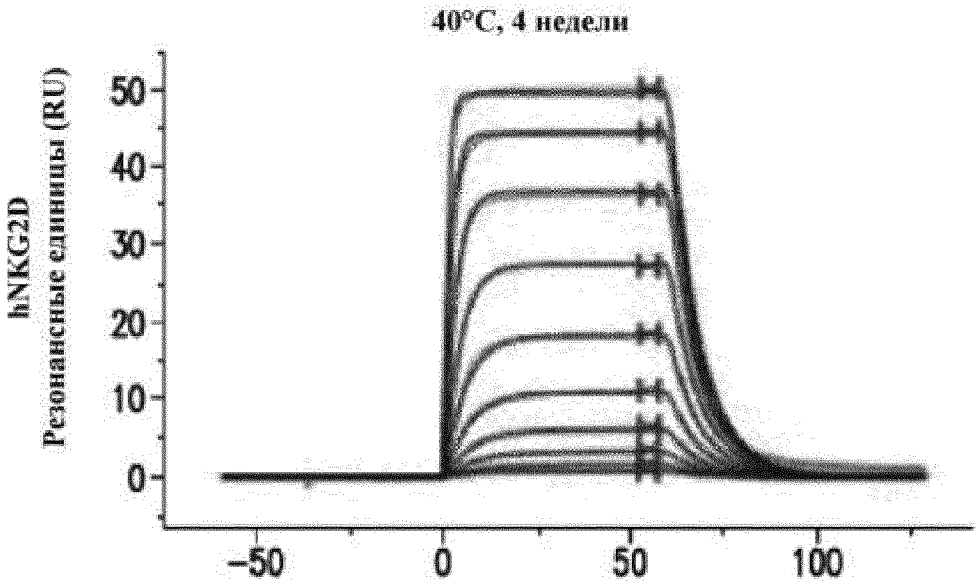



Группа 1
hCLEC12A-His; AB0192, цитрат, 40C, 4 нед; связывание 1:1

ФИГ. 257

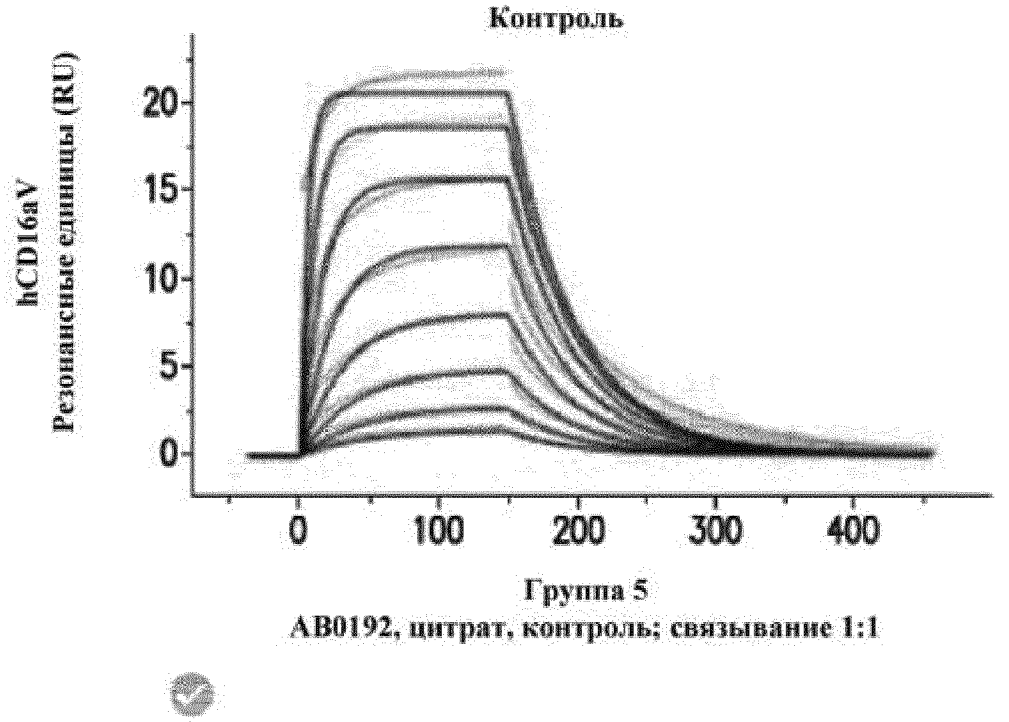



Группа 4
AB0192, цитрат, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

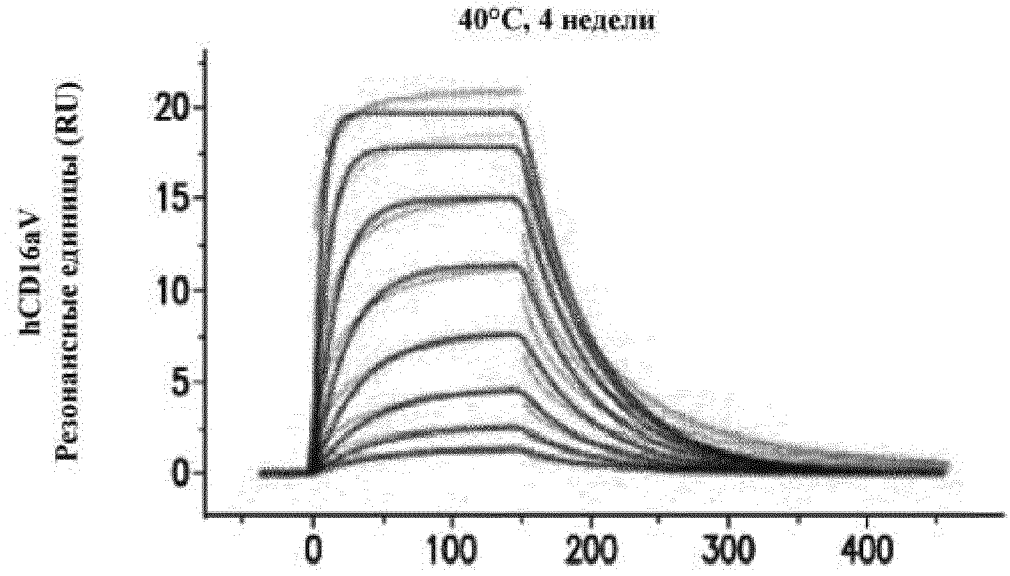



Группа 3
AB0192, цитрат, 40C, 4 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 257 продолжение



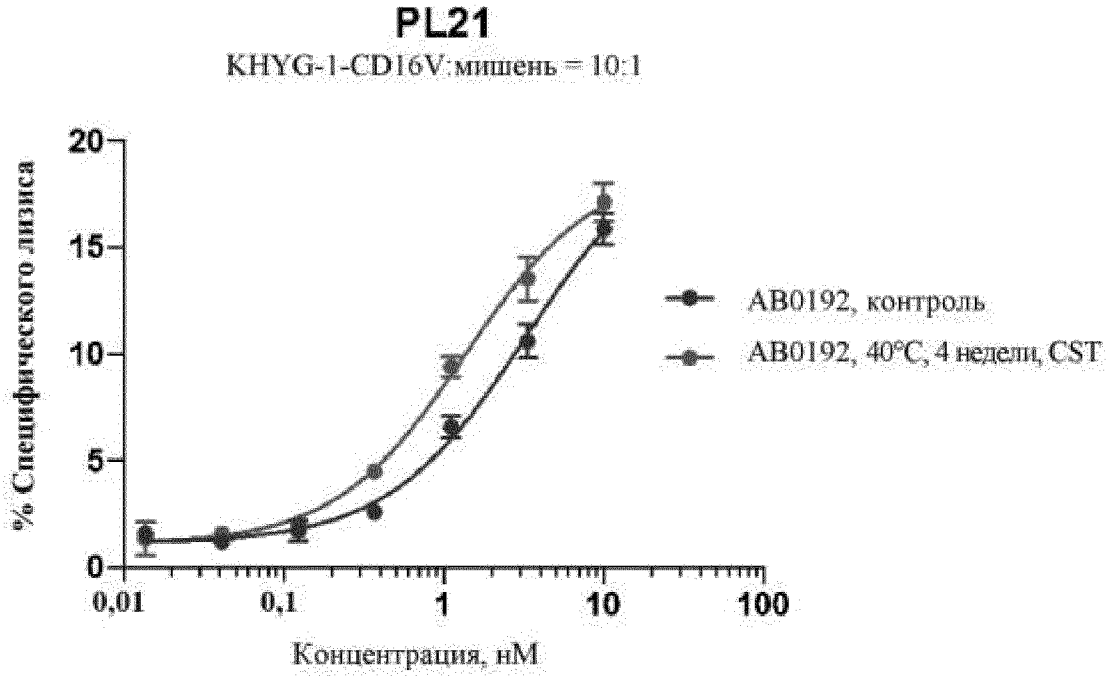

Группа 5
AB0192, цитрат, контроль; связывание 1:1

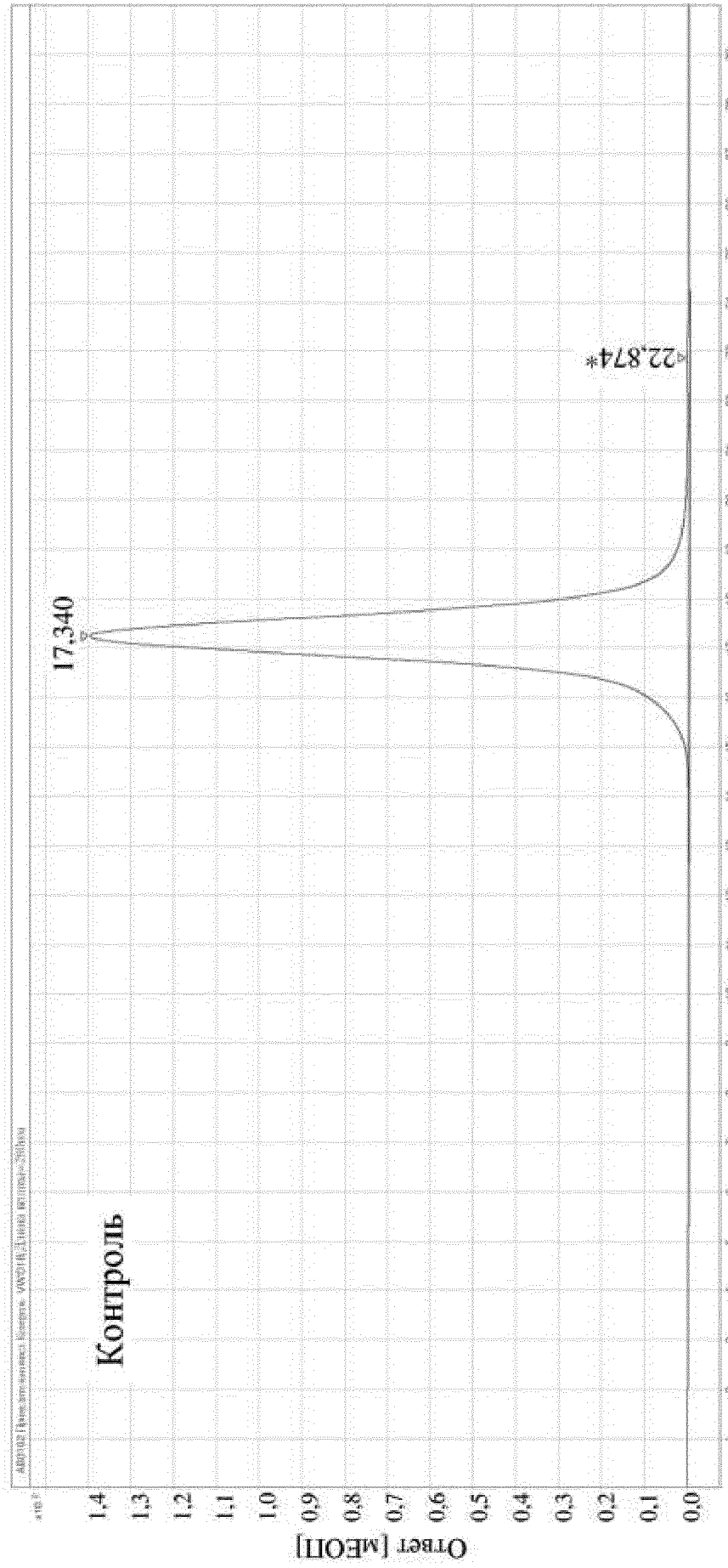



Группа 3
AB0192, цитрат, 40C, 4 недели; связывание 1:1

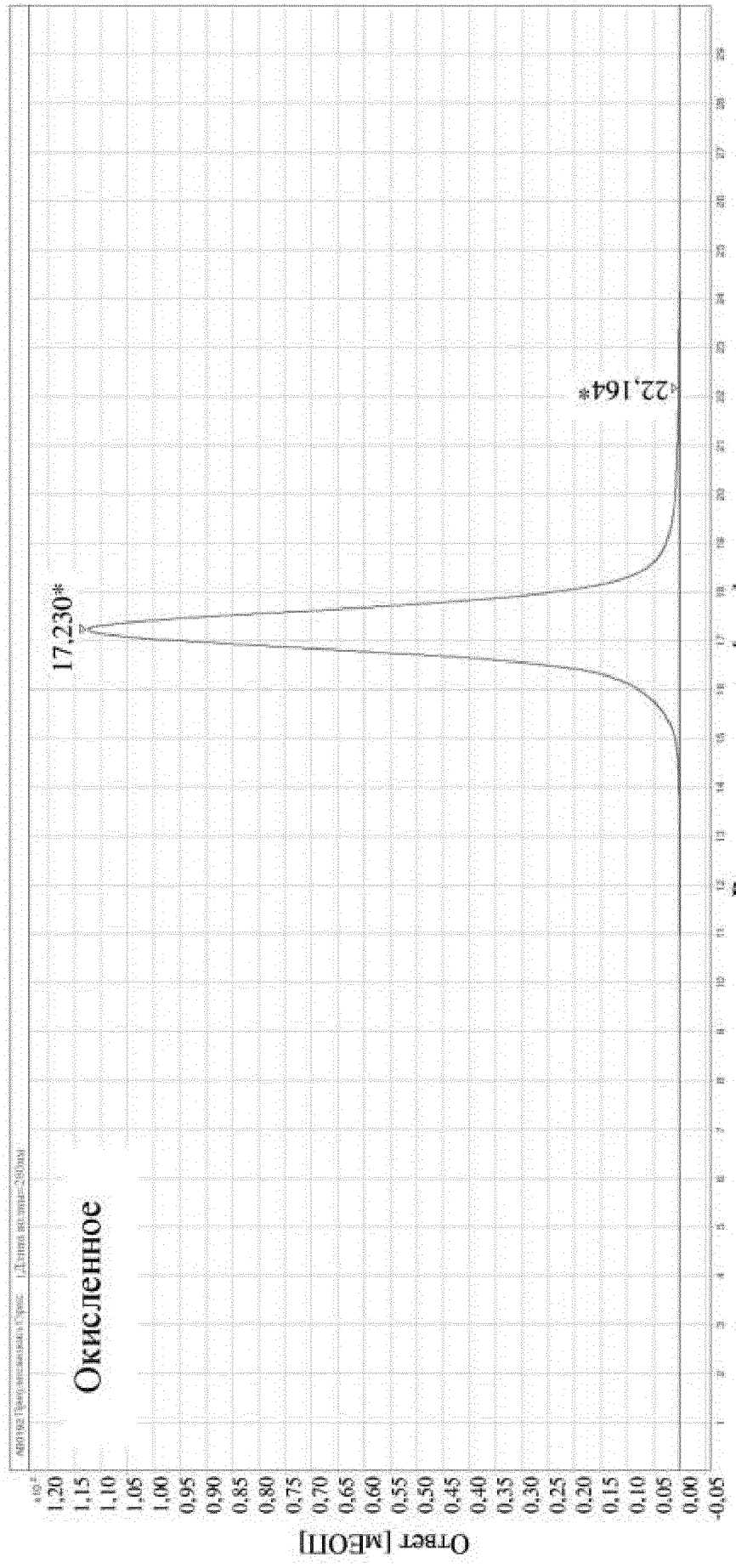
ФИГ. 257 продолжение

ФИГ. 258

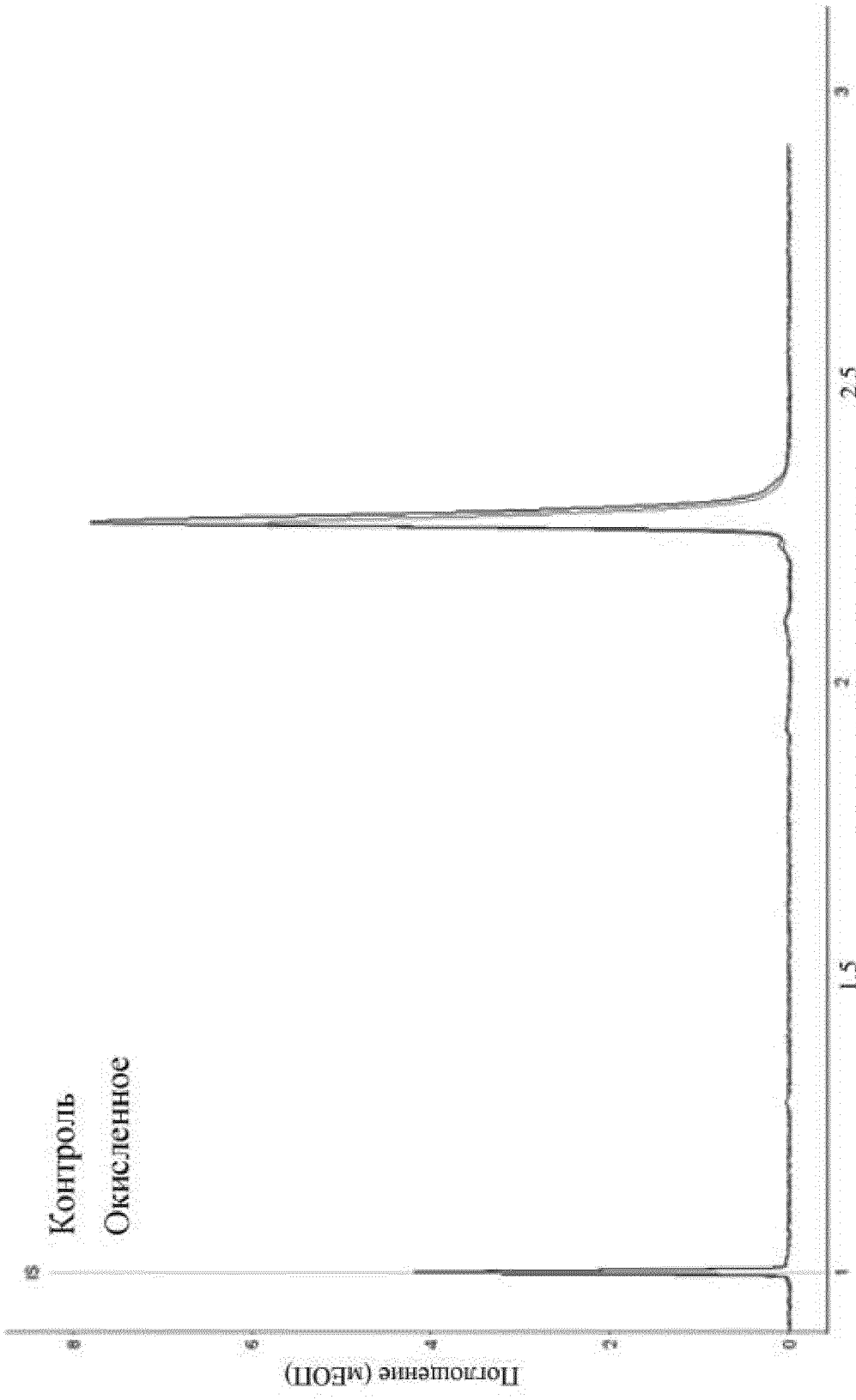

PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
20
15
10
5
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0192, контроль
AB0192, 40°C, 4 недели, CST



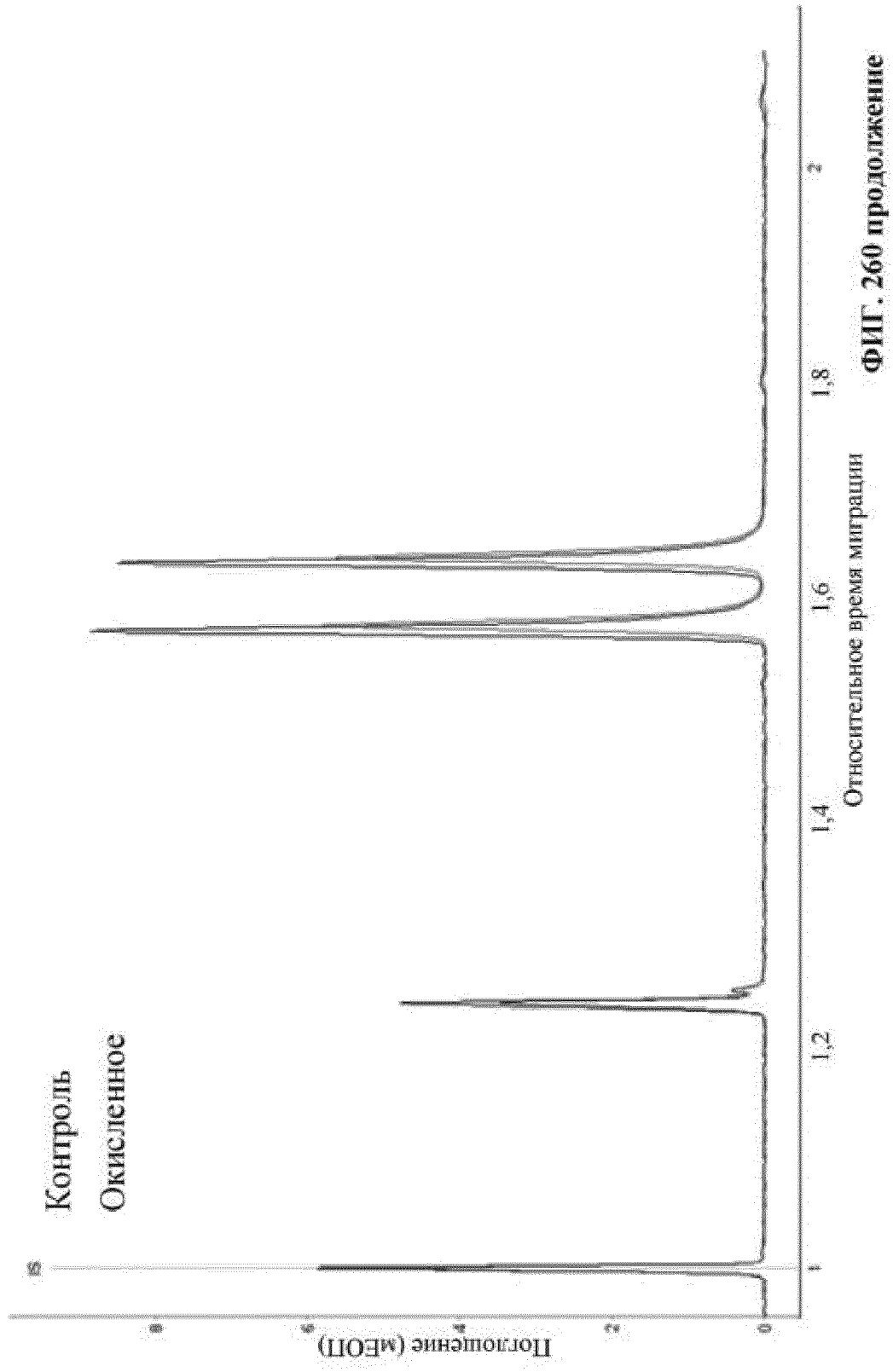

ФИГ. 259



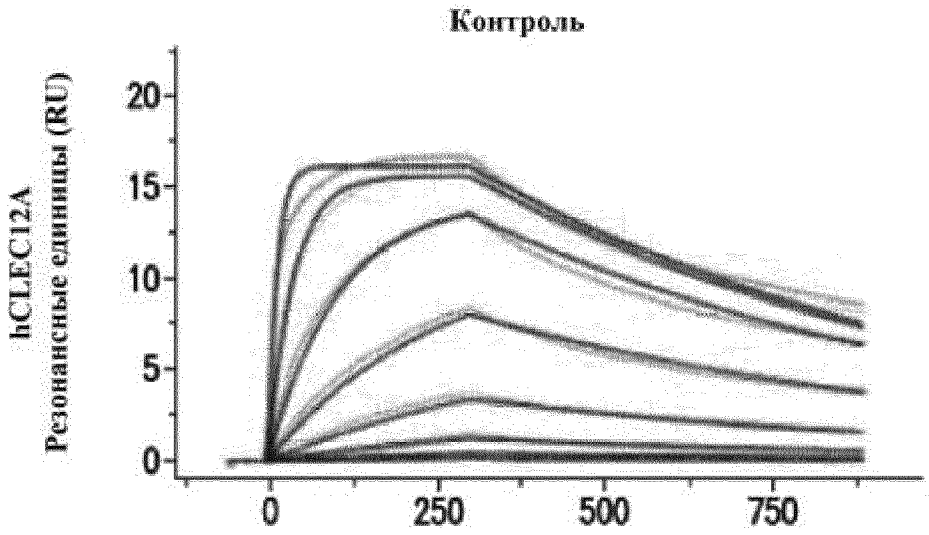

**ФИГ. 259 продолжение**


Поглощение (mEOD)
0
1
1,5
2
2,5
3
Относительное время миграции
Контроль
Окисленное

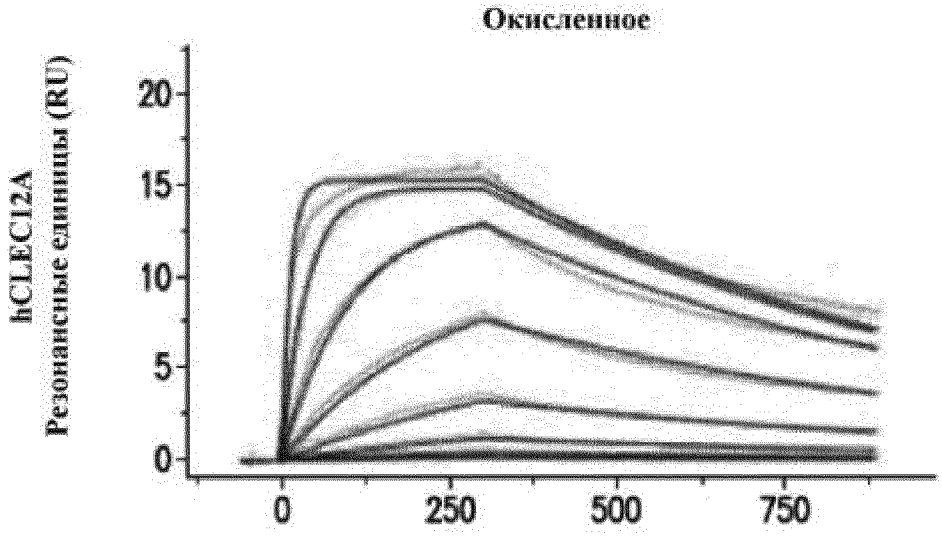
ФИГ. 260




ФИГ. 260 продолжение

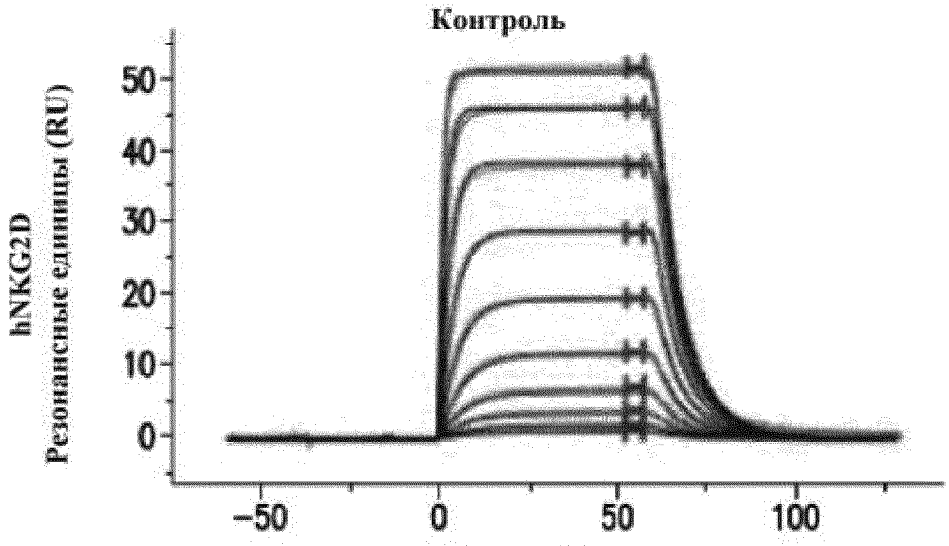



Группа 13
hCLEC12A-His; AB0192, окисление, контроль;
связывание 1:1

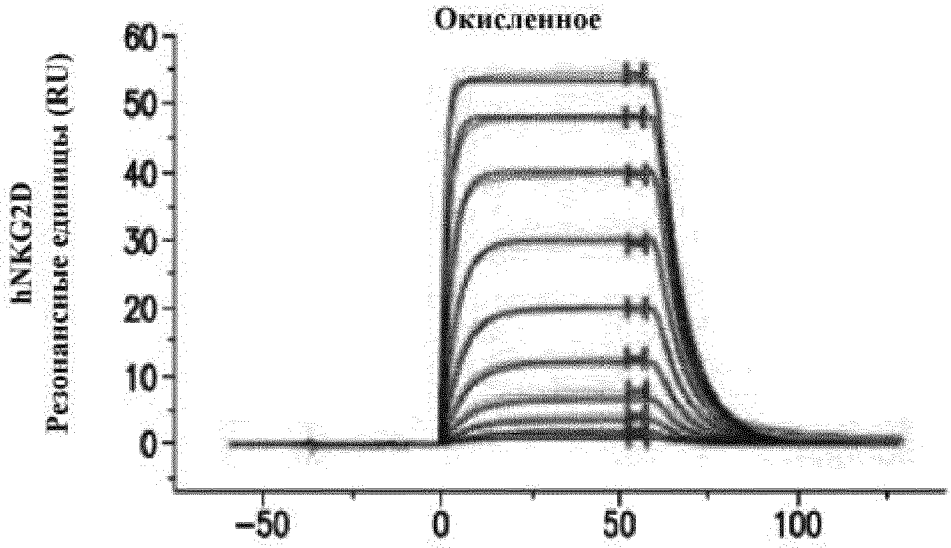



Группа 7
hCLEC12A-His; AB0192, принудительное окисление;
связывание 1:1

ФИГ. 261

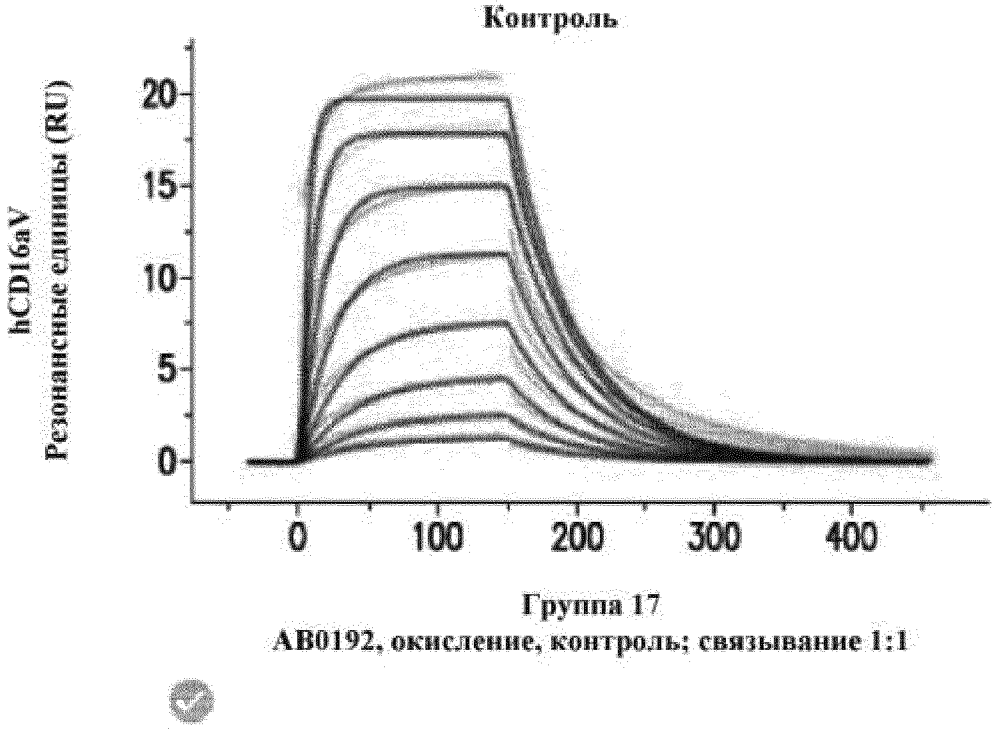



Группа 10
AB0192, принудительное окисление, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

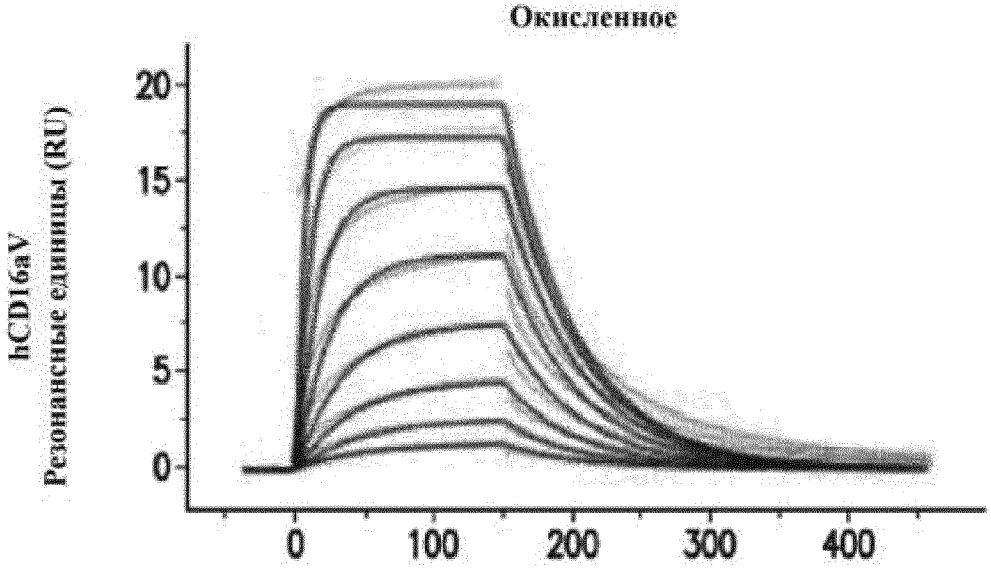



Группа 7
AB0192, принудительное окисление; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 261 продолжение



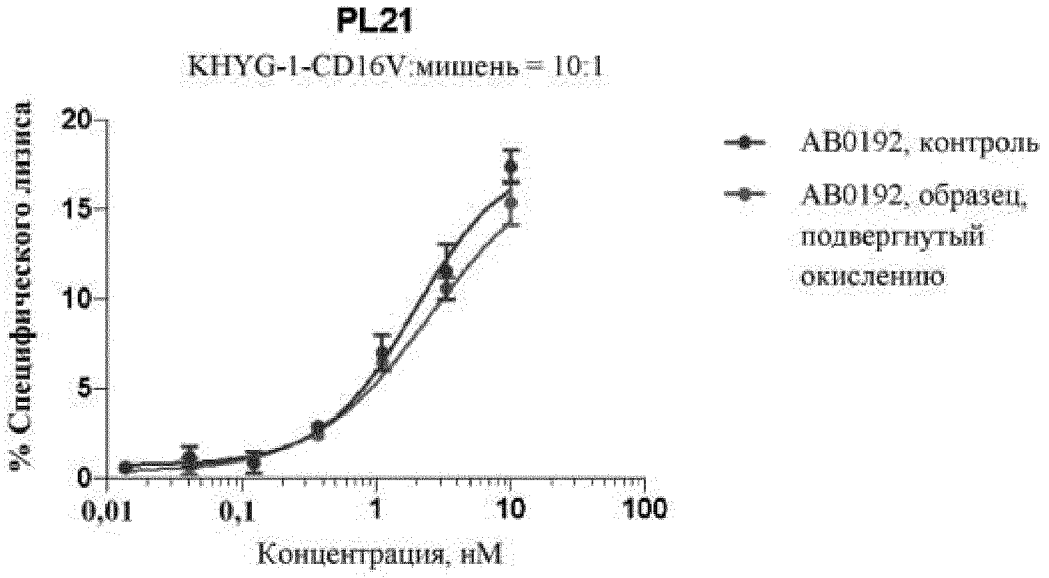

Группа 17
AB0192, окисление, контроль; связывание 1:1

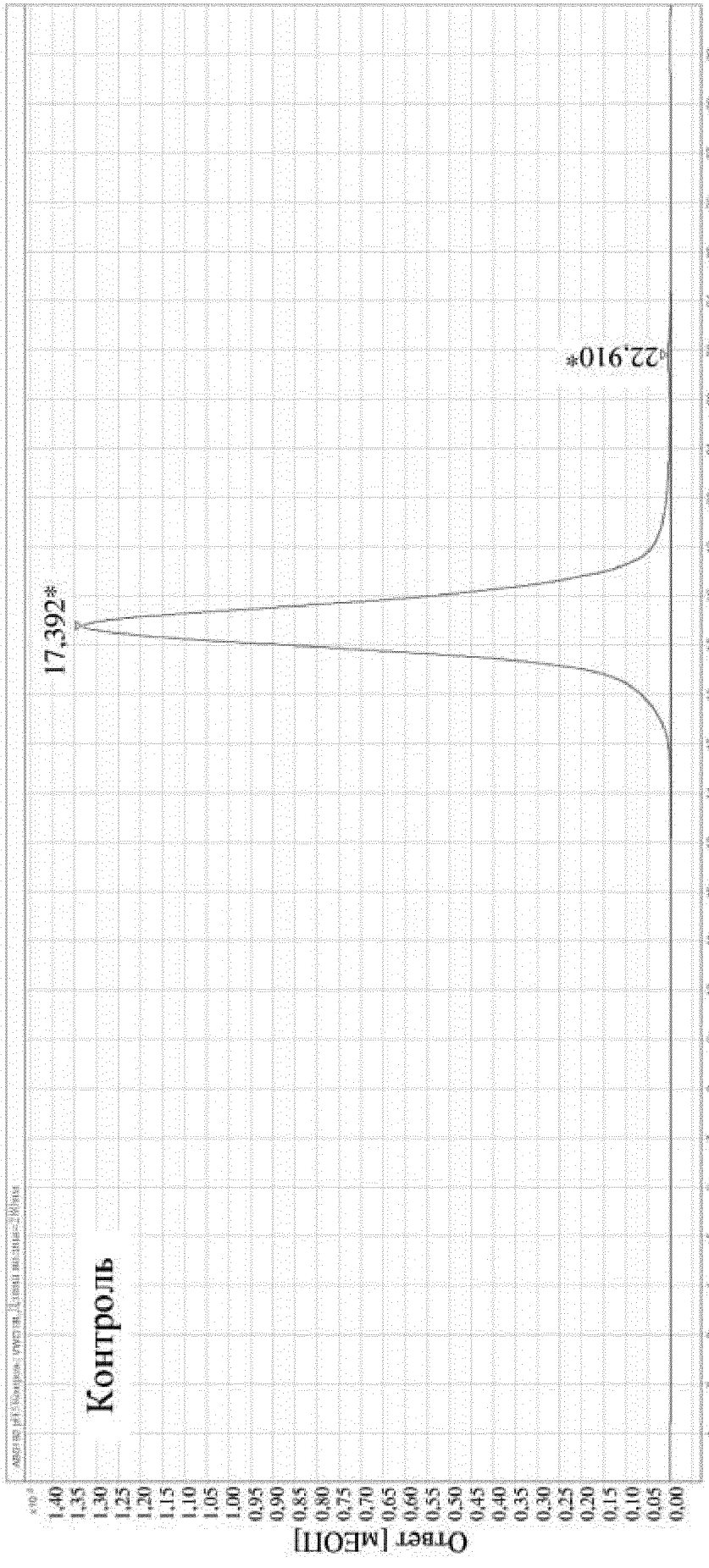



Группа 10
AB0192, принудительное окисление; связывание 1:1

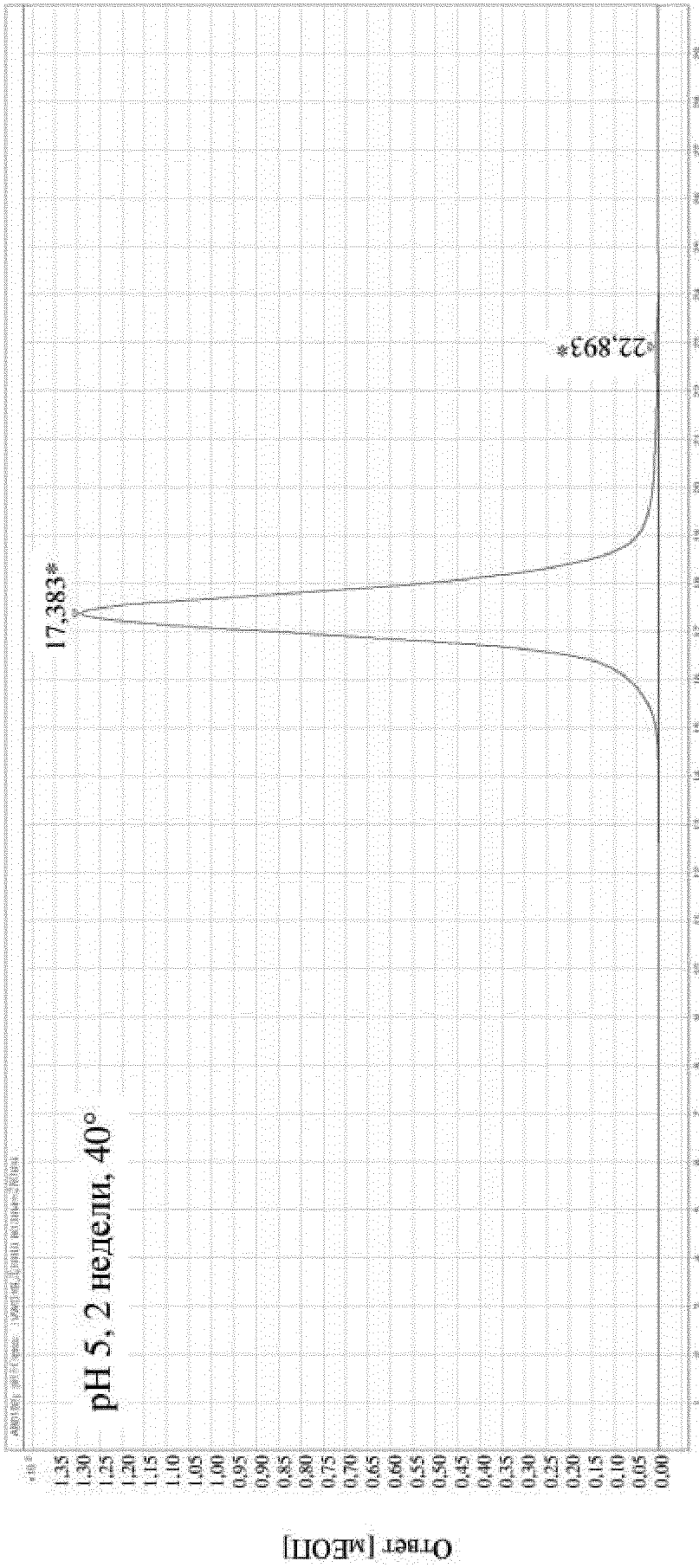
ФИГ. 261 продолжение

ФИГ. 262

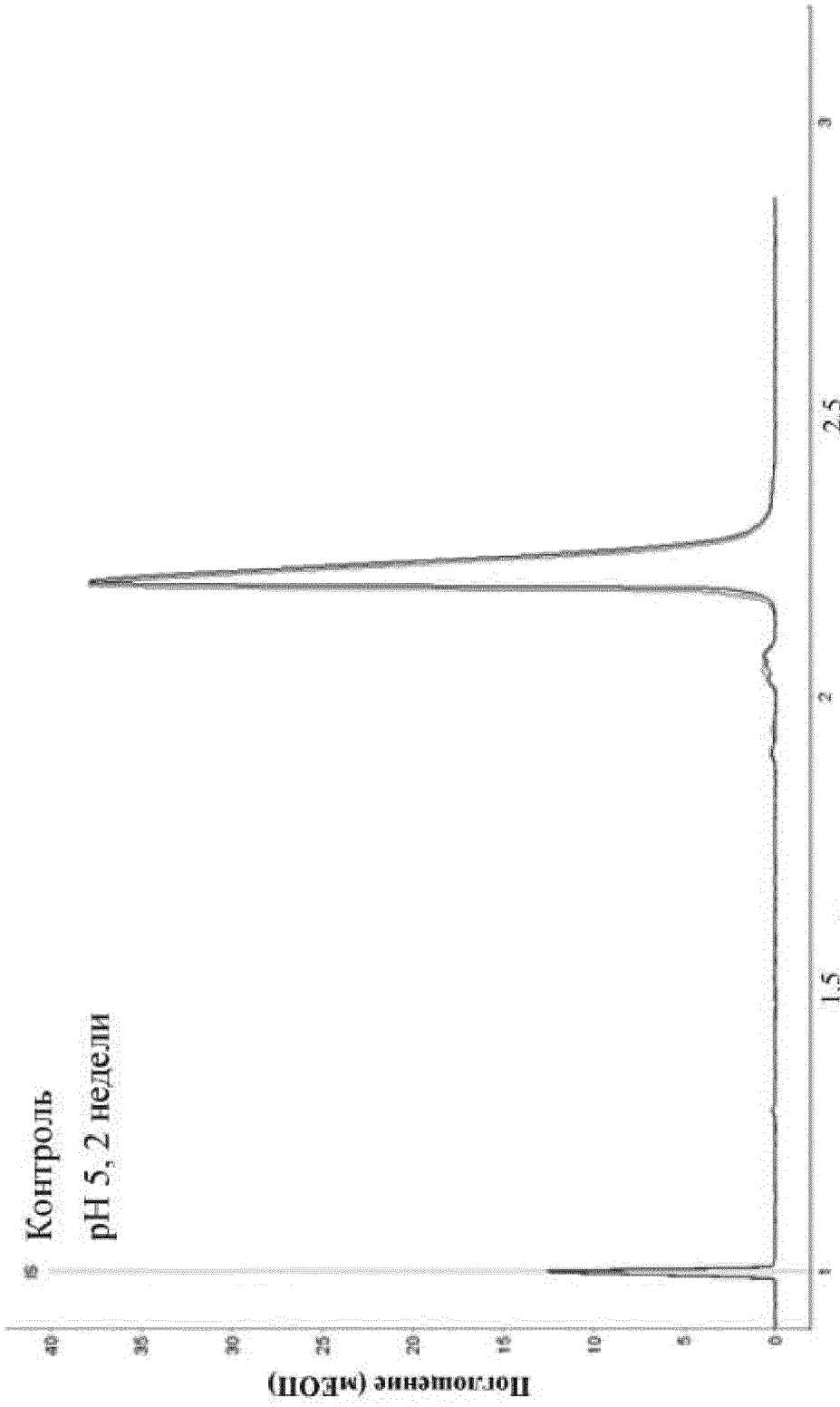

PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
20
15
10
5
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0192, контроль
AB0192, образец, подвергнутый окислению



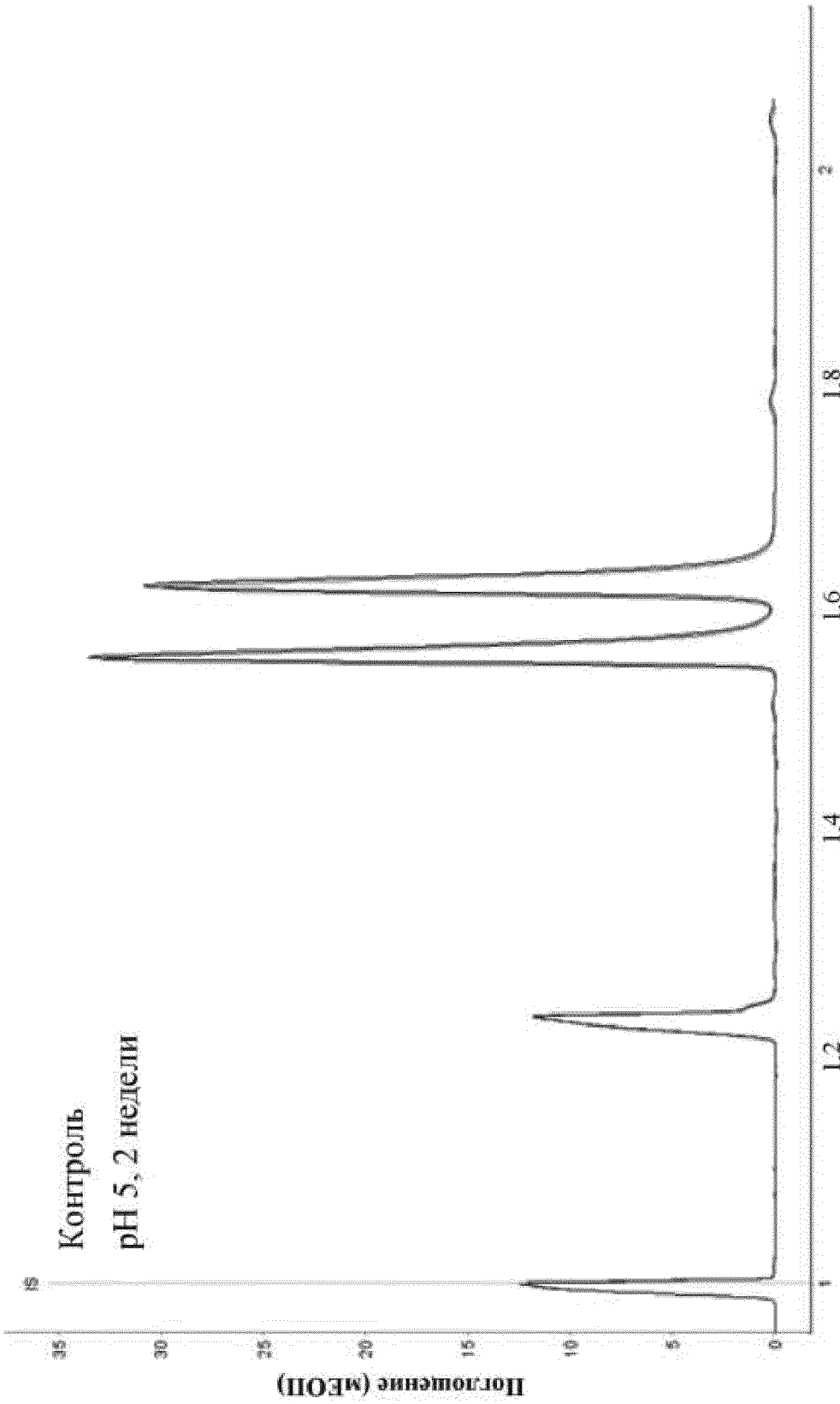

ФИГ. 263



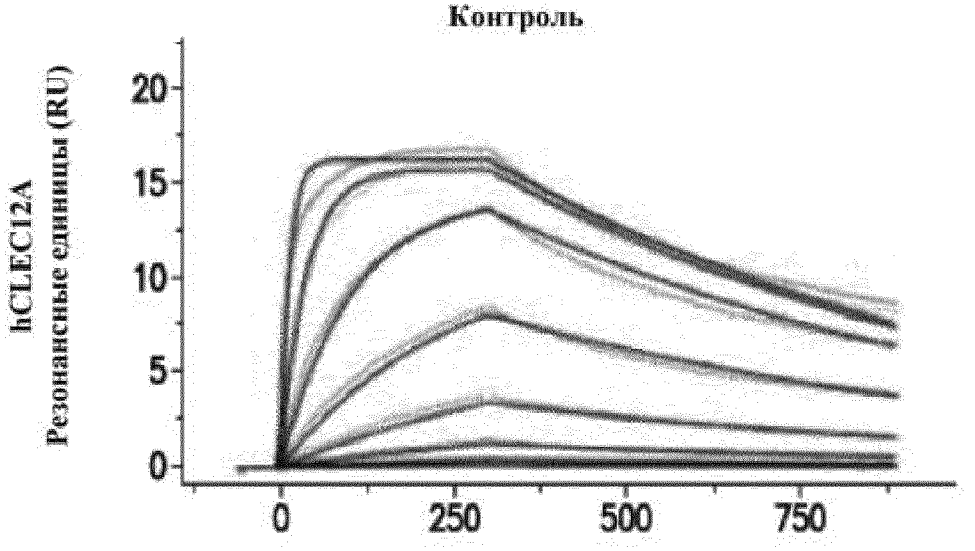

**ФИГ. 263 продолжение**


Контроль
pH 5, 2 недели
Поглощение (mEOП)
Относительное время миграции
1,5
2
2,5

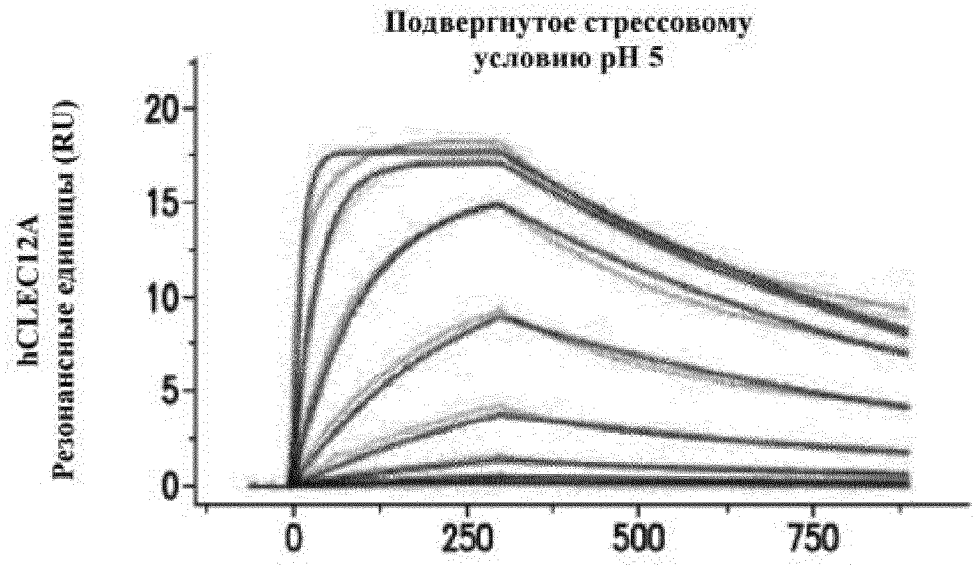
ФИГ. 264




ФИГ. 264 продолжение

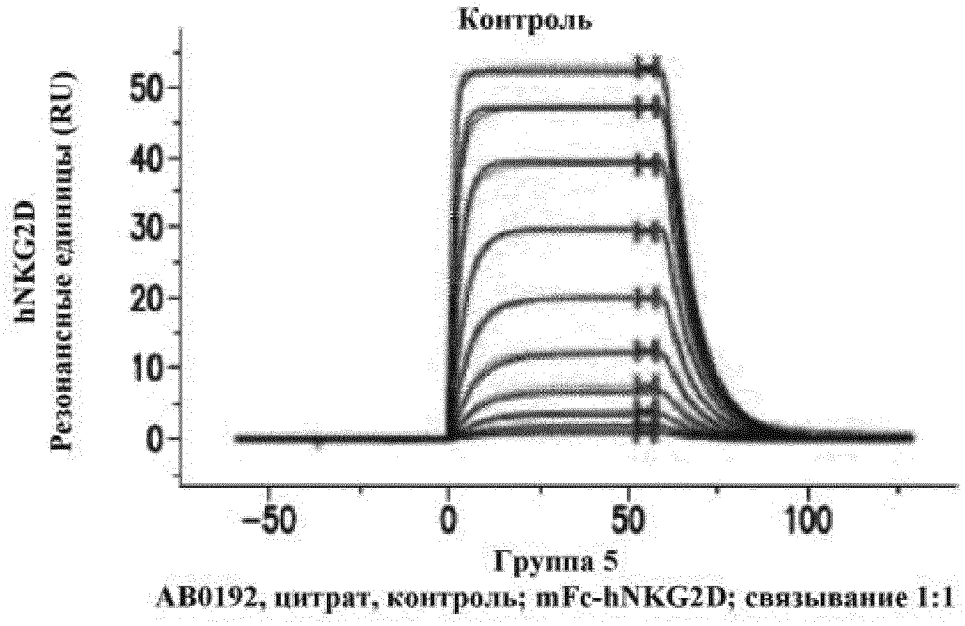



Группа 13
hCLEC12A-His; AB0192, окисление, контроль;
связывание 1:1

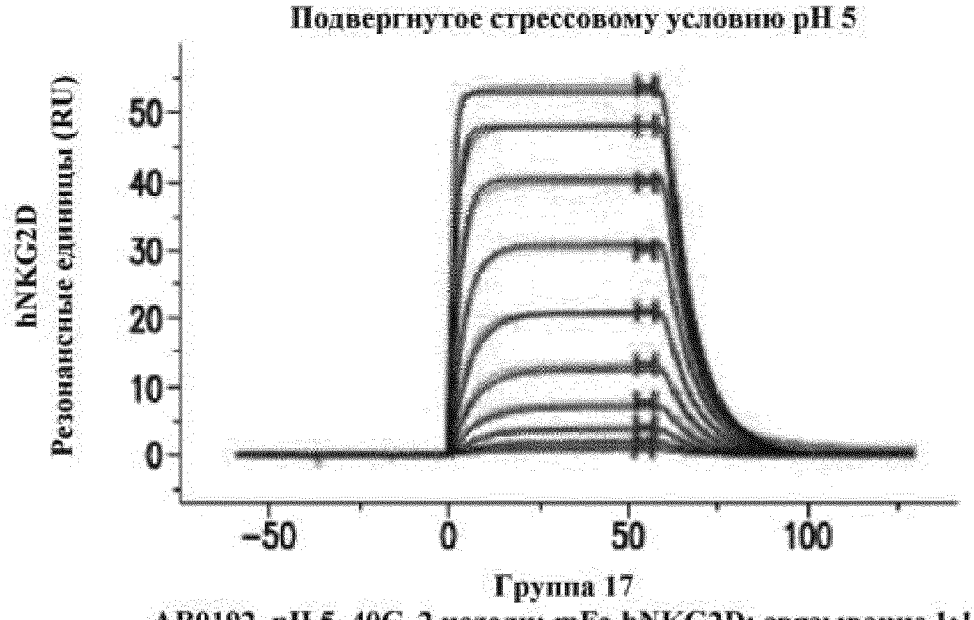



Группа 16
hCLEC12A-His; AB0192, pH 5, 40C, 2 недели;
связывание 1:1

ФИГ. 265

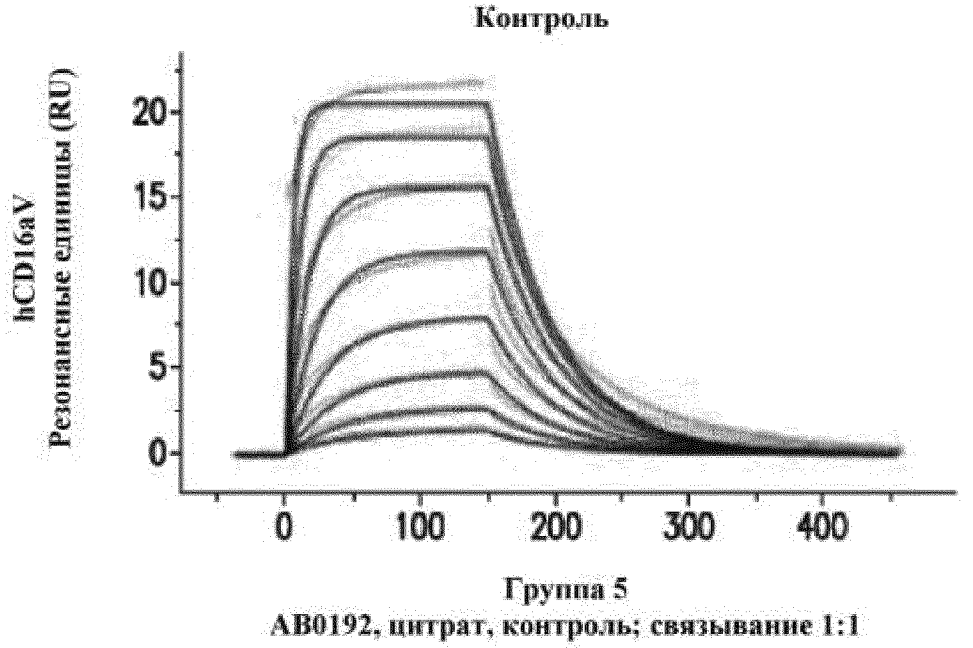



Группа 5
AB0192, цитрат, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

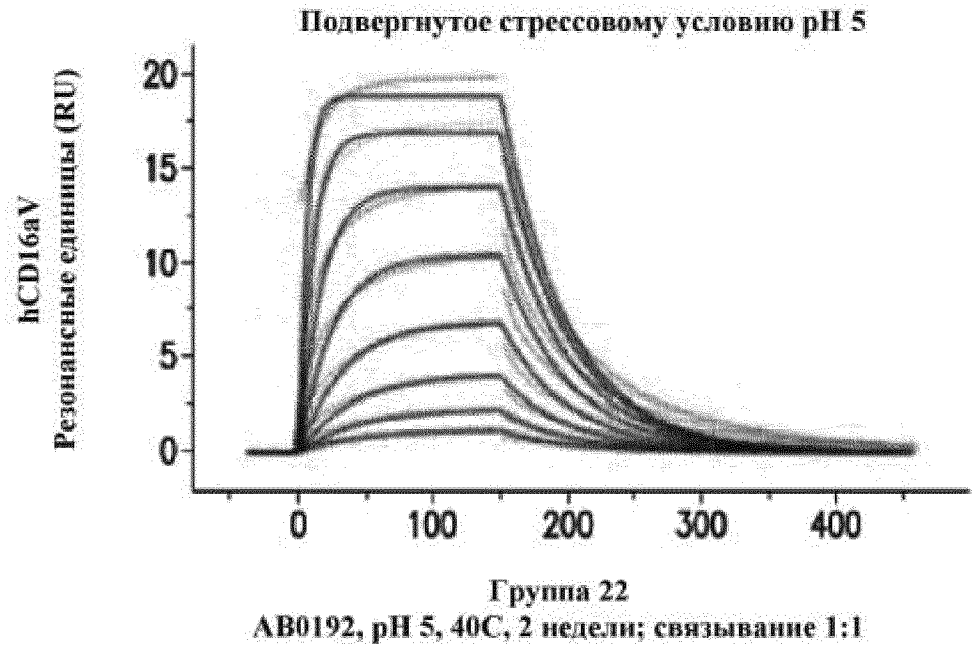



Группа 17
AB0192, pH 5, 40C, 2 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 265 продолжение

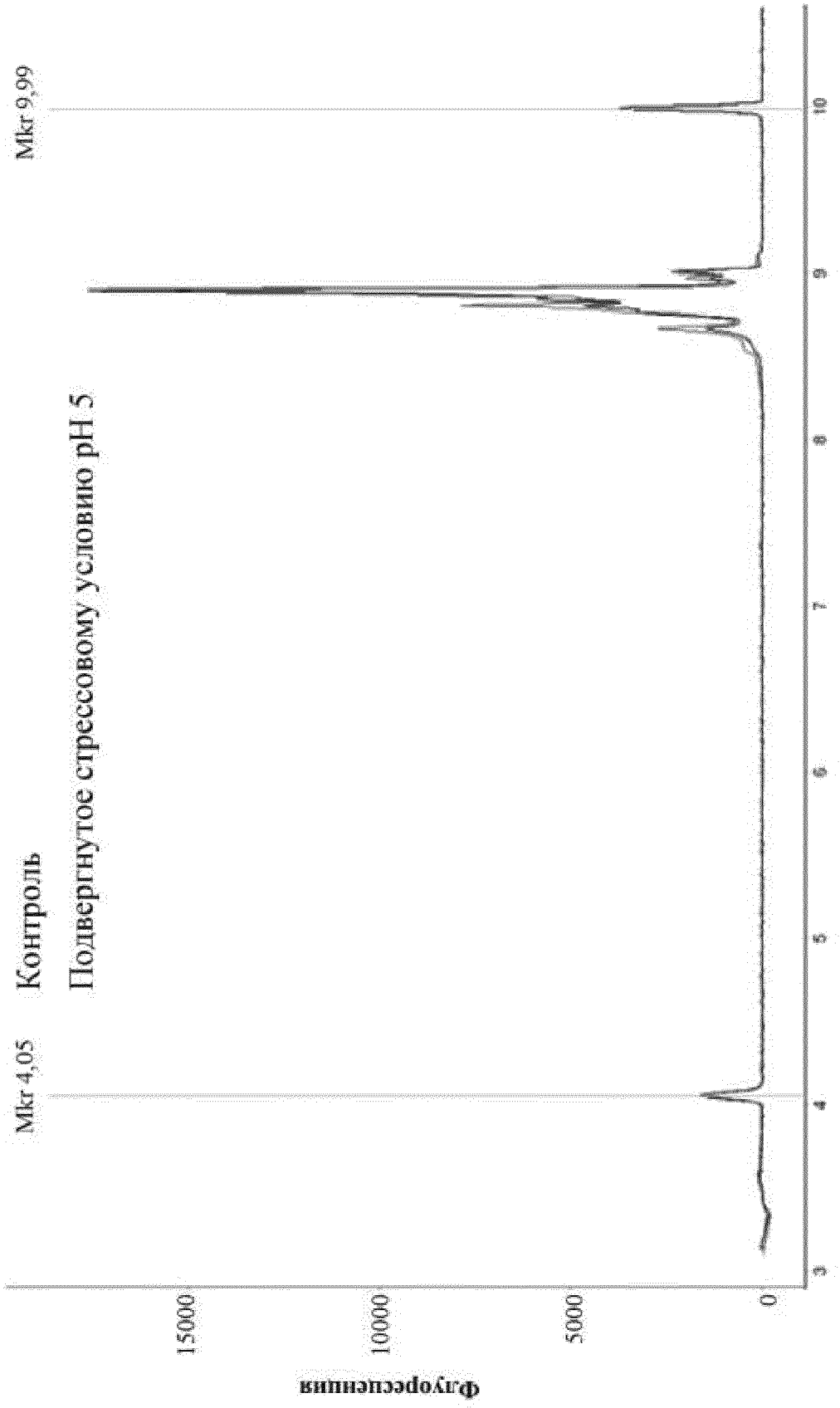



Группа 5
AB0192, цитрат, контроль; связывание 1:1



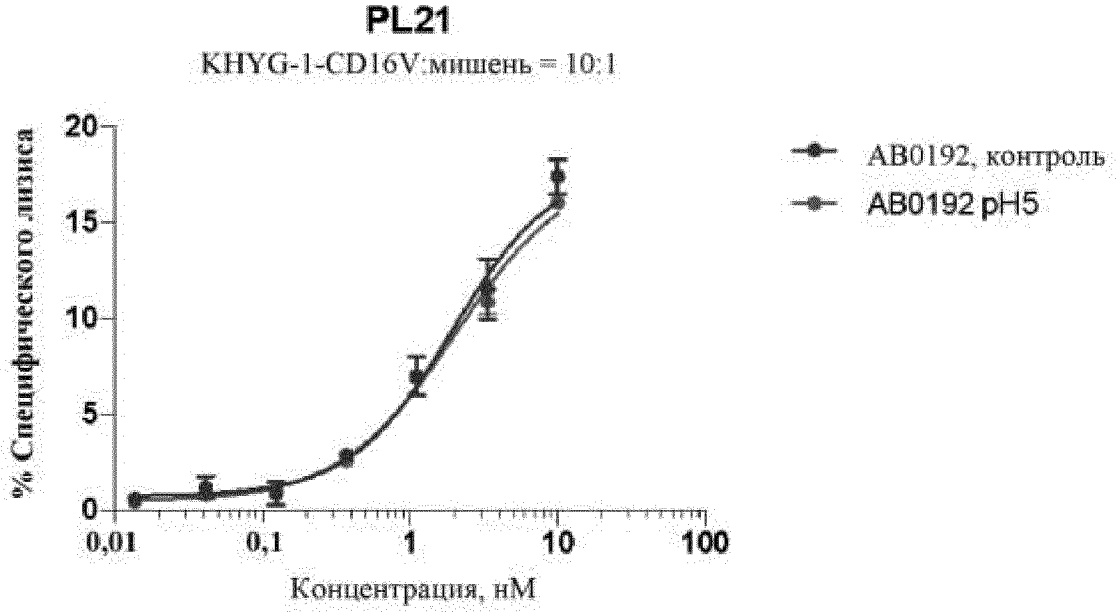

Группа 22
AB0192, pH 5, 40C, 2 недели; связывание 1:1

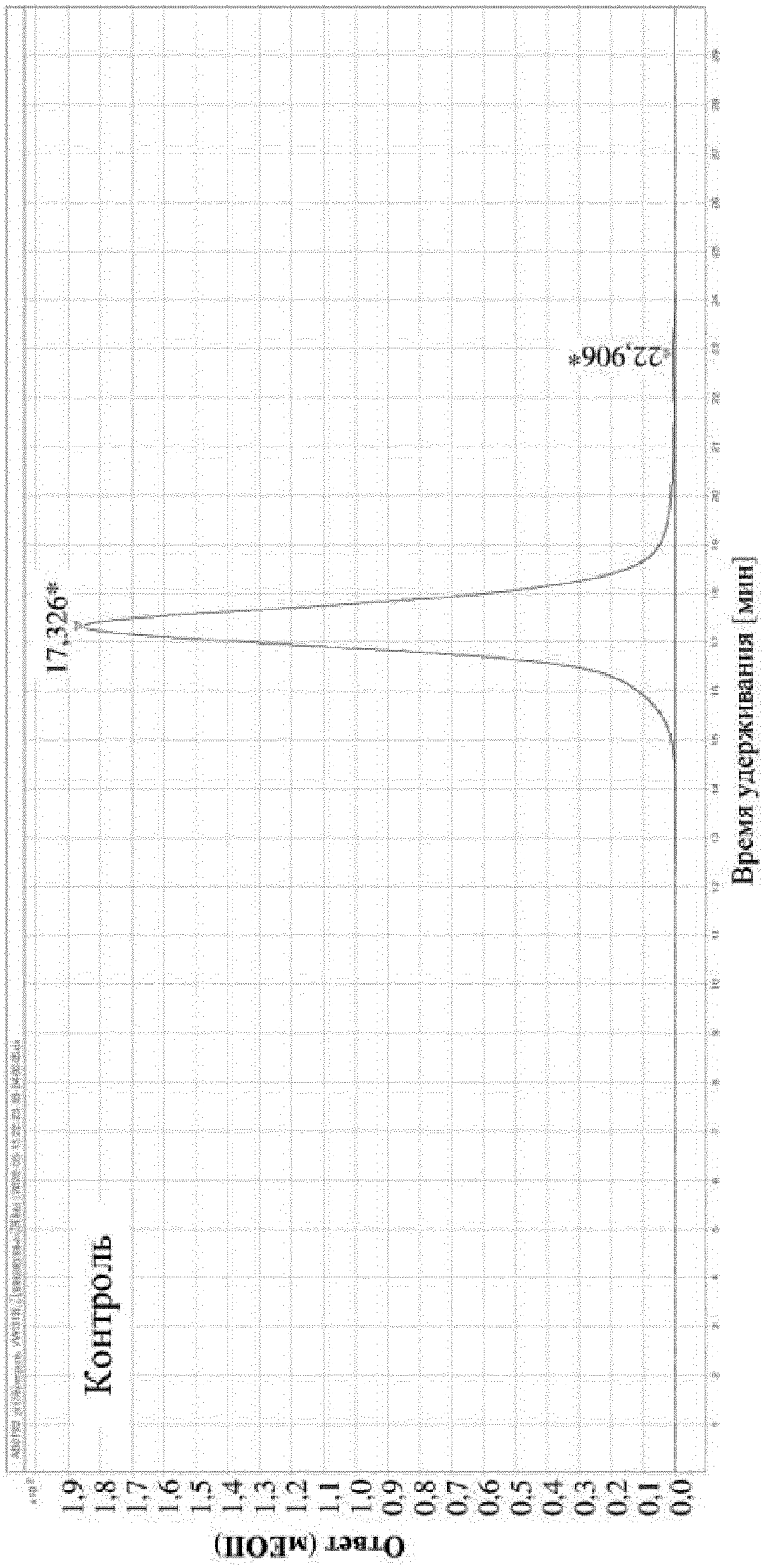
ФИГ. 265 продолжение


Mkr 9,99
Mkr 4,05
Контроль
Подвергнутое стрессовому условию pH 5
15000
10000
5000
0
Флуоресценция
3
4
5
6
7
8
9
10
pI

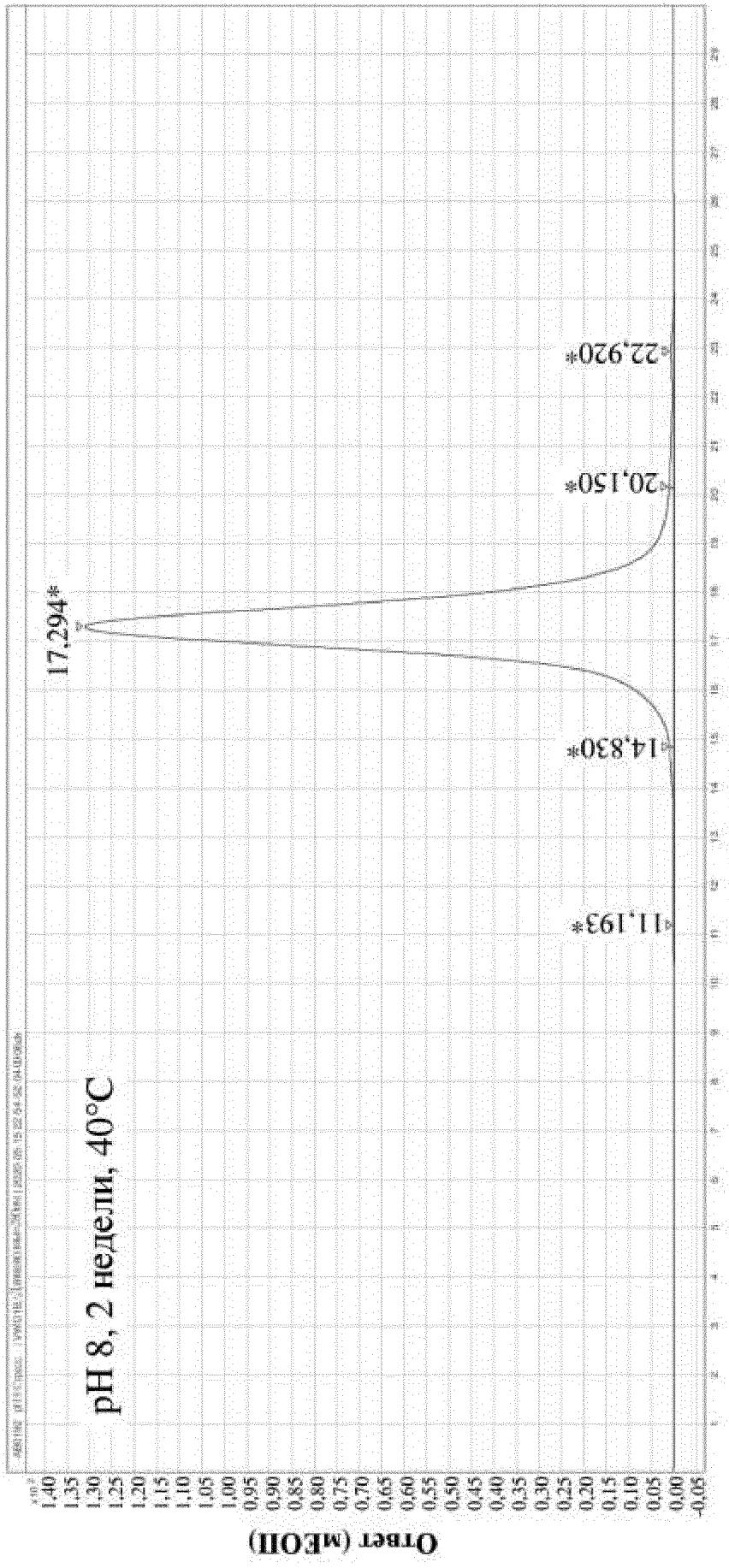
ФИГ. 266

ФИГ. 267

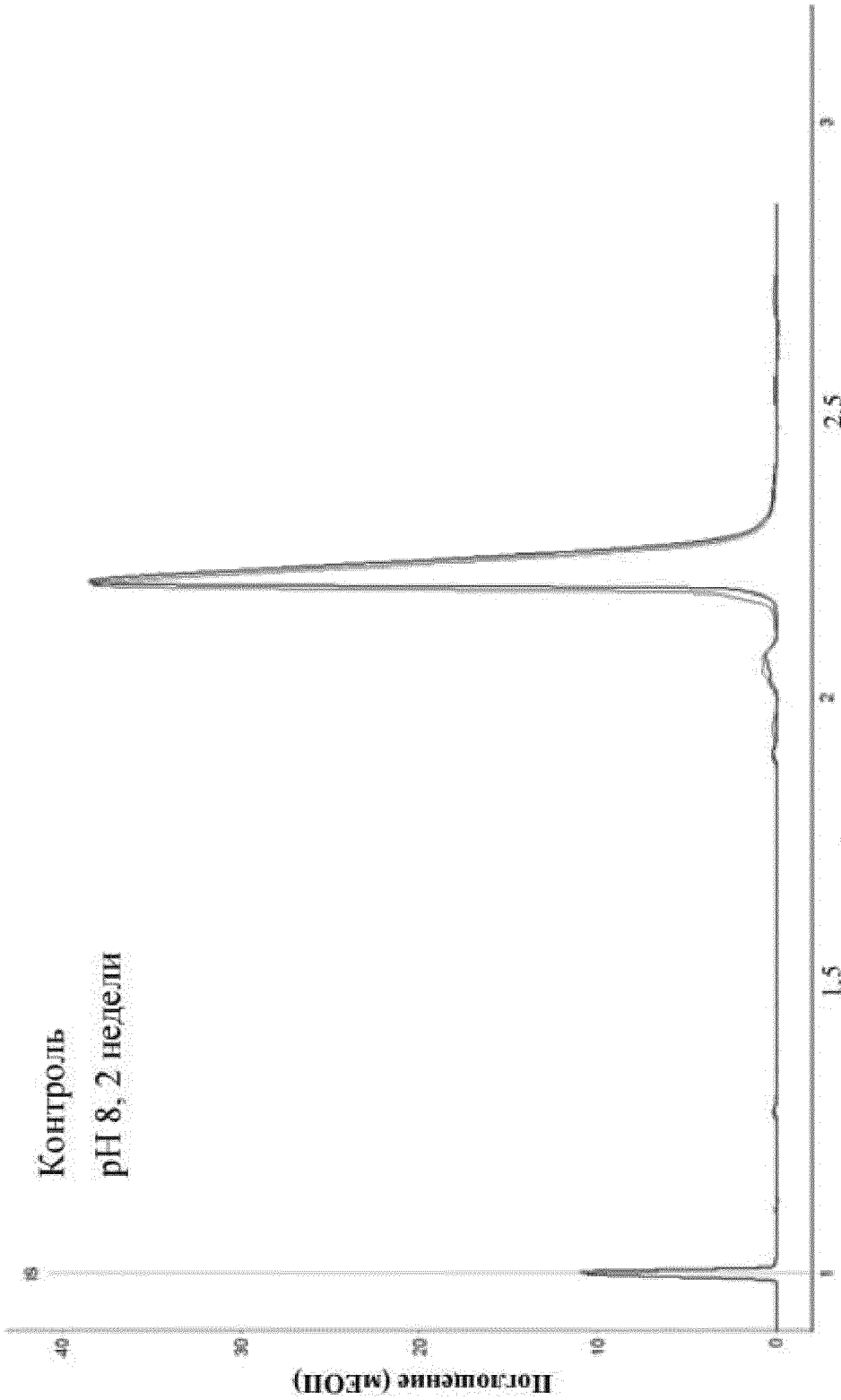

PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
20
15
10
5
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0192, контроль
AB0192 pH5



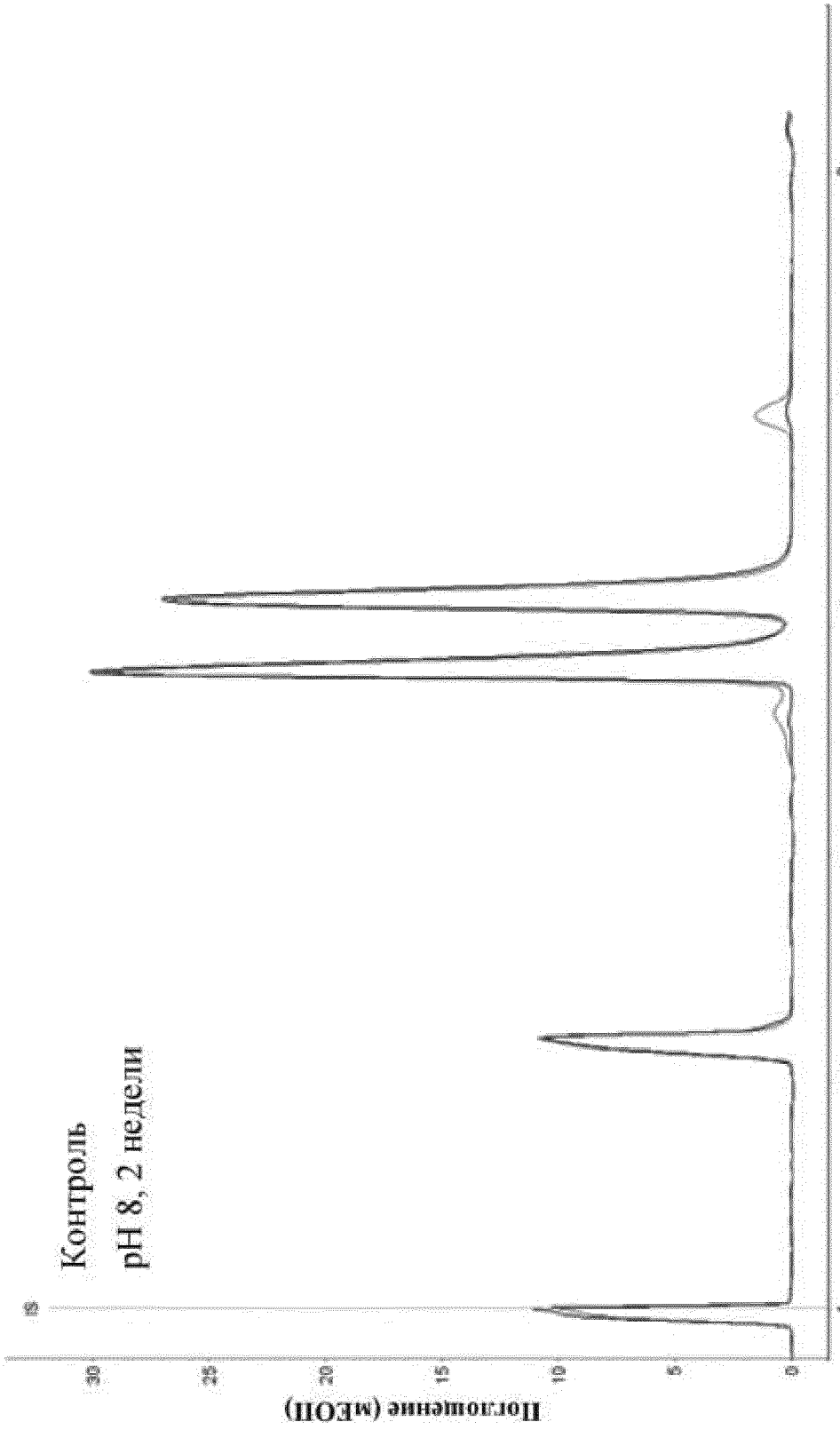

ФИГ. 268



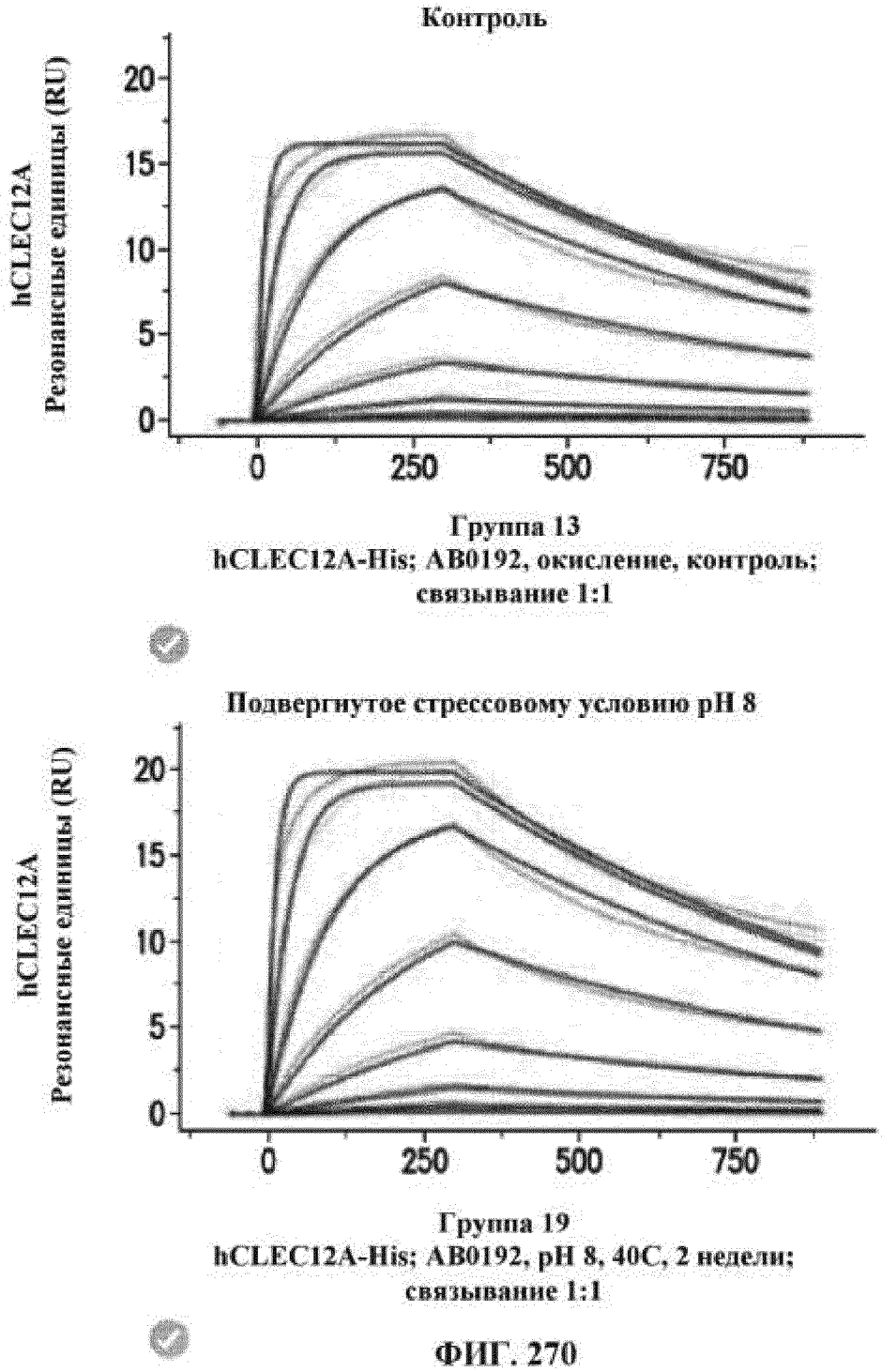

**ФИГ. 268 продолжение**


Контроль
pH 8, 2 недели
Поглощение (мЕОП)
0
10
20
30
40
1
1,5
2
2,5
3
Относительное время миграции

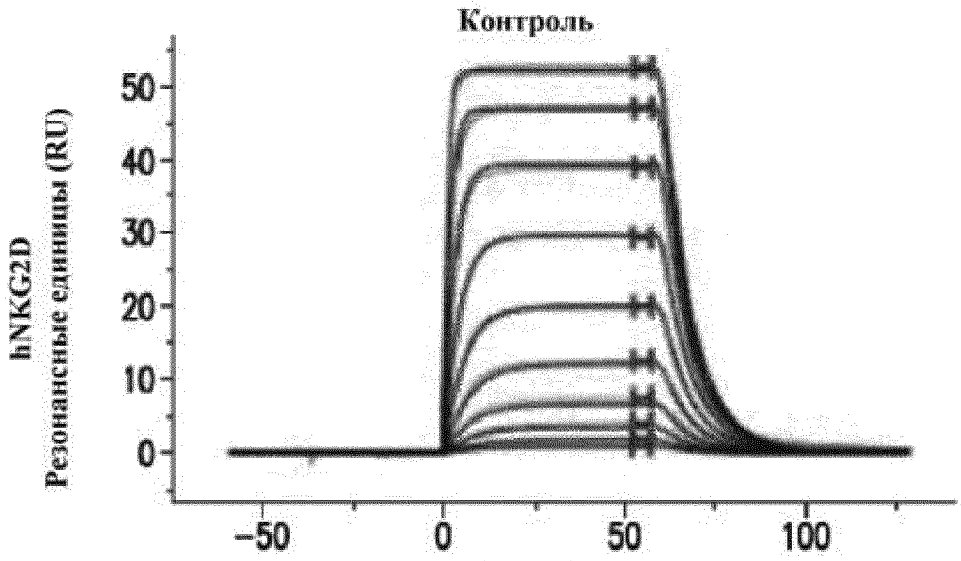
ФИГ. 269




ФИГ. 269 продолжение

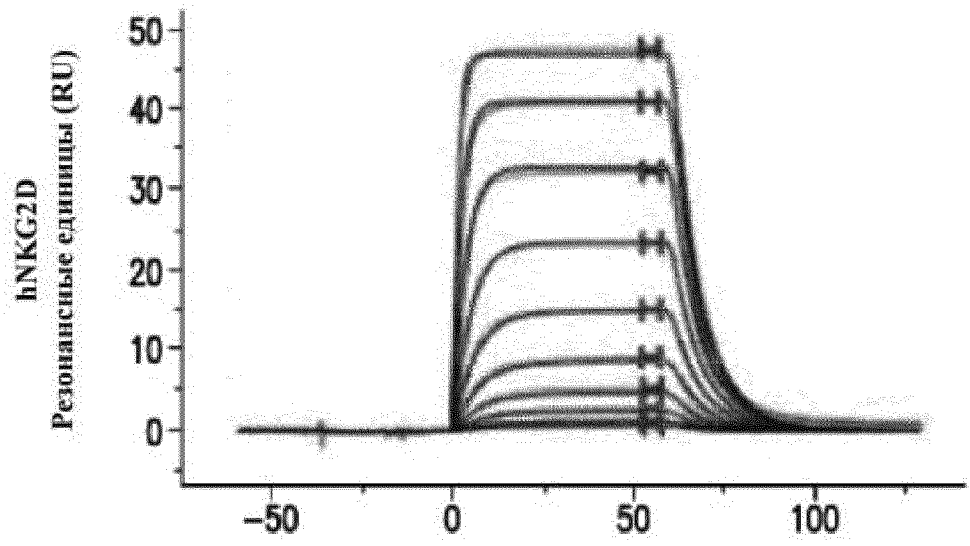

Контроль
hCLEC12A
Резонансные единицы (RU)
20
15
10
5
0
0
250
500
750
Группа 13
hCLEC12A-His; AB0192, окисление, контроль;
связывание 1:1
Подвергнутое стрессовому условию pH 8
hCLEC12A
Резонансные единицы (RU)
20
15
10
5
0
0
250
500
750
Группа 19
hCLEC12A-His; AB0192, pH 8, 40C, 2 недели;
связывание 1:1

ФИГ. 270



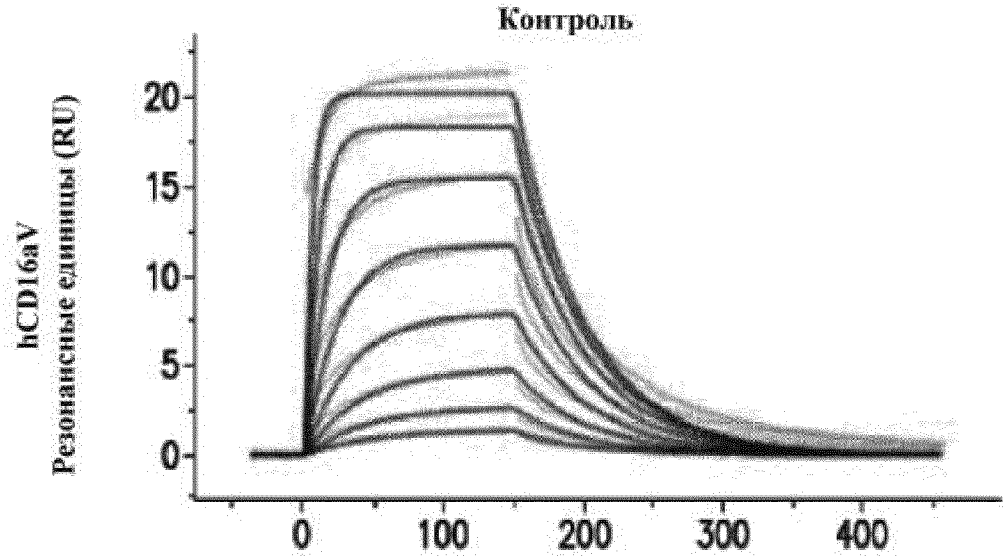

Группа 5
AB0192, цитрат, контроль; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

Подвергнутое стрессовому условию pH 8

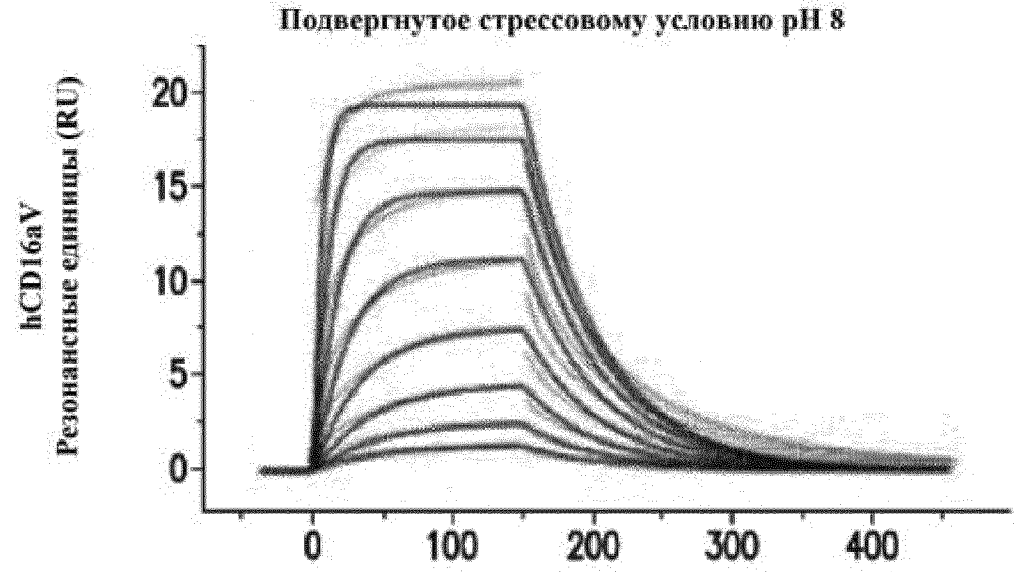



Группа 19
AB0192, pH 8, 40C, 2 недели; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 270 продолжение

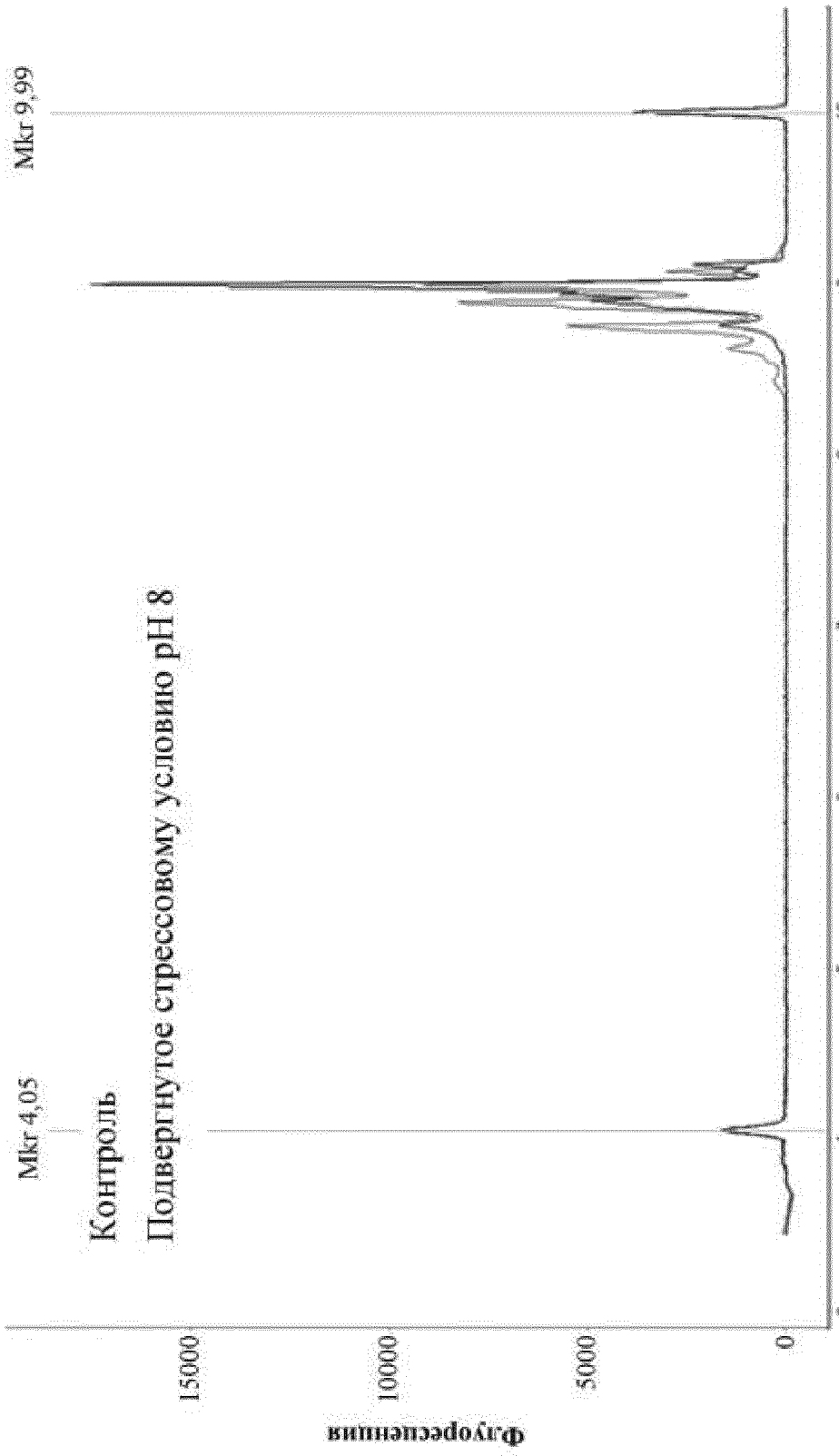



Группа 8
AB0192, цитрат, контроль; связывание 1:1



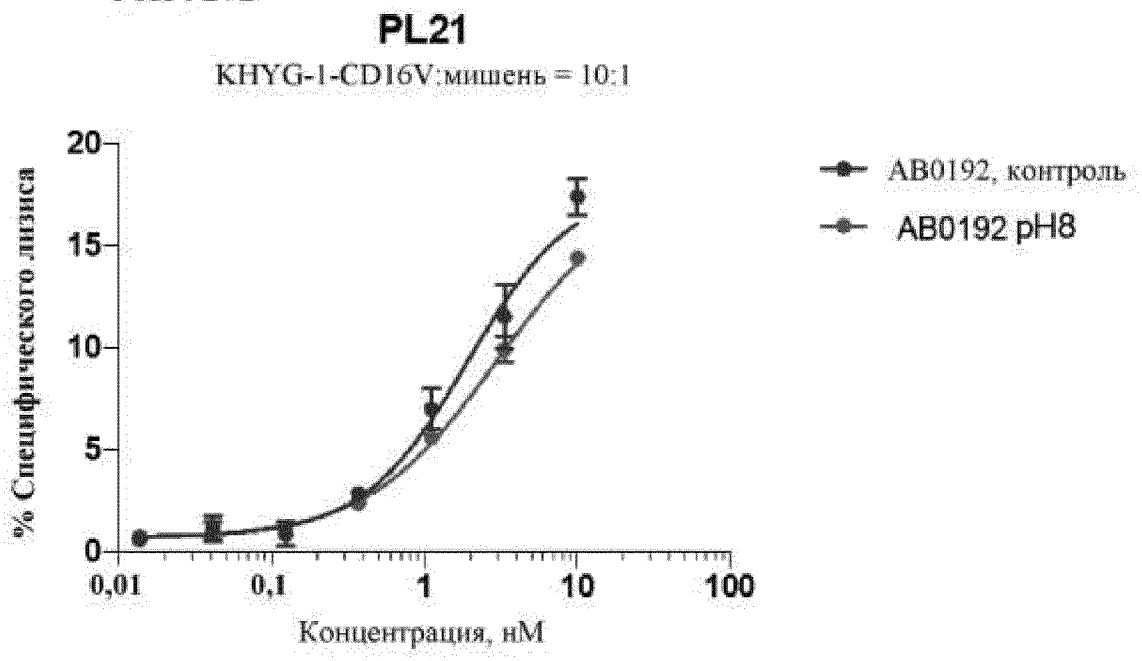

Группа 26
AB0192, pH 8, 40C, 2 недели; связывание 1:1

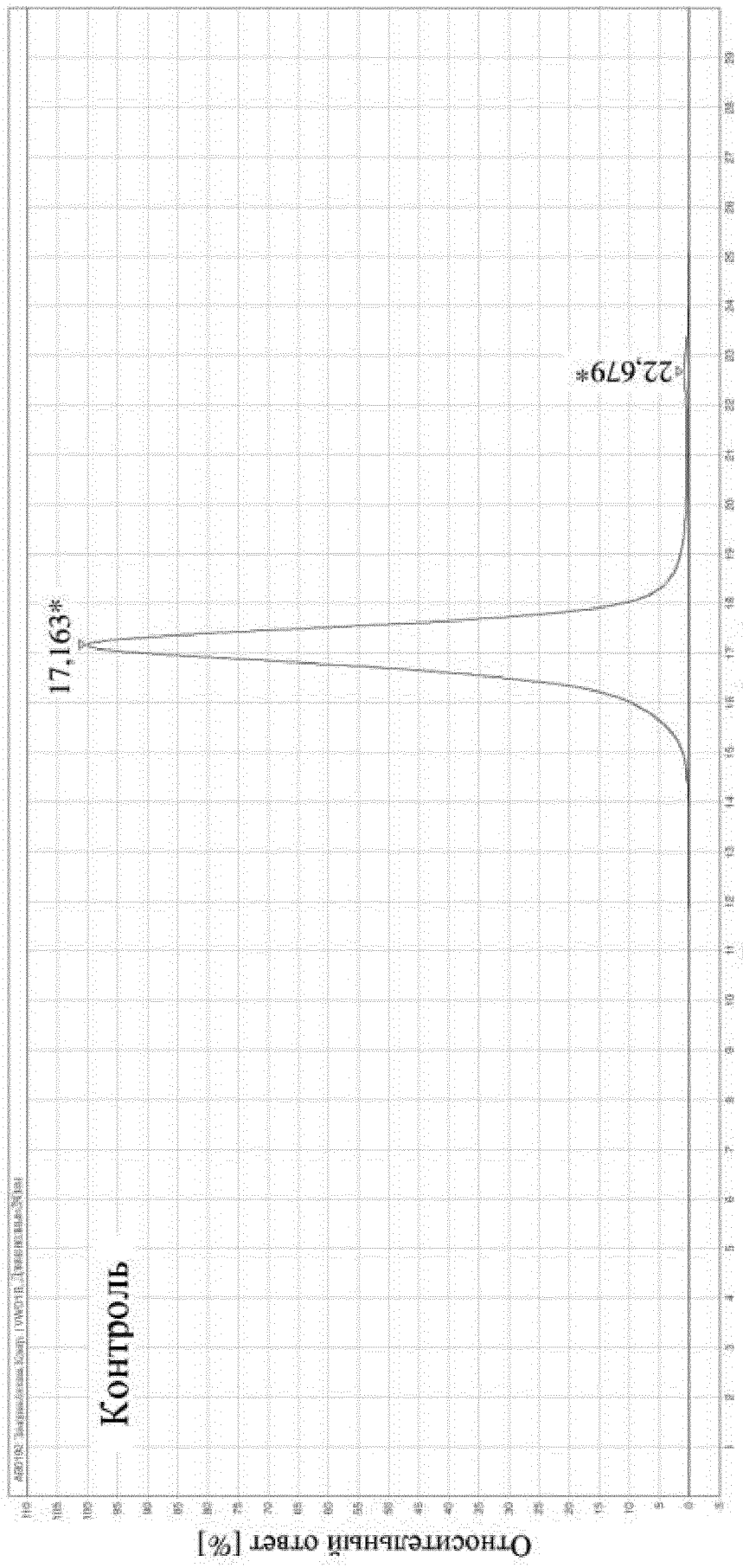
ФИГ. 270 продолжение


Mkr 9,99
Mkr 4,05
Контроль
Подвергнутое стрессовому условию pH 8
15000
10000
5000
0
Флуоресценция
3
4
5
6
7
8
9
10
pI

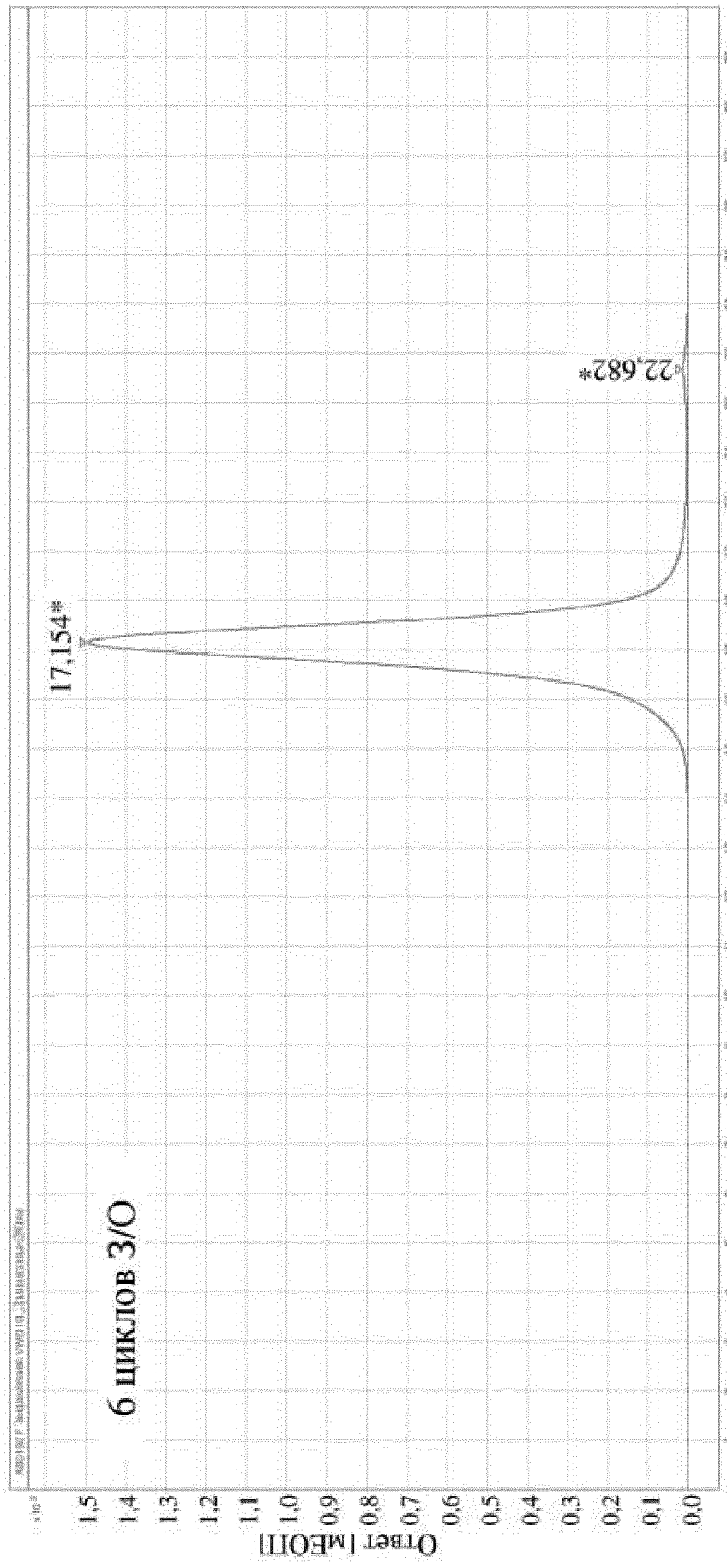
ФИГ. 271

ФИГ. 272

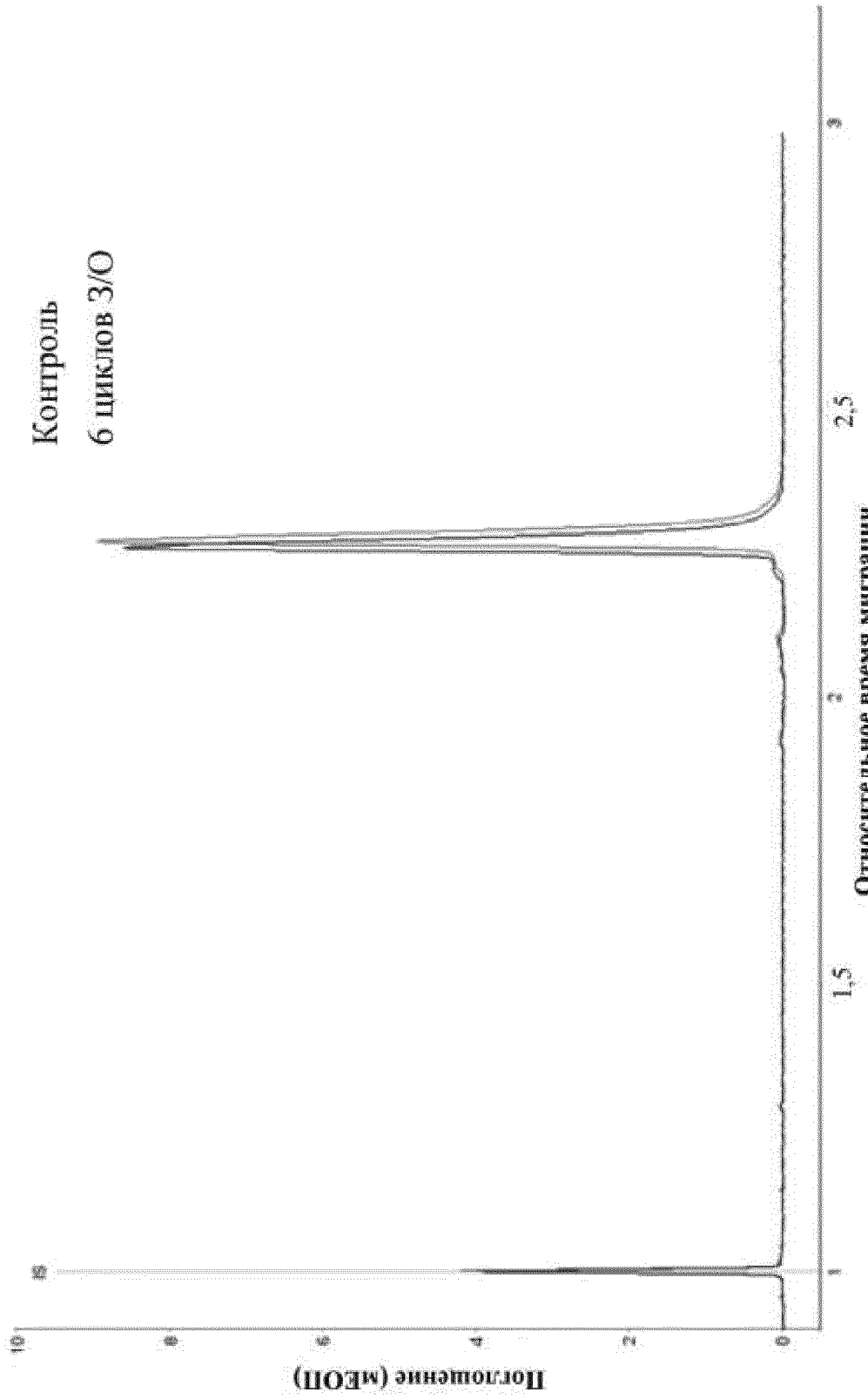

PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
20
15
10
5
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0192, контроль
AB0192 pH8


Контроль
17,163*
22,679*
Относительный ответ [%]
Время удерживания [мин]

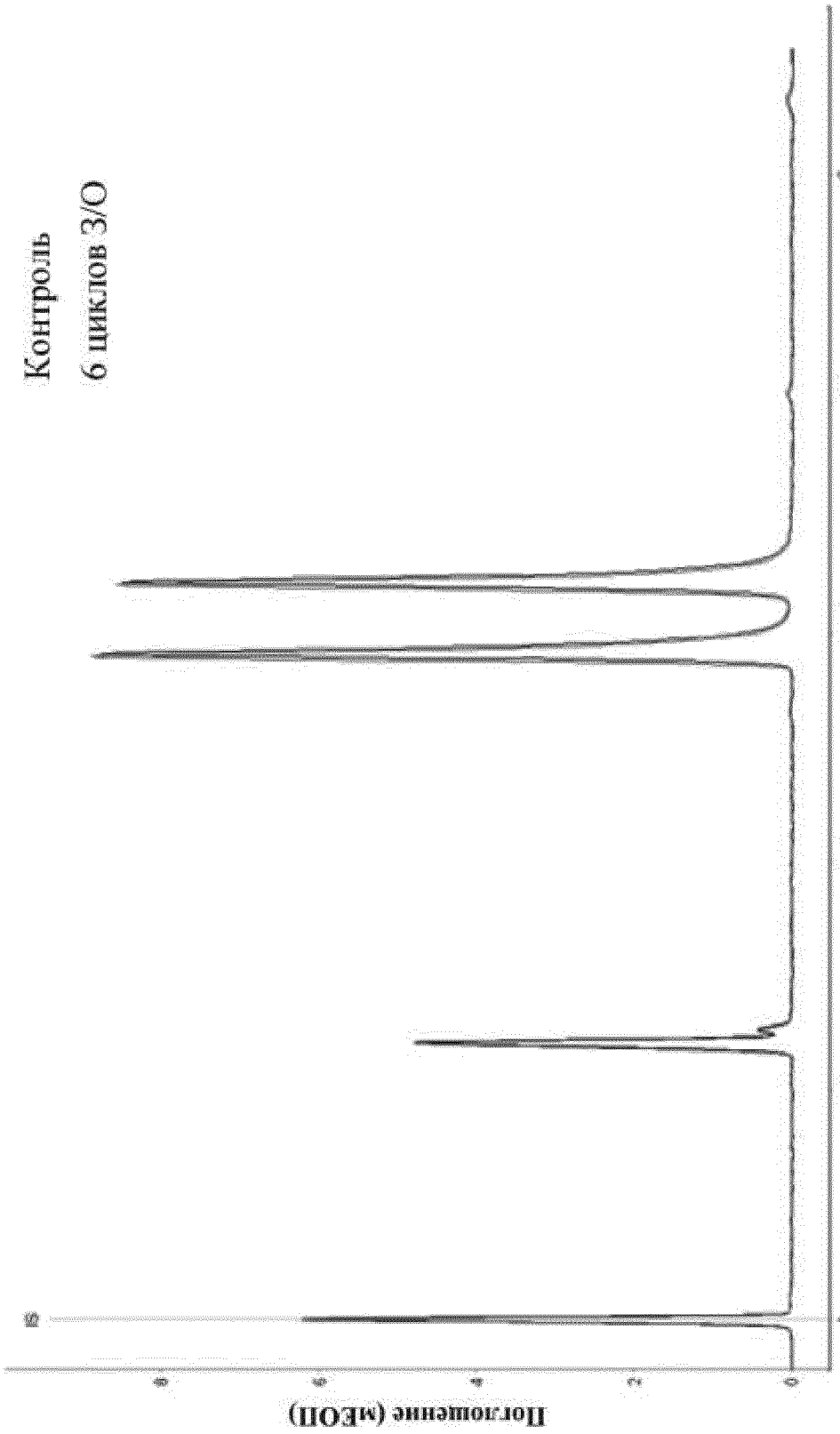
ФИГ. 273



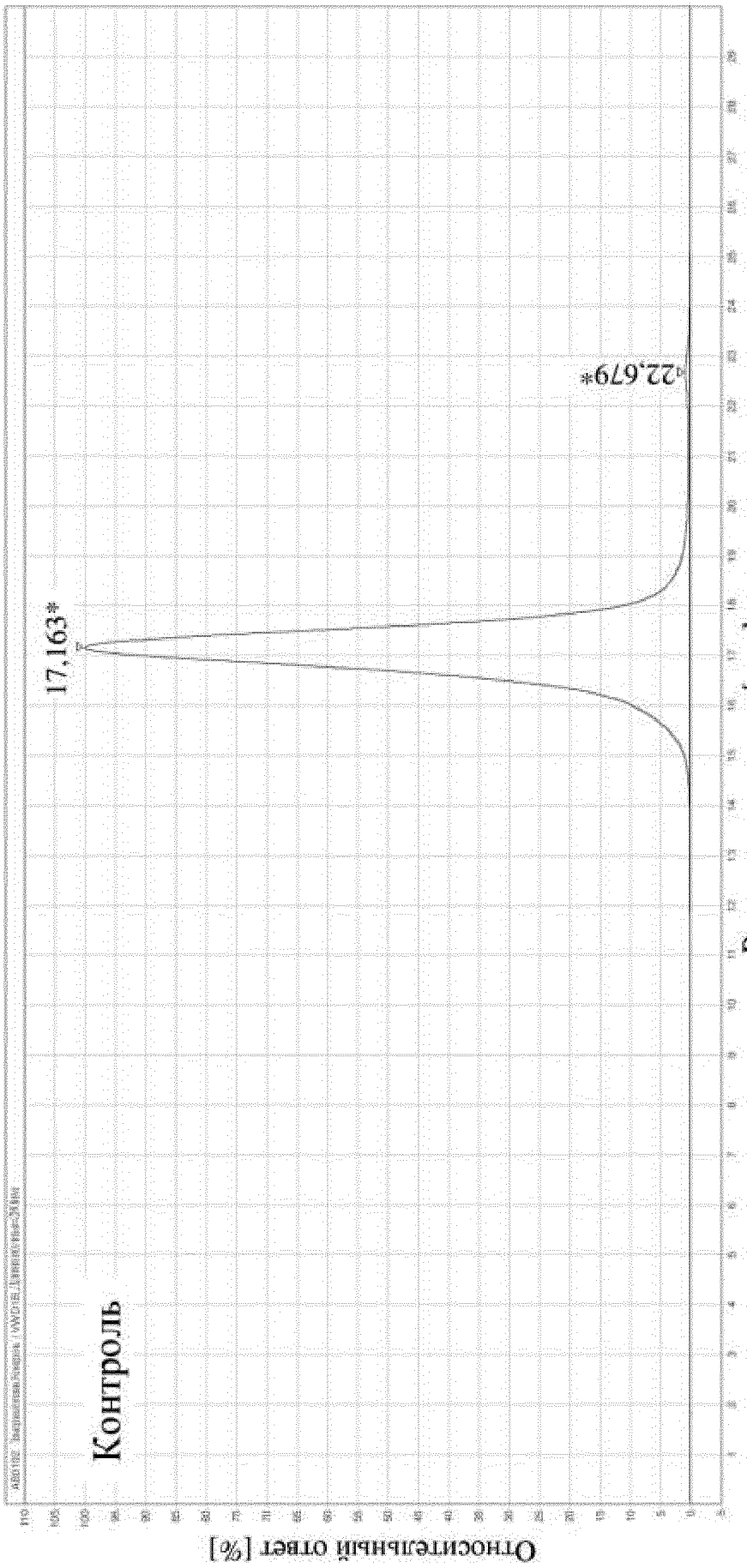

ФИГ. 273 продолжение


Контроль
6 циклов З/О
Поглощение (mEOD)
Относительное время миграции
1,5
2
2,5
3

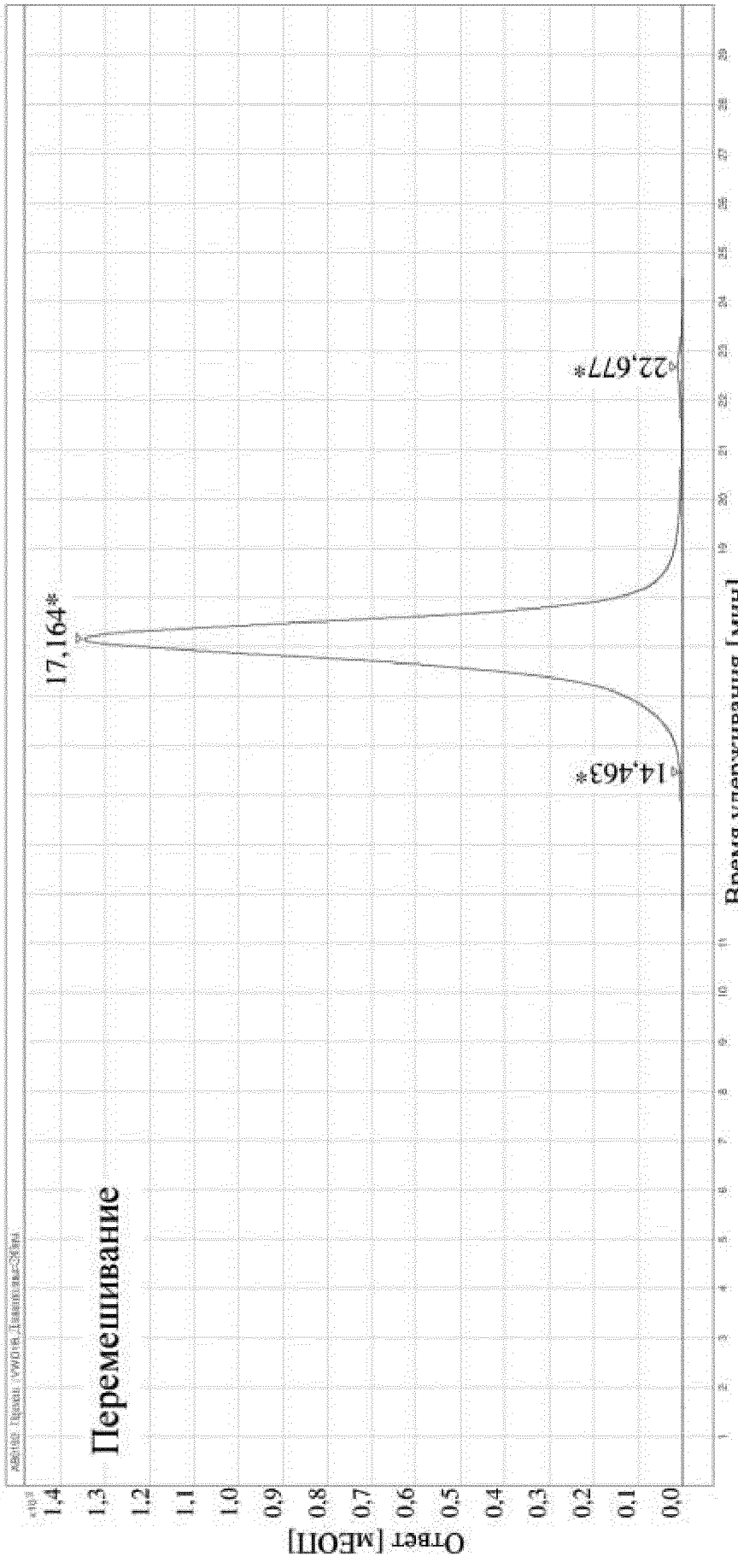
ФИГ. 274



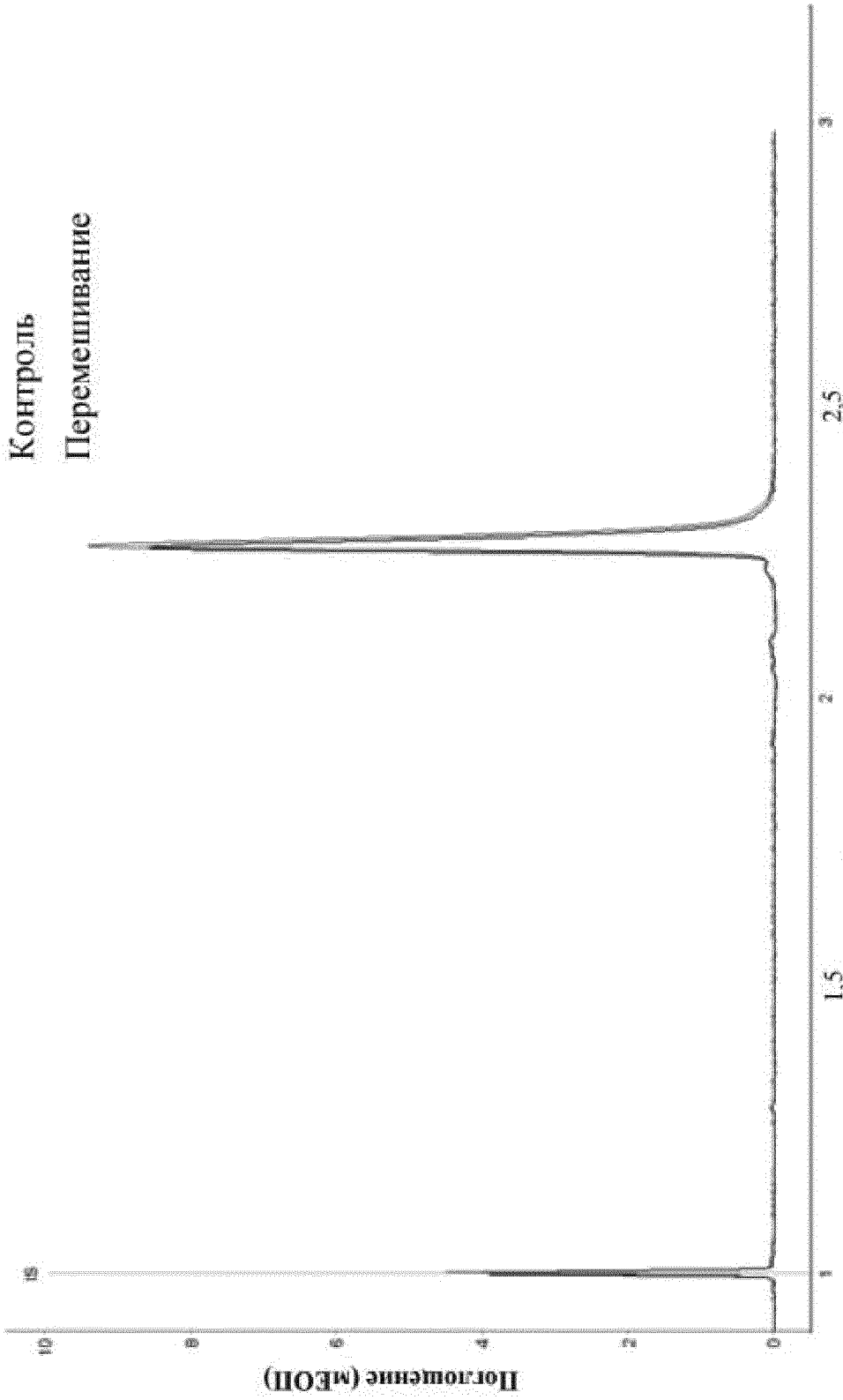

ФИГ. 274 продолжение


Контроль
17,163*
22,679*
Относительный ответ [%]
Время удерживания [мин]

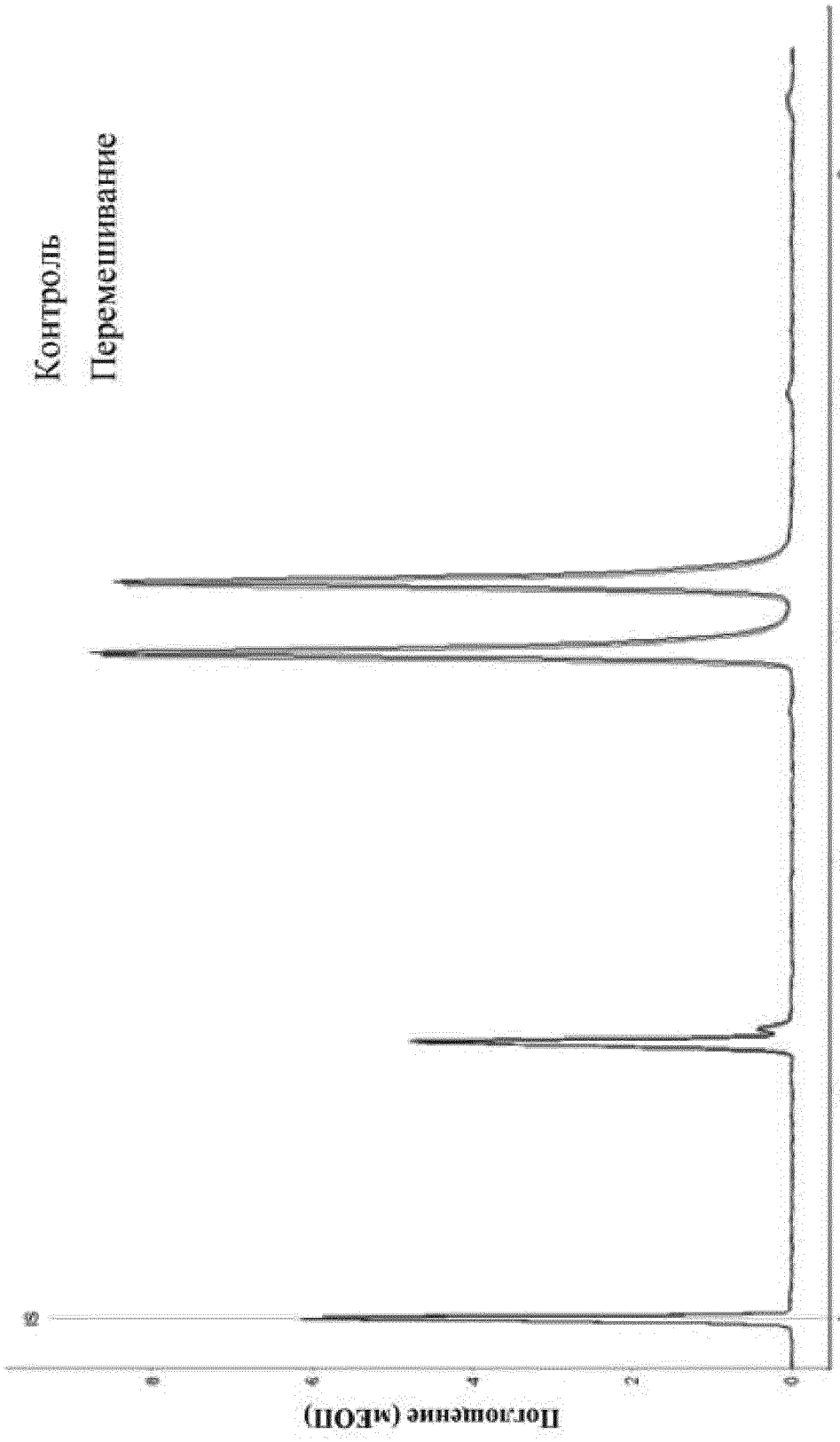
ФИГ. 275



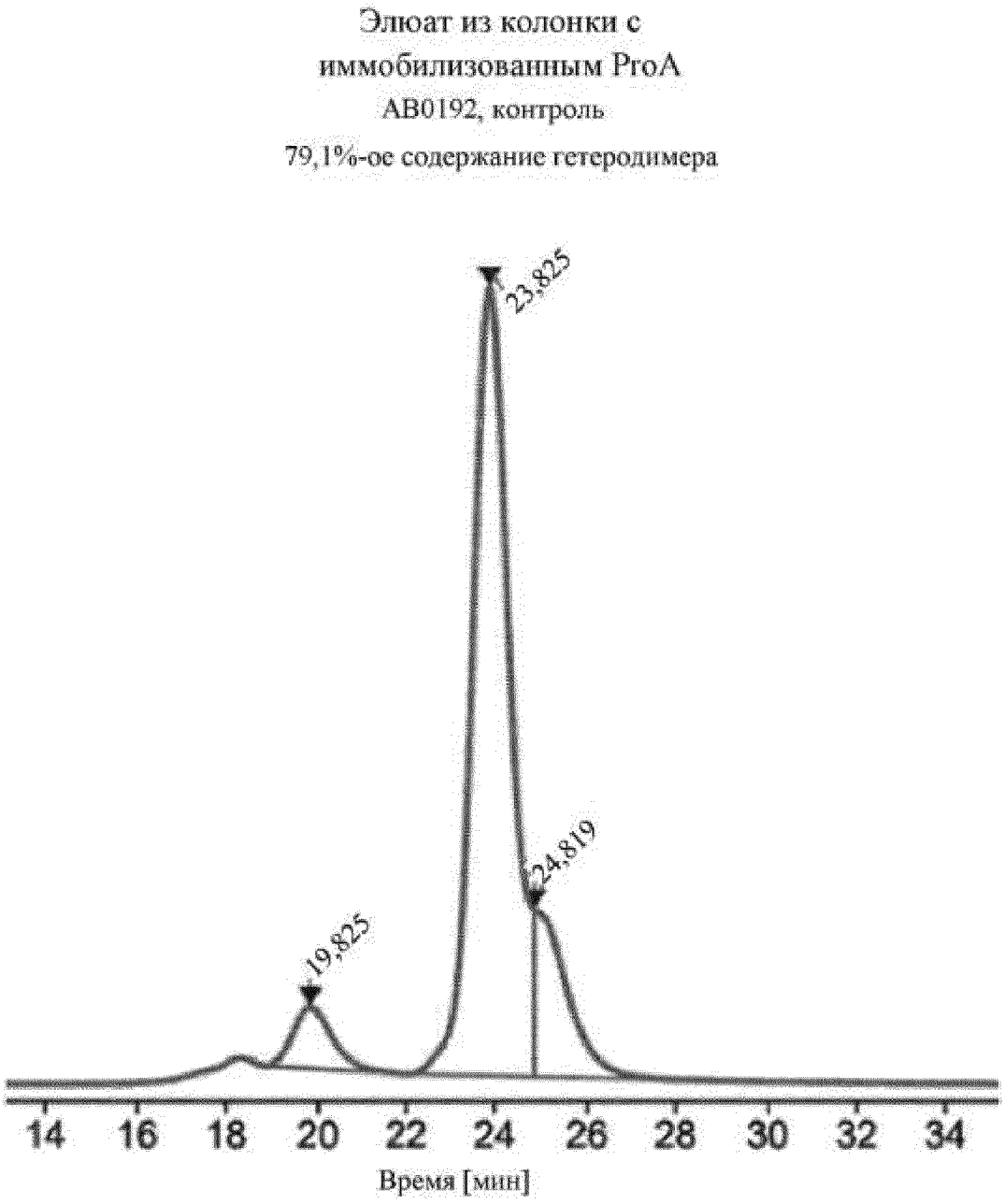

**ФИГ. 275 продолжение**


Контроль
Перемешивание
Поглощение (mEOП)
Относительное время миграции
0
2
4
6
8
10
1
1,5
2
2,5
3

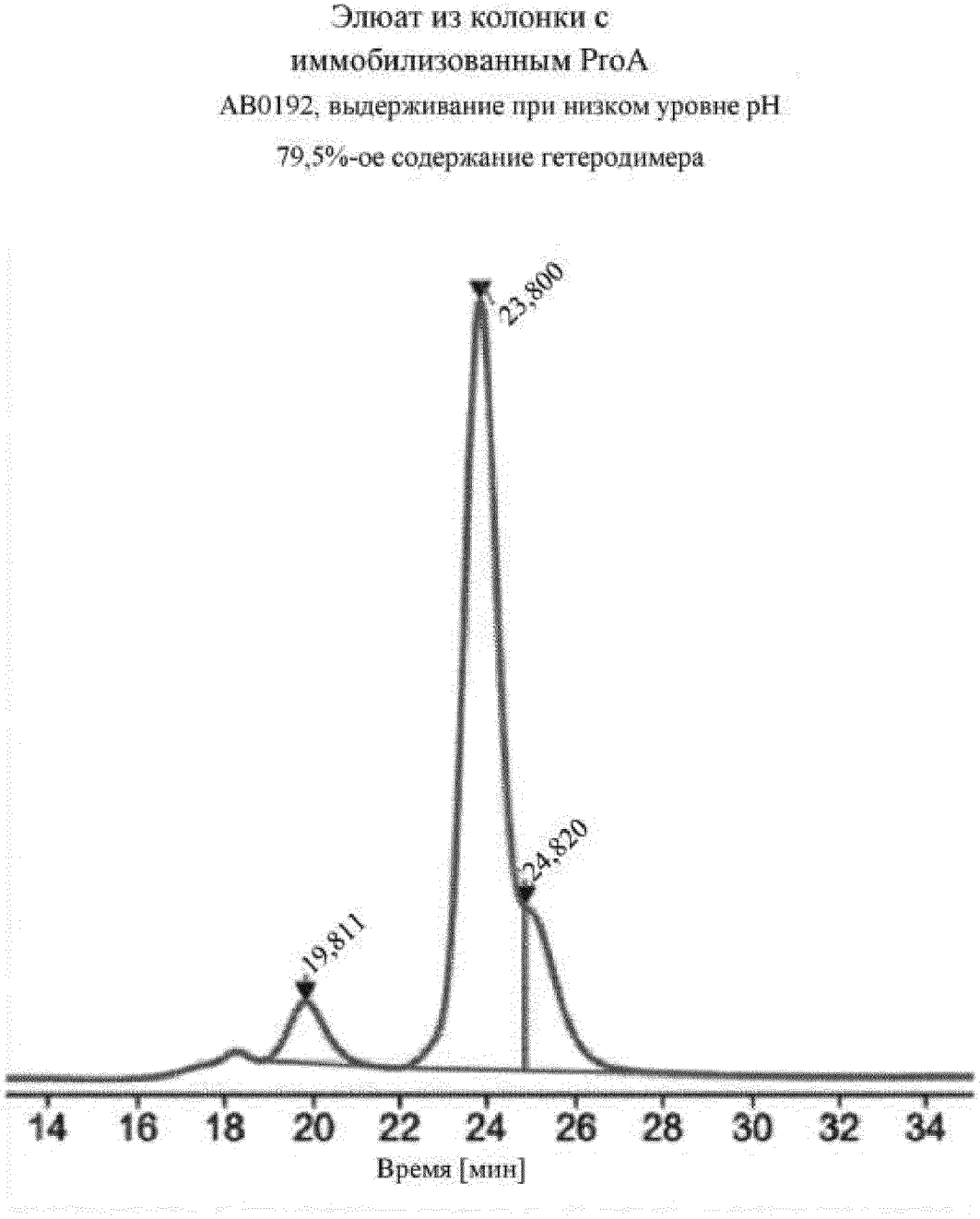
ФИГ. 276



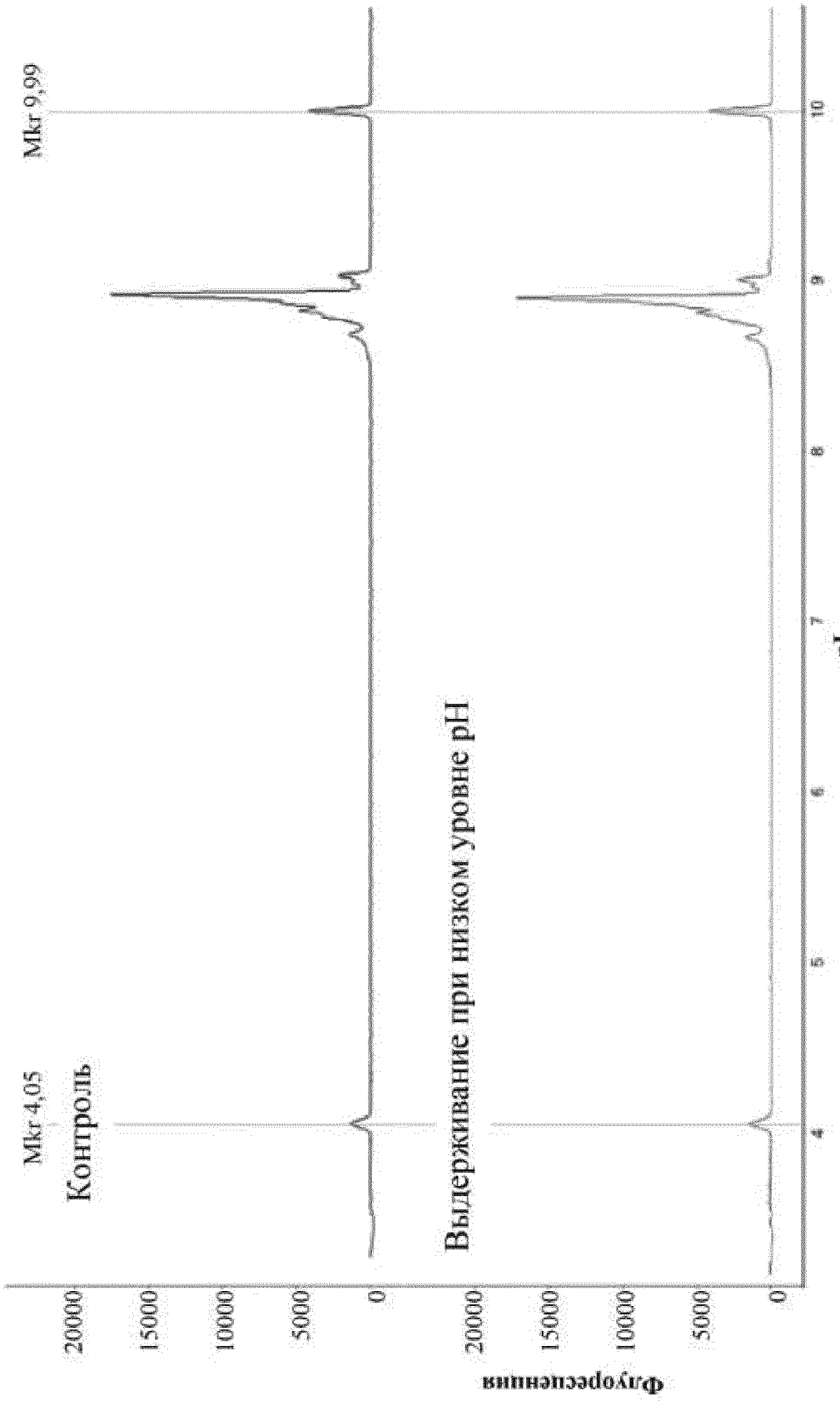

ФИГ. 276 продолжение


Элюат из колонки с
иммобилизованным ProA
AB0192, контроль
79,1%-ое содержание гетеродимера
23,825
24,819
19,825
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
Время [мин]

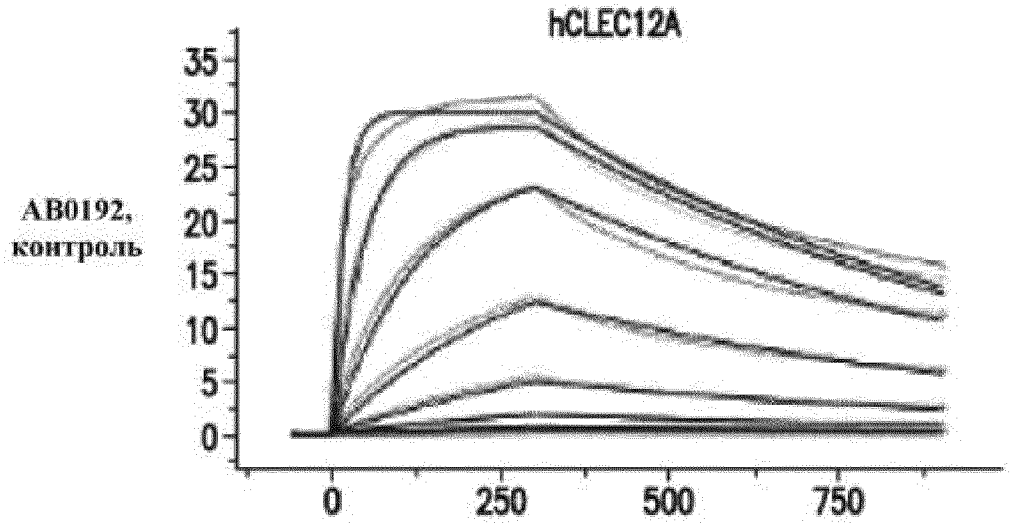
**ФИГ. 277**



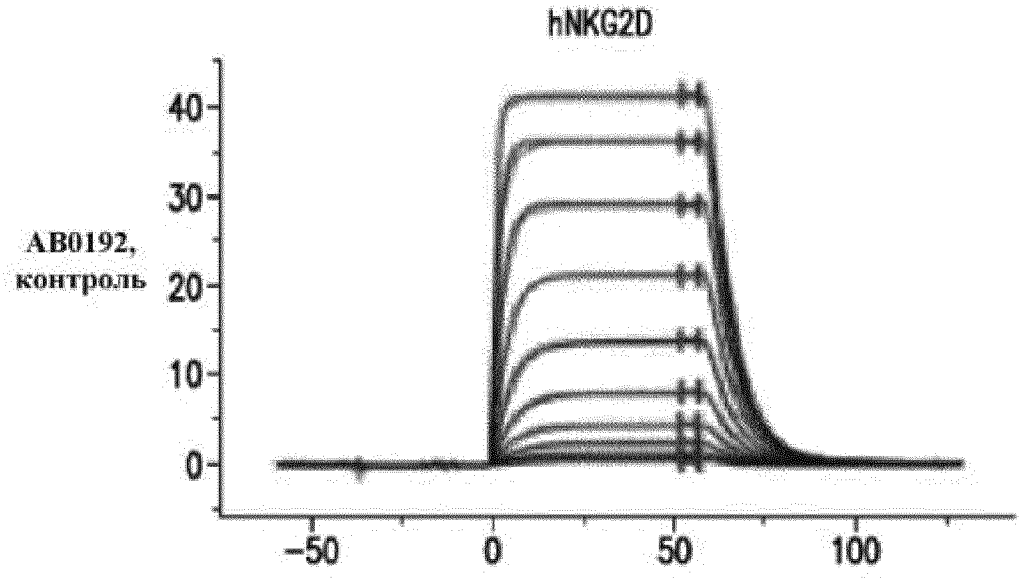

**ФИГ. 277 продолжение**


Мкг 9,99
Мкг 4,05
Контроль
Выдерживание при низком уровне pH
Флуоресценция
20000
15000
10000
5000
0
4
5
6
7
8
9
10
pI

ФИГ. 278

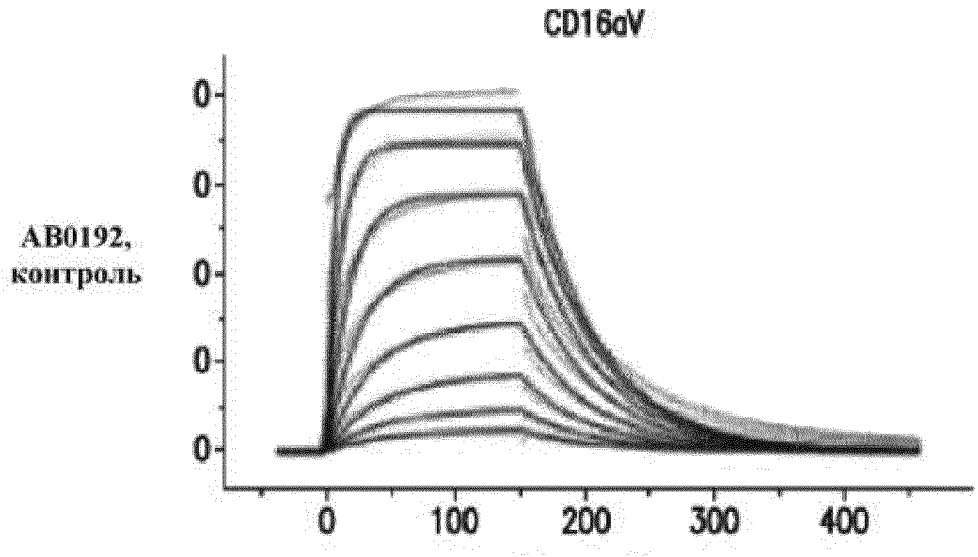



Группа 1
hCLEC12A-His; AB0192-005; связывание 1:1

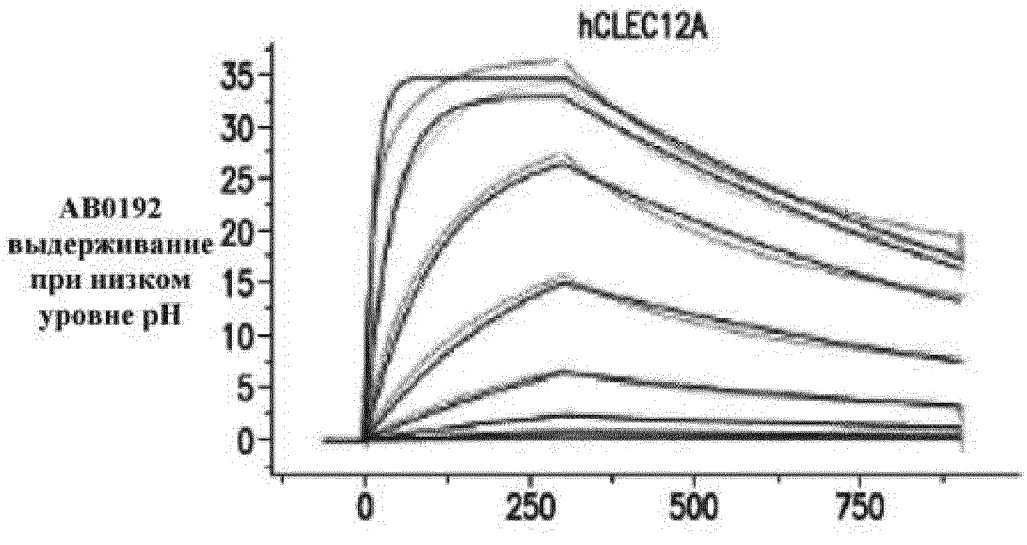



Группа 22
AB0192-005; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

ФИГ. 279

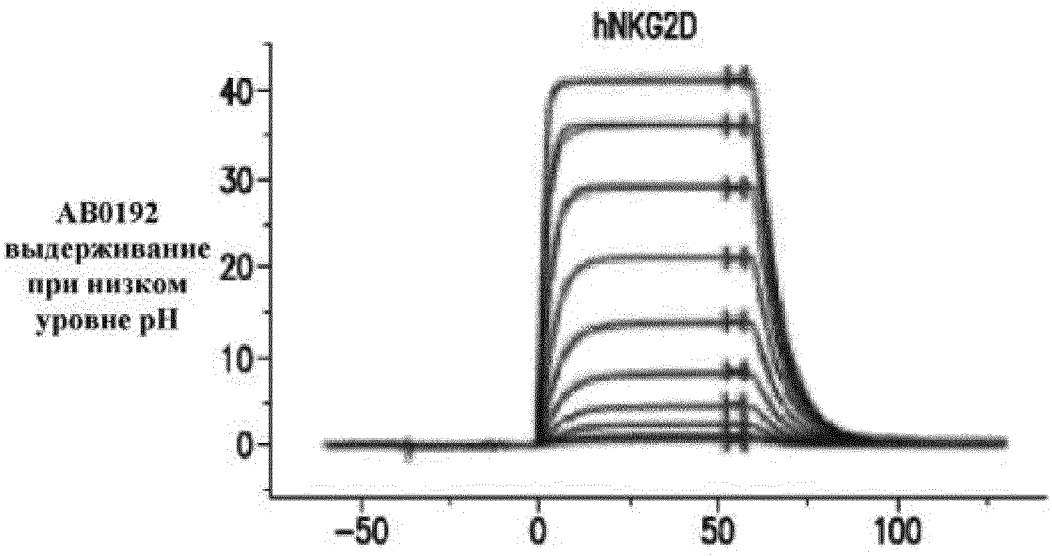



Группа 13
AB0192-005; связывание 1:1

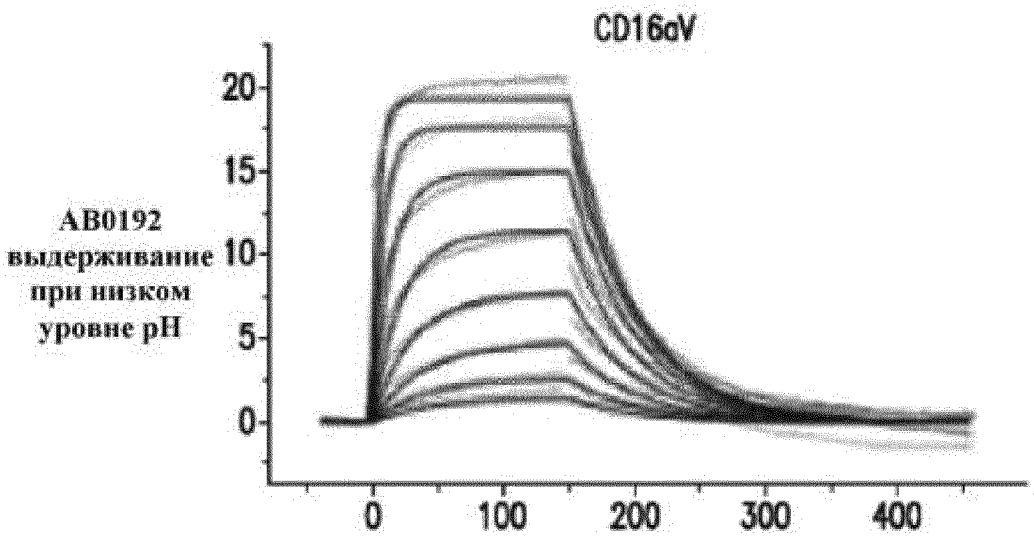



Группа 6
hCLEC12A-His; AB0192-006; связывание 1:1

ФИГ. 279 продолжение



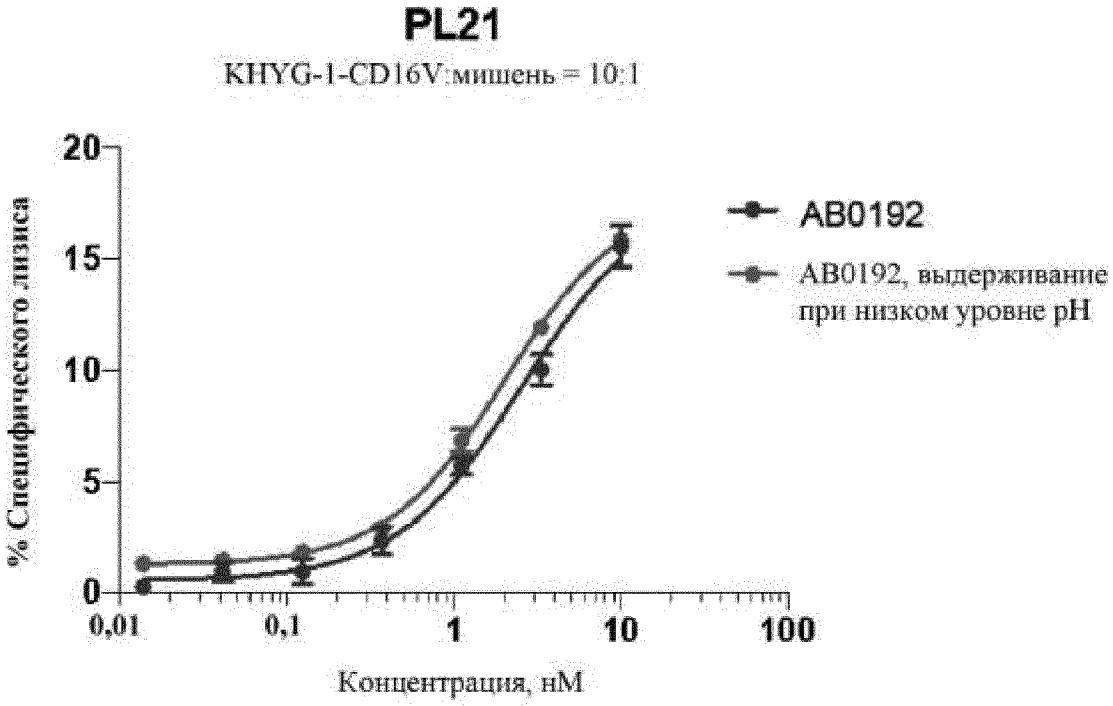

Группа 25
AB0192-006; mFc-hNKG2D; связывание 1:1

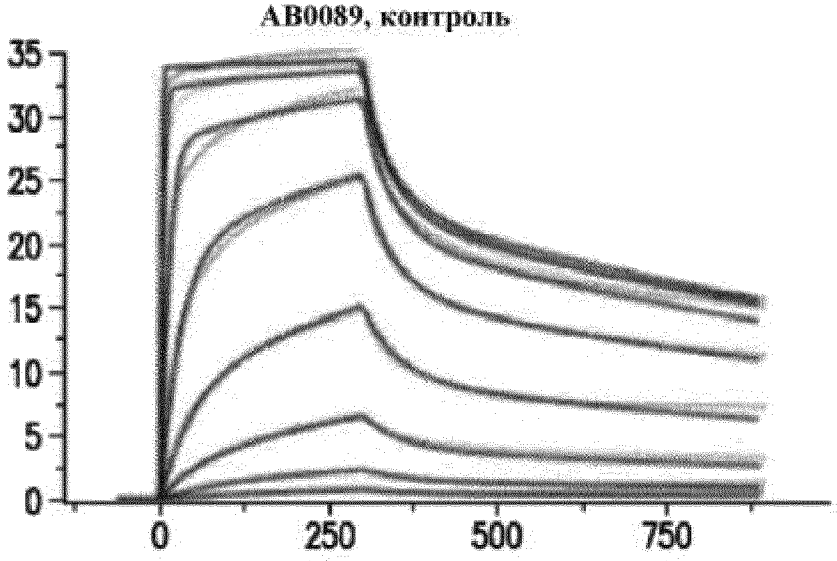


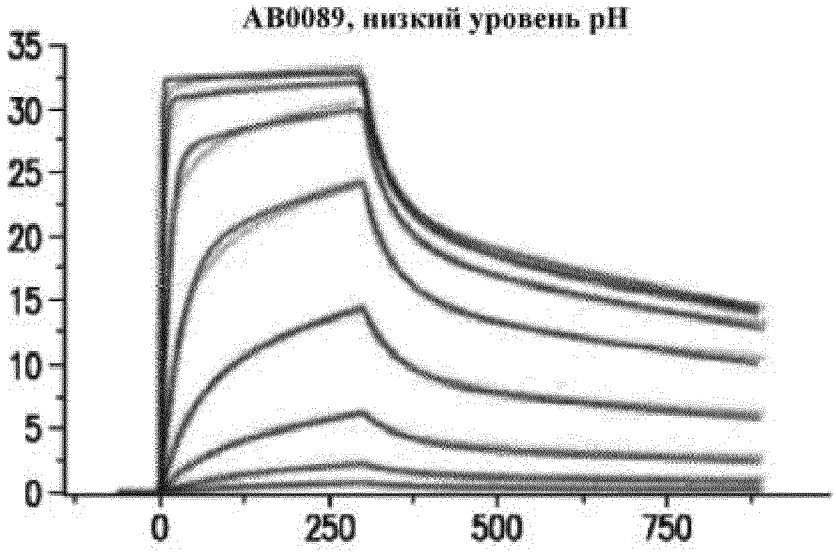

Группа 19
AB0192-006; связывание 1:1

ФИГ. 279 продолжение

ФИГ. 280

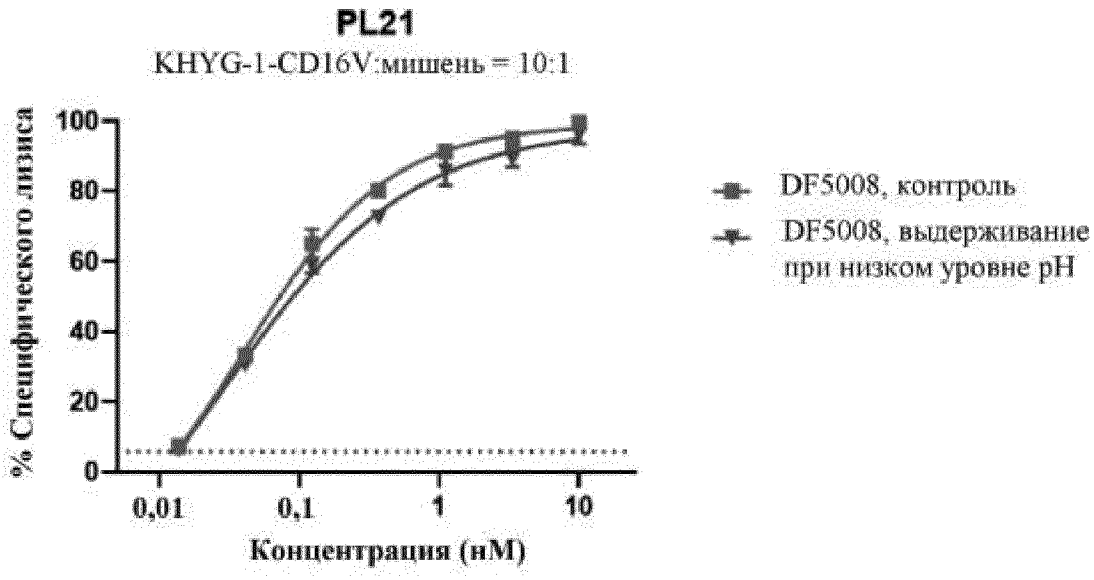

PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
20
15
10
5
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
AB0192
AB0192, выдерживание при низком уровне pH


AB0089, контроль
35
30
25
20
15
10
5
0
0
250
500
750


AB0089, низкий уровень pH
35
30
25
20
15
10
5
0
0
250
500
750

ФИГ. 281

**ФИГ. 282**


PL21
KHYG-1-CD16V:мишень = 10:1
% Специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
Концентрация (нМ)
DF5008, контроль
DF5008, выдерживание при низком уровне pH