(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293434 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.09

(22) Дата подачи заявки
2021.05.26

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

(54) БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ CD3 АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ, И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **63/030,448; 63/057,958; 63/094,931**
(32) **2020.05.27; 2020.07.29; 2020.10.22**
(33) **US**
(86) **PCT/IB2021/054582**
(87) **WO 2021/240388 2021.12.02**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ло Цзиньцюань, Бриттингем Рэймонд, И Фан, Бродьюр Скотт Р. (US), Ганешан Раджкумар (IN), Хувер Жаклин, Джейкобс Стивен А., Кейн Коллин М., Сингх Санджая, Зволяк Адам, Бхатт Тривени К., Фельдкамп Майкл Деннис, Лапорте Шерри Линн (US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые связывают белок кластера дифференцировки 3 (CD3), включающие антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε, кодирующие их полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева, способы их получения и применения.

202293434 A1

202293434 A1

БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ CD3 АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ, И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СМЕЖНУЮ ЗАЯВКУ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по следующим предварительным заявкам на патент США: № 63/030,448, поданной 27 мая 2020 г., № 63/057,958, поданной 29 июля 2020 г., и № 63/094,931, поданной 22 октября 2020 г. Описание каждой из упомянутых выше заявок полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 11 мая 2021 г., называется JBI6316WOPCT1_SL.txt и имеет размер 1 061 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

В описании предложены антигенсвязывающие домены, которые связывают белок кластера дифференцировки 3 (CD3), включающие антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3, кодирующие их полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева, способы их получения и применения.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Биспецифические антитела и фрагменты антител исследовали как средство для рекрутинга цитолитических Т-клеток для уничтожения опухолевых клеток. Однако клиническое применение многих биспецифических антител, рекрутирующих Т-клетки, ограничено проблемами, включая неблагоприятную токсичность, потенциальную иммуногенность и проблемы при производстве. Таким образом, существует значительная потребность в улучшенных биспецифических антителах, рекрутирующих цитолитические Т-клетки, для уничтожения опухолевых клеток, которые, включают, например, сниженную токсичность и благоприятные производственные профили.

Белковый комплекс Т-клеточный антигенный рецептор / CD3 человека состоит из шести различных цепей: CD3γ-цепи (SwissProt P09693), CD3δ-цепи (SwissProt P04234), двух CD3ε-цепей (SwissProt P07766) и одного гомодимера CD3ζ-цепи (SwissProt P20963) (ε γ: ε δ: ζζ), который связан с α- и β-цепями Т-клеточного рецептора. Этот комплекс играет важную роль в связывании распознавания антигена с несколькими внутриклеточными путями сигнальной трансдукции. Комплекс CD3 опосредует трансдукцию сигнала, что приводит к активации Т-клеток и пролиферации. CD3 необходим для иммунного ответа.

Перенаправление цитотоксических Т-клеток на уничтожение опухолевых клеток стало важным терапевтическим механизмом при многочисленных онкологических показаниях (Labrijn, A. F., Janmaat, M. L., Reichert, J. M. & Parren, P. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. Nat Rev Drug Discov 18, 585-608, doi:10.1038/s41573-019-0028-1 (2019)). Активация Т-клеток следует гипотезе о двух сигналах, в которой первый сигнал обеспечивается взаимодействием комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) с комплексом родственного пептида MHC на представляющей антиген клетке (APC), а второй сигнал может быть либо костимулирующим, либо коингибирующим (Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Nat Rev Immunol 13, 227-242, doi:10.1038/nri3405 (2013)). Опухоли часто не могут представлять достаточное количество чужеродных антигенов, чтобы вызвать иммунный ответ на основе Т-клеток, и BsAb, взаимодействующие с Т-клетками (bsTCE), могут преодолеть эту проблему, индуцируя активацию Т-клеток в отсутствие взаимодействия TCR-pMHC. Передача сигналов Т-клеточного рецептора происходит через мотивы ITAM в цитоплазматической области субъединиц CD3 TCR (Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity 39, 1-10, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012 (2013)). В частности, субъединица CD3ε присутствует в двух копиях на комплекс TCR и представляет собой привлекательный антиген для взаимодействия с Т-клетками. Действительно, многочисленные bsTCE, нацеленные на CD3ε продемонстрировали клиническую противоопухолевую эффективность в случаях, когда мАт оказались неэффективными, и в настоящее время прилагаются значительные усилия по фармацевтической разработке нескольких опухолевых мишеней (Labrijn, A. F. et al., 2019). Три основные проблемы для клинической разработки bsTCE представляют собой следующее: 1) возможность быстрой и тяжелой токсичности, ассоциированной с высвобождением цитокинов посредством системной или

внеопухолевой активации Т-клеток, 2) практические проблемы с составом и дозировкой bsTCE с высокой эффективностью и четкими терапевтическими индексами и 3) возможность индуцированной реактивацией гибели Т-клеток, причем инфильтрирующие опухоль Т-клетки (TILS) подвергаются апоптозу в ответ на чрезмерную активацию посредством bsTCE (Wu, Z. & Cheung, N. V. T cell engaging bispecific antibody (T-BsAb): From technology to therapeutics. Pharmacol Ther 182, 161-175, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.08.005 (2018)).

В совокупности эти наблюдения позволяют предположить, что в данной области существует потребность в новых Cd3-специфических связывающих белках, которые имеют больше преимуществ и могут быть применены для лечения рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание удовлетворяет эту потребность, например, путем предложения новых CD3ε-специфических связывающих белков, которые обладают высокой аффинностью к опухолевому антигену и слабой аффинностью к Т-клеткам. Белки, содержащие антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε согласно настоящему изобретению, продемонстрировали высокую термостабильность, сниженный риск дезамидирования и сниженную иммуногенность.

В определенных вариантах осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает кластер дифференцировки 3ε (CD3ε), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, содержит:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 24;

b. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 27;

c. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 28;

d. HCDR1, HCDR2 HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 29; или

e. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

a. SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно;

b. SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно; или

c. SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv, (scFv)2, Fv, Fab, F(ab')2, Fd, dAb или VHH.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой Fab:

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой VHH.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к C-концу, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

В определенных вариантах осуществления L1 содержит:

a. около 5–50 аминокислот;

b. около 5–40 аминокислот;

c. около 10–30 аминокислот; или

d. около 10–20 аминокислот.

В определенных вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

В определенных вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 37 или 64.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

В других вариантах осуществления связывающий домен, который связывает CD3ε, содержит:

a. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

b. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

c. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

d. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

e. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 74.

В настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO: 23 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 103. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv, (scFv)2, Fv, Fab, F(ab')2, Fd, dAb или VHH. В других вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к C-концу, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH). В других вариантах осуществления L1 содержит a. около 5–50 аминокислот; b. около 5–40 аминокислот; c. около 10–30 аминокислот; или d. около 10–20 аминокислот. В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит: VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24; VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27; VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28; VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления выделенный белок представляет собой моноспецифический белок. В других вариантах осуществления выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок. В других вариантах осуществления мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок. В других вариантах осуществления мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок.

В других вариантах осуществления белок конъюгирован с фрагментом, увеличивающим время полужизни.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную

область Ig, фрагмент константной области Ig, область Fc, трансферрин, альбумин, альбумин-связывающий домен или полиэтиленгликоль.

В других вариантах осуществления выделенный белок дополнительно содержит константную область иммуноглобулина (Ig) или фрагмент его константной области Ig.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит область Fc.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнирной области, домена CH2 и домена CH3.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig посредством второго линкера (L2).

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

В других вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, отличным от CD3ε.

В других вариантах осуществления клеточный антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген. В других вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой белок родственной калликреину пептидазы 2 (hK2). В других вариантах осуществления опухолеассоциированный

антиген представляет собой человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G). В других вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой простатспецифический мембранный антиген (PSMA). В других вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой дельта-подобный белок 3 (DLL3). В других вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или изотип IgG4.

В других вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к уменьшению связывания белка с рецептором Fcγ (FcγR). В других вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая приводит к уменьшению связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-делеции/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S and S228P/F234A/L235A/G236-делеции/G237A/P238S, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

В других вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR.

В других вариантах осуществления по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR, выбирают из группы, состоящей из S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

В других вариантах осуществления FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

В других вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig включают по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни белка.

В других вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полувыведения белка, выбрана из группы, состоящей из H435A,

P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

В других вариантах осуществления белок включает по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig.

В других вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация в домене CH3 константной области Ig выбрана из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, T366L, F405W, K392L, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, T366L/K392L/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, L351Y/Y407V, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

В настоящем описании также предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε по изобретению и фармацевтически приемлемым носителем.

В описании также предложен полинуклеотид, кодирующий белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε по изобретению.

В настоящем описании также предложен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε по изобретению.

В настоящем описании также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε по изобретению.

В настоящем описании также предложен способ получения выделенного белка по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях экспрессии белка и выделение белка, продуцируемого клеткой-хозяином.

В настоящем описании также предложен способ лечения рака у испытуемого, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей выделенное антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, испытуемому, нуждающемуся в этом, для лечения рака. В других вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль. В других вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого,

плоскоклеточный рак, глиому, рак молочной железы, рак почки, неоваскулярное нарушение, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК), рак поджелудочной железы, рак почки, рак уротелия или аденокарциному печени. В других вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) или опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритических клеток (ОБПДК). В других вариантах осуществления антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

В настоящем описании также предложено антиидиотипическое антитело, связывающееся с выделенным белком, содержащим антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε по настоящему описанию.

В настоящем описании также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на CD3ε (SEQ ID NO: 1), причем эпитоп представляет собой прерывающийся эпитоп, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 100, 101 и 102.

В настоящем описании также предложен выделенный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 747, 748, 77, 78, 749, 750, 751, 752, 753 и 754.

В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 747. В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 748. В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 77. В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 78. В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 749. В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 750. В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 751. В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные

последовательности SEQ ID NO: 752. В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 753. В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 754.

В настоящем описании также предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 86.

В настоящем описании также предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 88.

В настоящем описании также предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 90.

В настоящем описании также предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 92.

В настоящем описании также предложен выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 94.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Изложение сущности изобретения, а также последующее подробное описание будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми рисунками. С целью иллюстрации описанных антител и способов в графических материалах представлены примеры осуществления антител и способов; однако антитела и способы не ограничиваются конкретными раскрытыми вариантами осуществления. На графических материалах показано следующее:

На **Фиг. 1А и 1** показано связывание супернатантов гибридомы с первичными Т-клетками человека. Клон UCHT1 применяли в качестве положительного контроля (**Фиг.** 1Б); изотип мышиного IgG1 (mIgG1) использовали в качестве отрицательного контроля.

На **Фиг. 2** показано связывание вариантов scFv антител к CD3, экспрессируемых в E. coli, с CD3.

На **Фиг. 3** показано выравнивание областей VL CD3B815 (SEQ ID NO: 119), CD3W244 (SEQ ID NO: 27), CD3W245 (SEQ ID NO: 28), CD3W246 (SEQ ID NO: 24), CD3W247 (SEQ ID NO: 29) и CD3W248 (SEQ ID NO: 30).

На **Фиг. 4** показаны скорости водородно-дейтериевого обмена, определенные с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS), измеренные

для комплекса CD3W245, связанного с CD3ε человека (CD3ε:CD3W245), или комплекса OKT3, связанного с CD3ε человека (CD3ε:OKT3) (SEQ ID NO: 99, который представляет собой показанный фрагмент SEQ ID NO: 5). Одинарным подчеркиванием обозначены сегменты со снижением уровней дейтерирования на 10–30%, а двойным подчеркиванием — сегменты со снижением уровней дейтерирования на >30% в присутствии антитела по сравнению с присутствием только CD3ε.

На **Фиг. 5** показано выравнивание последовательностей доменов VH mu11B6, hu11B6, KL2B357, KL2B358, KL2B359, KL2B360, HC3 и HCG5. На Фиг. 5 показаны SEQ ID NO 126, 124, 132, 134, 136, 132, 128 и 130, соответственно, по порядку.

На **Фиг. 6** показано выравнивание последовательностей доменов VL mu11B6, hu11B6, KL2B357, KL2B358, KL2B359, KL2B360, LDC6 и LCB7. На Фиг. 6 описаны SEQ ID NO 127, 125, 133, 135, 135, 135, 129 и 131, соответственно, по порядку.

На **Фиг. 7** показаны связывающие эпитопы выбранных антител к hK2, сопоставленных с последовательностью антигена hK2. На Фиг. 7 показаны SEQ ID NO: 745, 741, 741, 741, 741 и 741, соответственно, по порядку.

На **Фиг. 8А** показана целевая цитотоксичность in vitro биспецифических молекул к KL2BxCD3, измеренная с помощью системы визуализации incuCyte в режиме реального времени для количественной оценки гибели клеток-мишеней.

На **Фиг. 8Б** показана целевая цитотоксичность in vitro биспецифических молекул к KL2BxCD3, измеренная с помощью флуоресцентного реагента каспазы 3/7 для измерения сигнала апоптоза при гибели клеток-мишеней.

На **Фиг. 9А** показана активация и пролиферация Т-клеток in vitro с помощью биспецифических антител KLK2xCD3 путем демонстрации частоты CD25-положительных клеток при разных дозах.

На **Фиг. 9Б** показана активация и пролиферация Т-клеток in vitro с помощью биспецифических антител KLK2xCD3 путем демонстрации частоты клеток, попадающих в гейт пролиферации.

На **Фиг. 10А** показано высвобождение INF-γ Т-клетками in vitro с помощью биспецифических антител KLK2xCD3.

На **Фиг. 10Б** показано высвобождение TNF-α Т-клетками in vitro с помощью биспецифических антител KLK2xCD3.

На **Фиг. 11 (11A–11E)** показан связывающий паратоп выбранных антител к hK2 и выбранных биспецифических антител к hK2/CD3. Подчеркнутые последовательности указывают на области CDR, а выделенные последовательности указывают на области

паратопов. На Фиг. 11А показаны SEQ ID NO 219–220, соответственно, по порядку. На Фиг. 11Б показаны последовательности SEQ ID NO:213 и 224, соответственно, по порядку. На Фиг. 11В показаны последовательности SEQ ID NO:208 и 215, соответственно, по порядку. На Фиг. 11Г показаны последовательности SEQ ID NO:742 и 743, соответственно, по порядку. На Фиг. 11Д показаны последовательности SEQ ID NO:327 и 221, соответственно, по порядку. На Фиг. 11Е показаны последовательности SEQ ID NO:329 и 222, соответственно, по порядку.

На **Фиг. 12** показана способность v-областей связывать рекомбинантный HLA-G после термообработки при форматировании в виде scFv.

На **Фиг. 13** показано сопоставление эпитопов выбранных антител на HLA-G (SEQ ID NO: 691) с применением ЖХ-МС на основе водородно-дейтериевого обмена. Показанная последовательность представляет собой фрагмент SEQ ID NO: 691, с нумерацией аминокислотных остатков, начиная с первого остатка зрелого HLA-G (показаны остатки 183–274). На Фиг. 13 представлена SEQ ID NO: 746, 746, 744 и 744, соответственно, по порядку.

На **Фиг. 14А–14Б** показано усиление опосредованной NK-клетками цитотоксичности клеток K562-HLA-G за счет вариабельной области, полученной из MHGB665, сконструированной либо на IgG1 (MHGB665), либо на IgG4 (MHGB523). На **Фиг. 14А** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NKL; на **Фиг. 14Б** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NK-92.

На **Фиг. 15А–15Б** показано усиление опосредованной клетками NK цитотоксичности клеток K562-HLA-G за счет вариабельной области, полученной из MHGB669, сконструированной либо на IgG1 (MHGB669), либо на IgG4 (MHGB526). На **Фиг. 15А** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NKL; на **Фиг. 15Б** показана клеточно-опосредованная цитотоксичность NK-92.

На **Фиг. 16А–16Б** показано усиление опосредованной клетками NK цитотоксичности клеток K562-HLA-G за счет вариабельной области, полученной из MHGB688, сконструированной либо на IgG1 (MHGB688), либо на IgG4 (MHGB596). На **Фиг. 16А** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NKL; на **Фиг. 16Б** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NK-92.

На **Фиг. 17А–17Б** показано усиление опосредованной клетками NKи цитотоксичности клеток K562-HLA-G за счет вариабельной области, полученной из MHGB694, сконструированной либо на IgG1 (MHGB694), либо на IgG4 (MHGB616).

На **Фиг. 17А** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NKL; на **Фиг. 17Б** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NK-92.

На **Фиг. 18А–18Б** показано усиление опосредованной клетками NK цитотоксичности клеток K562-HLA-G за счет вариабельной области, полученной из MHGB687, сконструированной либо на IgG1 (MHGB687), либо на IgG4 (MHGB585). На **Фиг. 18А** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NKL; на **Фиг. 18Б** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NK-92.

На **Фиг. 19А–19Б** показано усиление опосредованной клетками NK цитотоксичности клеток K562-HLA-G за счет вариабельной области, полученной из MHGB672, сконструированной либо на IgG1 (MHGB672), либо на IgG4 (MHGB508). На **Фиг. 19А** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NKL; на **Фиг. 19Б** показана цитотоксичность, опосредованная клетками NK-92.

На **Фиг. 20** показана активность ADCC в отношении клеток JEG-3, опосредованная выбранными антителами MHGB665 (B665), MHGB669 (B669), MHGB672 (B672), MHGB682 (B682), MHGB687 (B687) и MHGB688 (B688).

На **Фиг. 21А–21Б** показана активность ADCC выбранных антител.

На **Фиг. 21B–21D** показана активность CDC выбранных антител.

На **Фиг. 22А–22Б** показана цитотоксичность HC3B125 в отношении экспрессирующих HLA-G опухолевых клеток HUP-T3 и % активации Т-клеток.

На **Фиг. 22В–22Г** показана цитотоксичность HC3B125 в отношении экспрессирующих HLA-G опухолевых клеток RERF-LC-Ad-1 и % активации Т-клеток.

На **Фиг. 23** показана цитотоксичность HC3B258 и HC3B125 в отношении клеток RERF-LC-Ad-1; соотношения эффектор (Т-клетка) : мишень (RERF-LC-Ad1) составляли 1:3, 1:1 или 3:1, как указано.

На **Фиг. 24А–24Б** показаны групповые средние объемы опухолей (17A) и индивидуальные объемы опухолей в сутки 27 установленного панкреатического PDX у мышей NSG-SGM3 с гуманизированными клетками $CD34^+$, получавших либо контроль (HLA-G × Null), либо HCB125.

На **Фиг. 25** показаны групповые средние объемы опухолей привитых ксенотрансплантатов Hup-T3 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG, получавших либо контроль (CD3 × Null), либо HCB125.

На **Фиг.** 26А и 26Б показано связывание клеток биспецифических антител к DLL3 × CD3 с опухолевыми клеточными линиями $DLL3^+$. На **Фиг.** 26А показано связывание клеток биспецифических антител к DLL3 × CD3 с опухолевыми

клеточными линиями DLL3$^+$, клетками SHP77. На **Фиг.** 26Б показано связывание клеток биспецифических антител к DLL3 × CD3 с опухолевыми клеточными линиями DLL3$^+$, клетками HCC1833.

На **Фиг.** 27 показано связывание биспецифических антител к DLL3 × CD3 с пан-Т-клетками человека с применением FACS.

На **Фиг.** 28А и 28Б показана *in vitro* целевая цитотоксичность биспецифических антител к DLL3 × CD3, измеренная системой визуализации incuCyte в режиме реального времени для количественной оценки гибели клеток-мишеней. На **Фиг.** 28А показана *in vitro* целевая цитотоксичность биспецифических молекул антител DLL3 × CD3, измеренная системой визуализации incuCyte в режиме реального времени для количественной оценки гибели клеток-мишеней. Выделенные пан-Т-клетки совместно инкубировали с клетками DLL3$^+$ SHP77 в присутствии биспецифических антител к DLL3×CD3 в течение 120 часов. На **Фиг.** 28Б показана целевая цитотоксичность *in vitro* биспецифических молекул антител DLL3 × CD3, измеренная системой визуализации incuCyte в режиме реального времени для количественной оценки гибели клеток-мишеней. Выделенные клетки пан-Т совместно инкубировали с клетками DLL3$^-$HEK293 в присутствии биспецифических антител к DLL3×CD3 в течение 120 часов.

На **Фиг.** 29 показано высвобождение IFN-γ Т-клеток *in vitro* биспецифическими антителами к DLL3 × CD3. Концентрацию IFN-γ измеряли в супернатантах, собранных в указанные моменты времени.

На **Фиг.** 30А-30В показана цитотоксичность в отношении линий клеток-мишеней DLL3$^+$ в PBMC, опосредованная биспецифическими антителами к DLL3 × CD3. На **Фиг.** 30А показана цитотоксичность в отношении линий клеток-мишеней DLL3$^+$ в PBMC, опосредованная биспецифическими антителами к DLL3 × CD3 с соотношением E:T 10:1. На **Фиг.** 30Б показана цитотоксичность в отношении линий клеток-мишеней DLL3$^+$ в PBMC, опосредованная биспецифическими антителами к DLL3 × CD3 с соотношением E:T 5:1. На **Фиг.** 30В показана цитотоксичность в отношении линий клеток-мишеней DLL3$^+$ в PBMC, опосредованная биспецифическими антителами к DLL3 × CD3 с соотношением E:T 1:1.

На **Фиг.** 31 показана пролиферация CD3$^+$ Т-клеток в ответ на биспецифические антитела к DLL3 × CD3 в анализе цитотоксичности целых PBMC.

На **Фиг.** 32А–32В показана активация Т-клеток в ответ на биспецифические антитела к DLL3 × CD3. На **Фиг.** 32А показана активация Т-клеток в ответ на %CD25$^+$

клеток биспецифических антител к DLL3 × CD3. На **Фиг.** 32Б показана активация Т-клеток в ответ на %$CD69^+$ клеток биспецифических антител к DLL3 × CD3. На **Фиг.** 32В показана активация Т-клеток в ответ на %$CD71^+$ клеток биспецифических антител к DLL3 × CD3.

На **Фиг.** 33А–33Б показаны характеристики оптимизированного биспецифического антитела к DLL3 × CD3. На **Фиг.** 33А показан опухолевый лизис биспецифических антител к DLL3 × CD3 с оптимизированной последовательностью антител DLL3 и без нее, оцененный в анализе цитотоксичности на основе IncuCyte. На **Фиг.** 33Б показано, что изолированные пан-Т-клетки совместно инкубировали с клетками $DLL3^+$ SHP77 в присутствии биспецифических антител, перенаправляющих DLL3/Т-клетки, в течение 120 часов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Все публикации, включая, без ограничений, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в данном документе.

Следует понимать, что применяемые в данном документе термины предназначены только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Все применяемые в данном документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное обычному специалисту в области, к которой относится изобретение.

В данном документе описаны иллюстративные способы и материалы, хотя при практическом осуществлении для проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут применяться следующие термины.

В случае представления списка, если не указано иное, следует понимать, что каждый отдельный элемент этого списка и каждая комбинация из этого списка является отдельным вариантом осуществления. Например, список вариантов осуществления, представленный в виде **«A, B или C»**, следует интерпретировать как список, включающий варианты осуществления «A», «B», «C», «A или B», «A или C», «B или C» или «A, B или C».

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание

текста четко не указывает на иное. Так, например, ссылка на «клетку» включает комбинацию двух или более клеток и т. п.

Переходные термины **«содержащий»**, **«состоящий по существу из»** и **«состоящий из»** предназначены для обозначения их по существу общепринятых патентных значений; т. е. (i) термин «содержащий», который является синонимом терминам «включающий», «содержащий» или «характеризующийся», является включающим или неограниченным и не исключает дополнительные, неуказанные элементы или стадии способа; (ii) термин «состоящий из» исключает любые элемент, стадию или ингредиент, не указанные в пункте формулы изобретения; и (iii) термин «состоящий преимущественно из» ограничивает объем пункта формулы изобретения конкретными материалами или этапами «и теми, которые не оказывают существенного влияния на основную(ые) и новую(ые) характеристику(и)» заявленного изобретения. Варианты осуществления, описанные в отношении фразы «содержащий» (или его эквивалентов), обеспечивают такое же значение, как варианты осуществления, описанные независимо друг от друга в отношении фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из».

Термин **«около»** означает «в пределах приемлемого диапазона ошибки» для конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области, причем ошибка отчасти зависит от того, каким образом измерено или определено это значение, т. е. от ограничений системы измерения. Если в примерах или в других разделах настоящего описания в контексте конкретного анализа, результата или варианта осуществления явным образом не указано иное, термин «около» означает «в пределах одного среднеквадратичного отклонения» в соответствии с практикой, принятой в данной области, или «в диапазоне до 5%», в зависимости от того, что больше.

Термин «**активация**» или «**стимуляция**» или «**активированный(-ая, -ые)**» или «**стимулированный(-ая, -ые)**» относится к индукции изменения биологического состояния клетки, что приводит к экспрессии маркеров активации, продукции цитокинов, пролиферации или опосредованной цитотоксичности клеток-мишеней; Клетки могут активироваться первичными стимулирующими сигналами. Костимулирующие сигналы могут усиливать величину первичных сигналов и подавлять гибель клеток после начальной стимуляции, что приводит к более продолжительному состоянию активации и, таким образом, более высокой цитотоксической способности. Термин «**костимулирующий сигнал**» относится к

сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации и/или активации Т-клеток и/или NK-клеток и/или повышению или понижению экспрессии ключевых молекул.

Термин «**альтернативный каркас**» относится к одноцепочечному белковому каркасу, который содержит структурированную сердцевину, связанную с вариабельными доменами с высокой конформационной толерантностью. Вариабельные домены допускают изменение, внесенное без ущерба для целостности каркаса, и, следовательно, вариабельные домены можно конструировать и выбирать для связывания со специфическим антигеном.

Термин «**антителозависимая клеточная цитотоксичность**», **«антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность»** или «**ADCC**» относится к механизму индукции гибели клеток, которая зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например, естественными клетками-киллерами (NK), моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством гамма-рецепторов Fc (FcγR), экспрессирующихся на эффекторных клетках.

Термин «**антителозависимый клеточный фагоцитоз**» или **ADCP** относится к механизму уничтожения покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки.

Термин «**антиген**» обозначает любую молекулу (например, белок, пептид, полисахарид, гликопротеин, гликолипид, нуклеиновую кислоту, их части или их комбинации), способную связываться с антигенсвязывающим доменом или Т-клеточным рецептором, который способен опосредовать иммунный ответ. Примеры иммунных ответов включают в себя выработку антител и активацию иммунных клеток, таких как Т-клетки, В-клетки или NK-клетки. Антигены могут экспрессироваться генами, синтезироваться или быть полученными путем очистки из биологических образцов, таких как образец ткани, образец опухоли, клетка или жидкость с помощью других биологических компонентов, организмов, субъединиц белков/антигенов, убитых или инактивированных цельных клеток или лизатов.

«**Антигенсвязывающий фрагмент**» или «**антигенсвязывающий домен**» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают части иммуноглобулина, которые связывают антиген,

такие как VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, вариабельные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, VHH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, альтернативные каркасы, которые связывают антиген, и мультиспецифические белки, содержащие антигенсвязывающие фрагменты. Антигенсвязывающие фрагменты (такие как VH и VL) могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одиночных антител, в которых домены VH/VL можно объединять в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными цепями с образованием моновалентного антигенсвязывающего домена, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело. Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть конъюгированы с другими антителами, белками, антигенсвязывающими фрагментами или альтернативными каркасом, которые могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими для конструирования биспецифических и мультиспецифических белков.

Термин **«антитела»** подразумевается в широком значении и включает молекулы иммуноглобулинов, в том числе моноклональные антитела, включая мышиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, например биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и т. п. антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. «Полноразмерные антитела» состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области (VL) легкой цепи и константной области (CL) легкой цепи. Области VH и VL можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL

состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от амино- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам — IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно, каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин **«биспецифический»** относится к молекуле (такой как белок или антитело), которая специфически связывается с двумя разными антигенами или двумя разными эпитопами в пределах одного антигена. Биспецифическая молекула может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca cynomolgus* (яванский макак, крабоед) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин «**биспецифическое антитело к hK2/CD3**», «**антитело к hk2/CD3**», «**антитело hk2xCD3**», «**антитело к hK2/антитело к CD3 белку» и** т. д. относится к антителу, которое связывает hk2 и CD3, и содержит по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий hK2, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие hK2 и CD3, как правило, представляют собой пары V_H/V_L. Биспецифическое антитело к hk2×CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с hk2, или с CD3.

Термин «**биспецифическое антитело к HLA-G/CD3**», «**антитело к HLA-G/CD3**», «**антитело HLA-GxCD3**», «**антитело к HLA-G/антитело к CD3 белку» и** т. д. относится к антителу, которое связывает HLA-G и CD3, и содержит по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий HLA-G, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие HLA-G и CD3, как правило, представляют собой пары V_H/V_L. Биспецифическое антитело к HLA-G×CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с HLA-G, или с CD3.

Термин **«биспецифическое антитело к DLL3/CD3», «антитело DLL3 × CD3», «антитело DLL3/CD3», «антитело DLL3xCD3», «антитело к DLL3/антитело к CD3 белку»** и т. д. относится к антителу, которое связывает DLL3 и CD3 и которое

содержит по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий DLL3, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие DLL3 и CD3, как правило, представляют собой пары V_H/V_L. Биспецифическое антитело к DLL3×CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с DLL3, или с CD3.

Термин **«рак»** обозначает широкую группу различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом ненормальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводят к образованию злокачественных опухолей, которые прорастают в соседние ткани и могут также метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровоток. «Рак» или «раковая ткань» может включать опухоль.

«**Кластер дифференциации 3 ε**» или «**CD3ε**» относится к известным белкам, который также называют «эпсилон-цепью CD3 гликопротеина поверхности Т-клетки» или «T3E». CD3ε, вместе с CD3-гамма, -дельта и -дзета, а также гетеродимерами Т-клеточных рецепторов альфа/бета и гамма/дельта, образуют комплекс Т-клеточный рецептор - CD3. Этот комплекс играет важную роль в связывании распознавания антигена с несколькими внутриклеточными путями сигнальной трансдукции. Комплекс CD3 опосредует трансдукцию сигнала, что приводит к активации Т-клеток и пролиферации. Для иммунного ответа необходим CD3. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого CD3ε приведена в SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена (ECD) CD3ε приведена в SEQ ID NO: 2. В настоящем описании термин «Cd3ε-специфичны» или «специфически связывается с CD3ε» или «антитело к CD3ε» относится к антителам, которые специфически связываются с полипептидом CD3ε (SEQ ID NO: 1), включая антитела, которые специфически связываются с внеклеточным доменом CD3ε (ECD) (SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NO: 1 (CD3-эпсилон человека)

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP
GSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYL
YLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAG
GRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI

SEQ ID NO: 2 (внеклеточный домен CD3-эпсилон человека)

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIG
SDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD

Термин «**комплемент-зависимая цитотоксичность**» или «**CDC**», относится к механизму индукции гибели клеток, в рамках которого эффекторный домен Fc связанного с мишенью антитела связывает и активирует компонент комплемента C1q, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к осаждению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, что способствует КЗЦ посредством связывания рецепторов комплемента (например, CR3) на лейкоцитах.

Термин «**определяющие комплементарность области**» (CDR) относится к области антител, которые связывают антиген. Существуют три CDR в области VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три CDR в области VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3). CDR можно определить с помощью различных схем, например, по Кэботу (Wu et al. (1970) J Exp Med 132: 211–50; Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia et al. (1987) J Mol Biol 196: 901–17), IMGT (Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55–77) и AbM (Martin and Thornton J Bmol Biol 263: 800–15, 1996). Описано соответствие между различными системами разграничения и нумерациями вариабельных областей (см., например, Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55–77; Honegger and Pluckthun, J Mol Biol (2001) 309:657–70; база данных International ImMunoGeneTics (IMGT); Веб-ресурсы (например, их можно получить из Интернета по адресу <URL: http://www.imgt.org>)). Для разметки CDR можно использовать доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC. Используемые в данном документе термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, в соответствии с Kabat, Chothia, IMGT или AbM, если в описании явным образом не указано иное.

Термин «**уменьшение**», «**более низкий**» «**уменьшать**», «**снижать**» или «**угнетать**» относится по существу к способности тестируемой молекулы опосредовать сниженный ответ (*т. е.,* эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, который опосредован контролем или носителем. Иллюстративные ответы представляют собой размножение Т-клеток, активацию Т-клеток или опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток или связывание белка с его антигеном или рецептором, усиленное связывание с Fcγ или улучшенными эффекторными функциями Fc, такими как улучшенная ADCC, CDC и/или ADCP. Уменьшение может представлять собой статистически значимое различие в измеренном ответе между тестовой

молекулой и контролем (или носителем) или снижением измеренного ответа, например, уменьшением в около 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 раз или более, например, в 500, 600, 700, 800, 900, 1000 раз или более (включая все целые числа и десятичные точки в интервале между и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.).

Термин «**дифференциация**» относится к способу уменьшения потенциала или пролиферации клетки или переходу клетки в состояние, более ограниченное с точки зрения развития.

«**Дельта-подобный белок 3**» или «**DLL3**» относится к известному белку, который также называют дельта-подобным 3, дельта-3 или дельта-гомологом 3 дрозофилы. Если не указано иное, в настоящем документе DLL3 относится к DLL3 человека. Все изоформы и варианты DLL3 включены в термин «DLL3». Аминокислотные последовательности различных изоформ можно получить из номеров доступа к NCBI NP_058637.1 (предшественник изоформы 1, 618 аминокислот) и NP_982353.1 (предшественник изоформы 2, 587 аминокислот). Аминокислотная последовательность полноразмерного DLL3 приведена в SEQ ID NO:255. Последовательность DLL3 включает домен DSL (остатки 176–215), домен EGF-1 (остатки 216–249), домен EGF-2 (остатки 274–310), домен EGF-3 (остатки 312–351), домен EGF-4 (остатки 353–389), домен EGF-5 (остатки 391–427) и домен EGF-6 (остатки 429–465).

>**SEQ ID NO:716** (предшественник изоформы 1 дельта-подобного белка 3 NP_058637.1 [Homo sapiens])

MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARLP
CRLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFR
DAWPGTFSFIIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWE
LRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPE
HGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCAN
GGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPP
GFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRA
CANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVCA
CAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAAL
LLVHVRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSVDWNRPE
DVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHTGRAGQRQHLLFPYPSSILSVK

Термин «**кодировать**» или «**кодирующий**» относится к свойству, присущему конкретным последовательностям нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК

или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК), или определенной последовательности аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут называться кодирующими белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Термин «**усилить**», «**активировать**», «**увеличить**», «**расширить**» или «**улучшить**» относится по существу к способности исследуемой молекулы опосредовать более высокий ответ (*т. е.,* эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, который опосредован контролем или носителем. Иллюстративные ответы представляют собой размножение Т-клеток, активацию Т-клеток или опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток или связывание белка с его антигеном или рецептором, усиленное связывание с Fcγ или улучшенными эффекторными функциями Fc, такими как улучшенная ADCC, CDC и/или ADCP. Усиление может представлять собой статистически значимое различие в измеренном ответе между исследуемой молекулой и контролем (или носителем) или повышением измеренного ответа, например, повышением в около 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 раз или более, например, в 500, 600, 700, 800, 900, 1000 раз или более (включая все целые числа и десятичные точки в интервале между и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.).

Термин «**эпитоп**» означает часть антигена, с которым специфически связывается антитело, или его антигенсвязывающая часть. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, формирующих конформационное пространственное звено. В случае прерывающегося эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-

мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка. «Эпитоп» антитела зависит от методологии, применяемой для выявления эпитопа.

Термин «**рост**» обозначает результат деления и гибели клеток.

Термин «**экспрессировать**» и «**экспрессия**» относится к хорошо изученной транскрипции и трансляции, происходящей в клетках или *in vitro*. Таким образом, продукт экспрессии, *например* белок, экспрессируется клеткой или *in vitro* и может представлять собой внутриклеточный, внеклеточный или трансмембранный белок.

Термин **«экспрессионный вектор»** относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин «**dAb**» или «**фрагмент dAb**» относится к фрагменту антитела, состоящего из домена VH (Ward et al., Nature 341:544 546 (1989)).

Термин «**Fab**» или «**Fab-фрагмент**» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH, CH1, VL и CL.

Термин «**F(ab')$_2$**» или «**F(ab')$_2$ фрагмент**» относится к фрагменту антитела, содержащему два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области.

Термин «**Fd**» или «**Fd фрагмент**» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH и CH1.

Термин «**Fv**» или «**Fv-фрагмент**» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH и VL из одного плеча антитела.

«**Полноразмерное антитело**» состоит из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и константного домена тяжелой цепи, состоящей из субдоменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельного домена легкой цепи (VL) и константного домена легкой цепи (CL). VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), между которыми располагаются каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от амино- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Термин «**генетическая модификация**» относится к введению «чужеродного» (*т. е.,* внешнего или внеклеточного) гена, последовательности ДНК или РНК в клетку-хозяина таким образом, чтобы клетка-хозяин экспрессировала введенный ген или последовательность для получения желаемого вещества, обычно белка или фермента, кодируемого введенным геном или последовательностью. Введенный ген или последовательность можно также назвать «клонированным» или «чужеродным» геном или последовательностью, могут включать регуляторные или контрольные последовательности, функционально связанные с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор, такие как последовательность запуска, последовательность остановки, промотор, сигнальная последовательность, секреторная последовательность или другие последовательности, используемые генетическим механизмом клетки. Ген или последовательность могут включать нефункциональные последовательности или последовательности без известной функции. Клетка-хозяин, принимающая и экспрессирующая ДНК или РНК, является «генетически сконструированной». ДНК или РНК, введенная в клетку-хозяин, может поступать из любого источника, включая клетки одного рода или вида, выступающего в качестве клетки-хозяина, или разных родов или видов.

Термин «**гетерологичный**» относится к двум или более полинуклеотидам или двум или более полипептидам, не находящимся в одинаковых отношениях друг к другу в природе.

Термин «**гетерологичный полинуклеотид**» относится к не встречающемуся в природе полинуклеотиду, который кодирует два или более неоантигенов, как описано в настоящем документе.

Термин «**гетерологичный полипептид**» относится к не встерчающемуся в природе полипептиду, содержащему два или более неоантигенных полипептида, как описано в настоящем документе.

Термин «**клетка-хозяин**» обозначает любую клетку, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. Типичная гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой вектор (*например*, вектор экспрессии).

Термин **«человеческое антитело»** относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Вариабельные области человеческого антитела получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Если антитело содержит константную область или часть константной области, константную область также

получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области человеческие антитела получены из системы, в которой используют иммуноглобулин зародышевой линии человека или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. «Человеческое антитело», как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения человеческих антител и локусов человеческих иммуноглобулинов, внедрения соматических мутаций, намеренного введения замен в каркасные участки и/или CDR, или и то и другое. Как правило, «человеческое антитело» по аминокислотной последовательности на по меньшей мере около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой генами иммуноглобулина зародышевой линии человека или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57–86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385–96 и международной публ. пат. № WO2009/085462. Антитела, в которых по меньшей мере одна CDR получена от видов, отличных от человека, не подходят под определение человеческого антитела.

Термин **«гуманизированное антитело»** относится к антителу, в котором по меньшей мере одна CDR получена из отличного от человека вида, и по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Выражение «**в комбинации с**» означает, что два или более терапевтических агента вводят испытуемому вместе в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

Термин «**внутриклеточный сигнальный домен**» или «**цитоплазматический сигнальный домен**» обозначает внутриклеточную часть молекулы. Именно функциональный участок белка действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути, генерируя вторичные мессенджеры или действуя как эффекторы, отвечая на такие мессенджеры. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который вызывает иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей CAR, например, CAR-T-клетки.

Термин «**выделенный**» относится к однородной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды или полипептиды), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин «выделенное» относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает молекулы, которые выделены с большей чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистотой.

Термин «**родственная калликреину пептидаза 2**» «**hK2**» относится к изученному белку, который также называется калликреином-2, эндокринным калликреином-2 или hK2. hK2 получают в виде препропротеина и расщепляют во время протеолиза для получения активной протеазы. Все изоформы и варианты hK2 включены в термин «hK2». Аминокислотные последовательности различных изоформ извлекают из номеров доступа в GenBank NP_005542.1, NP_001002231.1 и NP_001243009. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого hK2 приведена в SEQ ID NO: 98. Последовательность включает сигнальный пептид (остатки 1–18) и пропептидную область (остатки 19-24).

SEQ ID NO: 98

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCG
GVLVHPQWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLK
HQSLRPDEDSSHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEF
LRPRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPLVCNG
VLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP

«**Человеческий лейкоцитарный антиген G**» или «**HLA-G**» относится к известному белку, который также называют «антигеном гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепью G» или «антигеном G MHC класса I». Все изоформы и варианты HLA-G включены в «HLA-G». Аминокислотные последовательности различных изоформ извлекают из идентификационных номеров Uniprot от P17693-1 до P17693-7. SEQ ID NO: 691 представляет типовую изоформу HLA-G, обозначенную как HLA-G1.

HLA-G1 (сигнальная последовательность: курсив), SEQ ID NO: 691:

*MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWA*GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDD TQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYY NQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAA QISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFD YEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSG EEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVLAAVVTGAAVAAVLW RKKSSD

Термин «**модулировать**» относится либо к повышенной, либо пониженной способности исследуемой молекулы опосредовать усиленный или сниженный ответ (*т. е.* эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, опосредованным контрольным образцом или несущей средой.

Термин **«моноклональное антитело»** относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т. е. отдельных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или дезамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или дезамидирование глутамина. Моноклональные антитела, как правило, связывают один антигенный эпитоп. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

Термин «**мультиспецифический**» относится к молекуле, например, антителу, которая специфически связывается с двумя или более разными антигенами или двумя или более разными эпитопами в пределах одного антигена. Мультиспецифическая молекула может иметь перекрестную реактивность с другими родственными

антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термины «**клетка-натуральный киллер**» и «**NK-клетка**» используются взаимозаменяемо и являются синонимами в настоящем документе. Термин «NK-клетка» относится к дифференцированному лимфоциту с фенотипом $CD16^+$ $CD56^+$ и/или $CD57^+$ TCR^-. NK-клетки характеризуются способностью связываться с клетками, которые не экспрессируют «собственные» антигены MHC/HLA, и уничтожать их путем активации специфических цитолитических ферментов, способностью уничтожать опухолевые клетки или другие пораженные клетки, которые экспрессируют лиганд для рецепторов, активирующих NK-клетки, а также способностью высвобождать молекулы белка, называемые цитокинами, которые стимулируют или ингибируют иммунный ответ.

Термин «**функционально связанный**» и аналогичные фразы, при их использовании в отношении нуклеиновых кислот или аминокислот, относятся к фактической связи последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотной последовательности, соответственно, в функциональных отношениях друг с другом. Например, функционально связанный промотор, энхансер, открытая рамка считывания, 5-штрих и 3-штрих нетранслируемая область (UTR) и последовательности терминации приводят к точной продукции молекулы нуклеиновой кислоты (например, РНК) и в некоторых случаях к продукции полипептида (т. е., экспрессии открытой рамки считывания). Функционально связанный пептид относится к пептиду, в котором функциональные домены пептида размещены на соответствующем расстоянии друг от друга для того, чтобы наделить каждый домен предполагаемой функцией.

Термин «**паратоп**» относится к участку или области молекулы антитела, которые участвуют в связывании антигена и содержат остатки, взаимодействующие с антигеном. Паратоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, формирующих конформационное пространственное звено. Паратоп для данного антитела может быть определен и охарактеризован на разных уровнях детализации с использованием различных экспериментальных и вычислительных способов. Экспериментальные способы включают масс-спектрометрию с водородно-дейтериевым обменом (HX-MS). Паратоп будет определяться по-разному в зависимости от используемого способа сопоставления.

Термин «**фармацевтическая комбинация**» обозначает комбинацию двух или более активных ингредиентов, вводимых либо вместе, либо отдельно.

Термин «**фармацевтическая композиция**» относится к композиции, которая получается при комбинации активного ингредиента и фармацевтически приемлемого носителя.

Термин **«фармацевтически приемлемый носитель»** или «эксципиент» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, за исключением активного ингредиента, который нетоксичен для испытуемого. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают в себя буфер, стабилизатор или консервант.

Термин **«полинуклеотид»** или «**нуклеиновая кислота**» относится к синтетической молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. кДНК является типичным примером полинуклеотида. Полинуклеотид может представлять собой ДНК или молекулу РНК.

Термины «**предотвращать**», «**предотвращение**», «**предупреждение**» или «**профилактика**» заболевания или расстройства означают предотвращение возникновения у испытуемого расстройства.

Термин «**пролиферация**» относится к увеличению деления клеток, симметричному или асимметричному разделению клеток.

Термин «**промотор**» обозначает минимальные последовательности, необходимые для инициации транскрипции. Промотор также может включать энхансеры или репрессоры, которые усиливают или подавляют транскрипцию, соответственно.

Термин **«белок»** или **«полипептид»** используется взаимозаменяемо в настоящем документе и относится к молекуле, которая содержит один или более полипептидов, каждый из которых состоит из по меньшей мере двух аминокислотных остатков, связанных пептидной связью. Белок может представлять собой мономер или белковый комплекс двух или более субъединиц, причем субъединицы идентичны или отличаются друг от друга. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться «пептидами». Белок может представлять собой гетерологичный слитый белок, гликопротеин или белок, модифицированный посттрансляционными модификациями, такими как фосфорилирование, ацетилирование, миристотилирование, пальмитоилирование, гликозилирование, окисление, формилирование, амидирование, цитруллинирование,

полиглутамилирование, АДФ-рибозилирование, пегилирование или биотинилирование. Белок может представлять собой антитело или может содержать антигенсвязывающий фрагмент антитела. Белок может быть рекомбинантно экспрессированным.

Термин «**рекомбинантный**» относится к полинуклеотидам, полипептидам, векторам, вирусам и другим макромолекулам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами.

Термин «**регуляторный элемент**» относится к любому генетическому элементу, действующему в цис- или транс-положении, который контролирует некоторые аспекты экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот.

Термин «**рецидивирующий**» относится к повторному возникновению заболевания или признаков и симптомов заболевания после периода улучшения после предшествующего лечения терапевтическим средством.

Термин **«рефрактерный»** относится к заболеванию, которое не реагирует на лечение. Рефрактерное заболевание может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения или рефрактерное заболевание может стать устойчивым во время лечения.

Термин «**одноцепочечный Fv**» или «**scFv**» относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, включающего вариабельную область легкой цепи (VL), и по меньшей мере один фрагмент антитела, включающий вариабельную область тяжелой цепи (VH), причем VL и VH непрерывно соединены посредством полипептидного линкера и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида. Если не указано иное, в контексте данного документа scFv может иметь вариабельные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-терминального и С-терминального концов полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

Фрагменты «**$(scFv)_2$**» или «**тандемный scFv**», или «**бис-scFv**» представляют собой слитый белок, содержащий две вариабельные области легкой цепи (VL) и две вариабельные области тяжелой цепи (VH), причем две VL и две VH непрерывно связаны посредством полипептидных линкеров и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида. Две VL и две VH, сшитые пептидными линкерами, образуют двухвалентную молекулу VL_A-линкер-VH_A-линкер-VL_B-линкер-VH_B с образованием двух сайтов связывания, способных одновременно связываться с двумя разными антигенами или эпитопами.

Термины «**специфически связывается**», **«специфическое связывание»**, **«специфически связывает»** или **«связывает»** относятся к связыванию белковой

молекулы с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем у других антигенов. Как правило, белковая молекула связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации (K_D) около 1×10^{-7} М или менее, например около 5×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее или около 1×10^{-12} М или менее, как правило, со значением K_D, которое по меньшей мере в сто раз ниже его значения K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). В контексте неоантигенов предстательной железы, описанных в настоящем документе, термин «специфическое связывание» относится к связыванию белковой молекулы с неоантигеном предстательной железы без обнаружимого связывания с белком дикого типа, вариантом которого является неоантиген.

Термин **«испытуемый»** включает любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин «не относящееся к человеку животное» включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Термины «индивид» и «пациент» в настоящем документе могут применяться взаимозаменяемо.

Термины «**Т-клетка**» и «**Т-лимфоцит**» являются взаимозаменяемыми и используются в настоящем документе как синонимы. Т-клетка включает тимоциты, наивные Т-лимфоциты, Т-клетки памяти, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, покоящиеся Т-лимфоциты или активированные Т-лимфоциты. Т-клетка может представлять собой клетку Т-хелпер (Th), например Т-хелпер 1 (Th1) или Т-хелпер 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; $CD4^+$ Т-клетку) $CD4^+$ Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; $CD8^+$ Т-клетка), инфильтрирующую опухоль цитотоксическую Т-клетку (TIL; $CD8^+$ Т-клетка), $CD4^+CD8^+$ Т-клетку или любую другую подгруппу Т-клеток. Также включены «NKT-клетки», относящиеся к специализированной популяции Т-клеток, которые экспрессируют полуинвариантный αβ Т-клеточный рецептор, но также экспрессируют различные молекулярные маркеры, которые, как правило, ассоциированы с Nk-клетками, такими как NK1.1. NKT-клетки включают $NK1.1^+$ и $NK1.1^-$, а также клетки $CD4^+$, $CD4^-$, $CD8^+$ и $CD8^-$. TCR на NKT-клетках уникален тем, что он распознает гликолипидные антигены, презентированные подобной ГКГС I молекулой CD Id. NKT-клетки могут иметь как защитные, так и вредные эффекты из-за их способности продуцировать цитокины, которые способствуют воспалению или иммунной

толерантности. Также включены «гамма-дельта-Т-клетки (γδ Т-клетки)», которые относятся к специализированной популяции, а именно к небольшой подгруппе Т-клеток, имеющей на своей поверхности отдельный TCR, и в отличие от большинства Т-клеток, в которых TCR состоит из двух гликопротеиновых цепей, обозначенных как α- и β-цепи TCR, Т-клеточный рецептор в Т-клетках γδ состоит из γ-цепи и δ-цепи. Т-клетки γδ могут играть роль в иммунонадзоре и иммунорегуляции, и было обнаружено, что они являются важным источником IL-17 и индуцируют устойчивый цитотоксический $CD8^+$ Т-клеточный ответ. Также включены «регуляторные Т-клетки» или «Трег», которые относятся к Т-клеткам, которые подавляют аномальный или избыточный иммунный ответ и играют роль в иммунной толерантности. Treg обычно представляют собой Foxp3-положительные $CD4^+$Т-клетки и могут также включать Foxp3-отрицательные регуляторные Т-клетки, которые представляют собой IL-10-продуцирующие $CD4^+$Т-клетки.

Термины «**терапевтически эффективное количество**» или «**эффективное количество**», которые являются взаимозаменяемыми в настоящем документе, относятся к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела испытуемого, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у испытуемого желаемый ответ. Пример показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают в себя, например, улучшение состояния здоровья пациента, сокращение размера опухоли, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие участки организма.

Термин «**трансдукция**» относится к введению чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку с использованием вирусного вектора.

Термины «**лечить**», «**лечение**» или «**терапия**» заболевания или расстройства, такого как рак, относятся к достижению одной или более следующих целей: уменьшение тяжести и/или продолжительности расстройства, замедление нарастания выраженности симптомов, характерных для этого расстройства, ограничение или предотвращение рецидива расстройства у испытуемых, которые ранее страдали расстройством, либо ограничение или предотвращение рецидива симптомов у испытуемых с ранее проявлявшимися симптомами расстройства.

Термин «**опухолевая клетка**» или «раковая клетка» относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке, либо *in vivo*, *ex vivo*, либо в культуре тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя трансформация может быть вызвана инфекцией от трансформирующего вируса и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты, поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты или она может также возникать спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Трансформация/рак проявляются в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, модулировании уровней маркера, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли у приемлемых животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т. п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*.

Термины «**вариант**», «**мутант**» или «**измененный**» относятся к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или несколькими модификациями, например, одной или несколькими заменами, вставками или делециями.

Нумерация аминокислотных остатков в константной области антитела в тексте описания приведена в соответствии с каталогом EC, как описано в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), если явно не указано иное.

Мутации в константных областях Ig называются следующим образом: L351Y_F405A_Y407V относятся к мутациям L351Y, F405A и Y407V в одной константной области иммуноглобулина. L351Y_F405A_Y407 V/T394W относится к мутациям L351Y, F405A и Y407 V в первой константной области Ig, а мутации T394W — во второй константной области Ig, которые присутствуют в одном мультимерном белке.

«VHH» относится к однодоменному антителу или нанотелу, состоящему исключительно из гомодимеров тяжелой цепи. Однодоменное антитело VHH не имеет легкой цепи и домена CH1 тяжелой цепи обычной области Fab.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает ±10% от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом

диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) включает от 0,9% (масс./об.) до 11% (масс./об.). В настоящем документе применение числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

Нумерация аминокислотных остатков в константной области антитела в тексте описания приведена в соответствии с каталогом EC, как описано в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), если явно не указано иное.

Таблица 1. В настоящем документе применяются стандартные одно- и трехбуквенные коды аминокислот

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспартат	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутамат	Glu	E
Глутамин	Gln	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	ДА
Валин	Val	V

Антигенсвязывающие домены, которые связываются с CD3ε.

В описании предложены антигенсвязывающие домены, которые связываются с CD3ε, моноспецифические и мультиспецифические белки, содержащие антигенсвязывающие домены, которые связываются с CD3ε, полинуклеотиды, кодирующие вышеизложенное, векторы, клетки-хозяева и способы получения и применения вышеизложенного. Антигенсвязывающие домены, которые связываются с CD3ε, идентифицированные в настоящем документе, продемонстрировали полезные свойства с точки зрения высокой термостабильности, сниженного риска дезамидирования и сниженной иммуногенности.

В изобретении также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO: 23 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 103. SEQ ID NO: 103 представляют собой аминокислотные последовательности рода VL, охватывающие варианты, демонстрирующие улучшенные свойства, включая высокую термостабильность, сниженный риск дезамидирования и сниженную иммуногенность. Например, положением, сконструированным для снижения риска дезамидирования, был остаток N92 в VL (нумерация остатков с применением последовательности VL CD3B815 SEQ ID NO: 24, в соответствии с нумерацией Кэбот (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)) и положениями, сконструированными для придания сниженной иммуногенности, были обратные мутации от человека к мыши в остатках Y49 и/или L78 (нумерация остатков по Кэботу, с применением CD3B815 VL из SEQ ID NO: 24). Сконструированное положение остатка N92 находилось внутри LCDR3. Даже при мутациях в этом положении антитела сохраняли способность связывать антиген.

В настоящем описании также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 24.

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями

SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно;

SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно; или

SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, содержит

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 26. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 или 86. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 или 88. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 или 90. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 или 92. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 или 94.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой $(scFv)_2$.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит:

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой Fab:

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой $F(ab')_2$.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой Fd:

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой dAb.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой VHH.

scFv, связывающие CD3ε

Любой из доменов VH и VL, идентифицированных в настоящем документе, которые связывают CD3ε, можно конструировать в формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH. Любой из доменов VH и VL, идентифицированных в настоящем документе, также можно использовать для получения $sc(Fv)_2$ структур, таких как VH-линкер-VL-линкер-VL-линкер-VH, VH-линкер-VL-линкер-VH-линкер-VL. VH-линкер-VH-линкер-VL-линкер-VL. VL-линкер-VH-линкер-VH-линкер-VL. VL-линкер-VH-линкер-VL-линкер-VH или VL-линкер-VL-линкер-VH-линкер-VH.

Домены VH и VL, идентифицированные в настоящем документе, могут быть включены в формат scFv, а связывание и термостабильность полученного scFv в отношении CD3ε можно оценить с использованием известных способов. Связывание можно оценить с использованием оборудования ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, ИФА или анализов конкурентного связывания, известных специалистам в данной области. Связывание можно оценить с применением очищенных супернатантов scFv или E. coli или лизированных клеток, содержащих экспрессированный scFv. Измеренное значение аффинности исследуемого scFv к CD3ε может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярности, pH).

Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, KD, Kon, Koff), как правило, проводятся в стандартизированных условиях и с применением стандартизированных буферов. Термостабильность можно оценить путем нагревания исследуемого scFv при повышенных температурах, например, при 50 °C, 55 °C или 60 °C в течение периода времени, например, 5 минут (мин), 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин или 30 мин, и измерения связывания испытываемого scFv к CD3ε. ScFv, сохраняющие сопоставимое связывание с CD3ε по сравнению с образцом ненагретого scFv, называют термостабильными.

В рекомбинантных системах экспрессии линкер представляет собой пептидный линкер и может включать любую природную аминокислоту. Иллюстративные аминокислоты, которые могут быть включены в линкер, представляют собой Gly, Ser Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu, His и The. Линкер должен иметь длину, достаточную для связывания VH и VL таким образом, чтобы они формировали правильную конформацию относительно друг друга, чтобы они сохраняли желаемую активность, такую как связывание с CD3ε.

Линкер может иметь длину около 5–50 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–40 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–35 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–30 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–25 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–20 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину около 15–20 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину около 16–19 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 6 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 7 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 8 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 9 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 10 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 11 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 12 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 13 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 14 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 15 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 16 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 17 аминокислот. В других вариантах

осуществления линкер имеет длину 18 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 19 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 20 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 21 аминокислота. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 22 аминокислоты. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 23 аминокислоты. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 24 аминокислоты. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 25 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 26 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 27 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 28 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 29 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 30 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 31 аминокислота. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 32 аминокислоты. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 33 аминокислоты. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 34 аминокислоты. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 35 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 36 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 37 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 38 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 39 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер имеет длину 40 аминокислот. Иллюстративные линкеры, которые можно использовать, представляют собой богатые Gly линкеры, содержащие Gly и Ser, Gly и Ala линкеры, содержащие Ala и Ser линкеры и другие гибкие линкеры.

Другие последовательности линкеров могут включать участки шарнирной области иммуноглобулина CL или CH1, полученные из тяжелой или легкой цепей иммуноглобулина любого изотипа. В альтернативном варианте осуществления различные небелковые полимеры, включая полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль, полиоксиалкилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, могут найти применение в качестве линкеров. Иллюстративные линкеры, которые можно использовать, приведены в **таблице 2**. Дополнительные линкеры описаны, например, в межд. публ. пат. № WO2019/060695.

Таблица 2. Линкеры.

Название линкера	**Аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO:**
Линкер 1	GGSEGKSSGSGSESKSTGGS	31
Линкер 2	GGGSGGGS	32
Линкер 3	GGGSGGGSGGGS	33
Линкер 4	GGGSGGGSGGGSGGGS	34
Линкер 5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS	35
Линкер 6	GGGGSGGGGSGGGGS	36
Линкер 7	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	37
Линкер 8	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	38
Линкер 9	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	39
Линкер 10	IRPRAIGGSKPRVA	40
Линкер 11	GKGGSGKGGSGKGGS	41
Линкер 12	GGKGSGGKGSGGKGS	42
Линкер 13	GGGKSGGGKSGGGKS	43
Линкер 14	GKGKSGKGKSGKGKS	44
Линкер 15	GGGKSGGKGSGKGGS	45
Линкер 16	GKPGSGKPGSGKPGS	46
Линкер 17	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	47
Линкер 18	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	48
Линкер 19	STAGDTHLGGEDFD	49
Линкер 20	GEGGSGEGGSGEGGS	50
Линкер 21	GGEGSGGEGSGGEGS	51
Линкер 22	GEGESGEGESGEGES	52
Линкер 23	GGGESGGEGSGEGGS	53
Линкер 24	GEGESGEGESGEGESGEGES	54
Линкер 25	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	55
Линкер 26	PRGASKSGSASQTGSAPGS	56
Линкер 27	GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	57
Линкер 28	GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	58
Линкер 29	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	59
Линкер 30	GSGS	60
Линкер 31	APAPAPAPAP	61

Название линкера	**Аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO:**
Линкер 32	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP	62
Линкер 33	AEAAAKEAAAKEAAAAKEAAAAKEAAAAKAAA	63
Линкер 34	GTEGKSSGSGSESKST	64

В других вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к C-концу, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL).

В других вариантах осуществления scFv содержит от N-конца к C-концу VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

В других вариантах осуществления scFv содержит

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 24.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно; или

SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно; или

SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В других вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24.

В других вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27.

В других вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28.

В других вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29.

В других вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 74.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.

Другие антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε

Любой из доменов VH и VL, идентифицированных в настоящем документе, которые связывают CD3ε, также могут быть сконструированы в формате Fab, F(ab')2, Fd или Fv, и их связывание с CD3ε и термостабильность можно оценить с применением анализов, описанных в настоящем документе.

В других вариантах осуществления Fab содержит

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 24.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно;

SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно; или

SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В других вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24.

В других вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27.

В других вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28.

В других вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29.

В других вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1,

LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 24.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно;

SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно; или

SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

В других вариантах осуществления Fv содержит

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 24.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно;

SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно; или

SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В других вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24.

В других вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27.

В других вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28.

В других вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29.

В других вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

В других вариантах осуществления Fd содержит

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23.

В других вариантах осуществления первый домен содержит HCDR1, HCDR1 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно.

В других вариантах осуществления первый домен содержит HCDR1, HCDR1 и HCDR3 с SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно.

В других вариантах осуществления первый домен содержит HCDR1, HCDR1 и HCDR3 с SEQ ID NO: 18, 19 и 20 соответственно.

В других вариантах осуществления Fd содержит VH SEQ ID NO: 23.

Гомологичные антигенсвязывающие домены и антигенсвязывающие домены с консервативными заменами

Варианты антигенсвязывающих доменов, которые связывают CD3ε, входят в объем настоящего изобретения. Например, варианты могут содержать 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 или 29 аминокислотных замен в антигенсвязывающем домене, который связывает CD3ε, VH и/или VL при условии, что варианты сохранят или будут иметь улучшенные свойства по сравнению с исходными антигенсвязывающими доменами. В других вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от антигенсвязывающих доменов, которые связываются с CD3ε по изобретению. В других вариантах осуществления вариация находится в каркасных областях. В других вариантах осуществления варианты формируются путем консервативных замен.

Например, антигенсвязывающие домены, которые связываются с CD3ε, могут содержать замены в положениях остатка Y49, L78 или N92 в VL (нумерация остатков по Кэботу). Консервативные замены можно проводить в любом указанном положении, а полученные варианты антигенсвязывающих доменов, которые связывают CD3ε, исследуют на требуемые характеристики с помощью анализов, описанных в настоящем документе.

Также предложены антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε, содержащие VH и VL, которые по меньшей мере на 80% идентичны

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления идентичность составляет 85%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 90%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 91%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 91%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 92%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 93%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 94%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 94%. В других вариантах осуществления

идентичность составляет 95%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 96%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 97%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 98%. В других вариантах осуществления идентичность составляет 99%.

Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, общих для последовательностей (т. е. % идентичности = число идентичных положений / общее число положений × 100), с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, который необходимо встроить для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Процент идентичности между двумя аминокислотным последовательностями можно определить с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller (*Comput Appl Biosci* 4:11–17 (1988)), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицы массы остатков PAM120, штрафа на длину гэпа 12 и штрафа гэпа 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Needleman and Wunsch (*J Mol Biol* 48:444–453 (1970)), который встроен в программу GAP в пакете программ GCG (можно получить из Интернета по адресу <URL: http://www.gcg.com>), используя либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, а также веса гэпов 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины гэпов 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В других вариантах осуществления вариантные антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε, содержат одну или две консервативные замены в любой из областей CDR, сохраняя при этом желаемые функциональные свойства исходных антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают CD3ε.

Термин «консервативные модификации» означает модификации аминокислот, которые незначительно изменяют или влияют на характеристики связывания антитела, содержащего такие модификации аминокислот. Консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислота заменена аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Классы аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, четко определены и включают аминокислоты с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми

цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидами (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Дополнительно любой нативный остаток в полипептиде может быть замещен аланином, согласно способу, описанному ранее как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan *et al.*, (1988) Acta Physiol Scand Suppl 643:55–67; Sasaki *et al.*, (1988) *Adv Biophys* 35:1–24). Аминокислотные замены в антителах по изобретению могут быть выполнены известными способами, например методом ПЦР-опосредованного мутагенеза (патент США № 4,683,195). Альтернативно библиотеки вариантов можно создавать, например, путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Характеристики полученных вариантов могут быть исследованы с использованием анализов, описанных в настоящем документе.

Способы получения антигенсвязывающего фрагмента, связывающего CD3ε

Антигенсвязывающие домены, которые связываются с CD3ε, предложенные в настоящем изобретении, можно получить с применением различных технологий. Например, для идентификации пар VH/VL, которые связывают CD3ε, можно применять метод гибридом по Колеру и Мильштейну. В методе гибридом мышь или другое животное-хозяина, например хомяка, крысу или курицу, иммунизируют CD3ε человека и/или яванского макака с последующим слиянием спленоцитов от иммунизированных животных с клетками миеломы с использованием стандартных способов с образованием клеток гибридомы. Колонии, возникающие из одиночных клеток иммортализованной гибридомы, можно подвергнуть скринингу на продукцию антител, содержащих антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε, с желательными свойствами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность или ее отсутствие, аффинность к антигену и желаемая функциональность.

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε и которые получают путем иммунизации животных, отличных от человека, могут быть гуманизированы. Примеры методик гуманизации, включая отбор человеческих акцепторных каркасных областей, включают прививание CDR (патент США № 5225539), прививание SDR

(патент США № 6818749), изменение поверхности (Padlan, (1991) *Mol Immunol* 28:489–499), изменение поверхности определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 2010/0261620), адаптацию человеческой каркасной области (патент США № 8,748,356) или супергуманизацию (патент США № 7,709, 226). В этих способах CDR или часть остатков CDR исходных антител переносят в человеческие каркасные области, которые можно отбирать на основании их общей гомологии с исходными каркасными областями, на основании сходства длины CDR или идентичности канонической структуры или их комбинации.

Гуманизированные антигенсвязывающие домены можно дополнительно оптимизировать для улучшения их селективности или аффинности в отношении необходимого антигена посредством включения измененных опорных каркасных остатков для сохранения аффинности связывания (обратных мутаций) такими методиками, которые описаны в международных патентных публикациях № WO1090/007861 и WO1992/22653, или посредством внесения вариации в любую из CDR, например, для улучшения аффинности антигенсвязывающего домена.

Для получения антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают CD3ε, можно применять трансгенных животных, несущих в своем геноме локусы иммуноглобулинов (Ig) человека, таких как мыши, крысы или куры, которые описаны, например, в патенте США № 6,150,584, международной патентной публикации № WO1999/45962, международных патентных публикациях № WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 и WO1990/04036. Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких животных можно разрывать или удалять, и в геном животного можно встраивать по меньшей мере один полный или частичный локус иммуноглобулина человека посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации, с применением трансхромосом или с применением минигенов. Такие компании, как Regeneron (<URL: http://www.regeneron.com>), Harbour Antibodies (http://www.harbourantibodies.com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (<URL: http://www.omtinc.net>), KyMab (<URL: http://www.kymab.com>), Trianni (<URL: http://www.trianni.com>) и Ablexis (<URL: http://www.ablexis.com>) могут быть задействованы для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением технологий, описанных выше.

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε, можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, причем фаг выработан с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их частей, таких как Fab, одноцепочечные

антитела (scFv) или неспаренные либо спаренные вариабельные области антител. Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε, могут быть выделены, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде гибридных белков с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в публикации Shi *et al.,* (2010) *J Mol Biol* 397:385–96 и в международной патентной публикации № WO09/085462). В библиотеках можно проводить скрининг на связывание фагов с CD3ε человека и/или яванского макака, и полученные положительные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы, и из лизатов клонов могут быть выделены Fab или конвертированы в scFvs или другие конфигурации антигенсвязывающих фрагментов.

Получение иммуногенных антигенов и экспрессия и продукция антигенсвязывающих доменов по изобретению могут быть выполнены с применением любой приемлемой методики, такой как продукция рекомбинантного белка. Иммуногенные антигены можно вводить животным в форме очищенного белка или белковых смесей, включающих в себя целые клетки или клеточные либо тканевые экстракты, или антиген может быть образован *de novo* в организме животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его часть.

Конъюгация с фрагментами, продлевающими период полужизни

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε согласно настоящему изобретению, могут быть конъюгированы с фрагментом, продлевающим период полужизни. Примеры фрагментов, продлевающих период полужизни, представляют собой альбумин, варианты альбумина, альбумин-связывающие белки и/или домены, трансферрин и их фрагменты и аналоги, иммуноглобулины (Ig) или их фрагменты, такие как Fc-области. Известны аминокислотные последовательности вышеупомянутых фрагментов, продлевающих период полужизни. Ig или их фрагменты включают все изотипы (*m. e.* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE).

Дополнительные фрагменты, продлевающие период полужизни, которые могут быть конъюгированы с антигенсвязывающими доменами, которые связывают CD3ε по изобретению, включают молекулы полиэтиленгликоля (PEG), такие как PEG5000 или PEG20000, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с различной длиной цепи, например лаурат, миристат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандикарбоновая кислота, тетрадекандикарбоновая кислота, октадекандикарбоновая кислота, докозандикарбоновая кислота и т. п., полилизин, октан, углеводы (декстран,

целлюлоза, олиго- или полисахариды) для получения желаемых свойств. Эти фрагменты могут представлять собой результаты прямого слияния с антигенсвязывающими доменами, которые связываются с CD3ε по изобретению, и их можно создавать стандартными методиками клонирования и экспрессии. В альтернативном варианте для присоединения фрагментов к полученным путем рекомбинации антигенсвязывающим доменам, которые связывают CD3ε по изобретению, можно использовать хорошо известные методы химического связывания.

Пегильный фрагмент может быть, например, конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD3ε по изобретению, путем включения цистеина в С-конец антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε по изобретению, или конструирования цистеинов в положения остатков, которые обращены в противоположную сторону от сайта связывания CD3ε и прикрепления пегильной группы к цистеину с использованием хорошо известных способов.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD3ε, конъюгирован с фрагментом, продлевающим период полужизни.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, область Fc, трансферрин, альбумин, альбумин-связывающий домен или полиэтиленгликоль. В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой константную область Ig.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой Ig.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой фрагмент Ig.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой константную область Ig.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой фрагмент константной области Ig.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой Fc-область.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой альбумин.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой альбумин-связывающий домен.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой трансферин.

В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой полиэтиленгликоль.

Фармакологические свойства атигенсвязывающих доменов, которые связывают CD3ε, конъюгированных с фрагментом, продлевающим период полужизни, можно оценить с использованием *in vivo* моделей.

Конъюгация с константными областями иммуноглобулина (Ig) или фрагментами константных областей Ig

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε по изобретению, могут быть конъюгированы с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig для придания антителоподобных свойств, включая эффекторные функции Fc, связывание комплемента C1q, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание рецептора Fc, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз или подавление регуляции рецепторов клеточной поверхности (например, рецептор B-клеток; BCR). Функции константной области Ig или фрагмента константной области Ig также могут быть использованы в качестве фрагмента, продлевающего период полужизни, как описано в настоящем документе. Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε по изобретению, могут быть сконструированы как стандартные полноразмерные антитела с использованием стандартных способов. Полноразмерные антитела, содержащие антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, можно дополнительно конструировать, как описано в настоящем документе.

Константная область тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из субдоменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3. Домен CH1 охватывает остатки A118-V215, остатки доменов CH2 A231-K340 и остатки доменов CH3 G341-K447 на тяжелой цепи, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC. В некоторых случаях G341 называют остатком домена CH2. Шарнирная область по существу определяется как область человеческого IgG1, включающая E216 и заканчивающаяся на P230. Fc-область Ig содержит по меньшей мере домены CH2 и CH3 константной области Ig и,

следовательно, содержит по меньшей мере область от около A231 до K447 константной области тяжелой цепи Ig.

В изобретении также предложен антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε и который конъюгирован с константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом константной области Ig.

В других вариантах осуществления константная область Ig представляет собой константную область тяжелой цепи

В других вариантах осуществления константная область Ig представляет собой константную область легкой цепи.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит область Fc.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнирной области, домена CH2 и домена CH3. Часть шарнира относится к одному или более аминокислотным остаткам шарнира Ig.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig посредством второго линкера (L2).

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

Функциональные возможности антигенсвязывающих доменов, которые связывают CD3ε по изобретению и которые конъюгированы с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, можно оценить с применением нескольких известных анализов. Связывание с CD3ε можно оценить с использованием способов, описанных в настоящем документе. Измененные свойства, которые были переданы константным доменом Ig или фрагментом константной области Ig, таким как Fc-область, можно оценить в анализах связывания рецептора Fc с использованием растворимых форм рецепторов, таких как FcγRI, FcγRII, FcγRIII или FcRn, или с использованием клеточных анализов, измеряющих, например, ADCC, CDC или ADCP.

ADCC можно оценить с помощью анализа *in vitro* с использованием клеток, экспрессирующих CD3ε, в качестве клеток-мишеней и NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Цитолиз можно обнаруживать по высвобождению метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков) из лизированных клеток. В типовом анализе клетки-мишени используют в соотношении 1 клетка-мишень на 4 эффекторные клетки. Клетки-мишени предварительно метят BATDA и объединяют с эффекторными клетками и исследуемым антителом. Образцы инкубируют в течение 2 часов и измеряют лизис клеток путем измерения высвобождения BATDA в супернатант. Данные нормализуют относительно максимальной цитотоксичности с 0,67 % Тритон X-100 (Sigma Aldrich) и минимального контроля, определяемого по высвобождению BATDA из клеток-мишеней в отсутствие любого антитела.

ADCP можно оценить с использованием макрофагов, полученных из моноцитов, в качестве эффекторных клеток и любых клеток, экспрессирующих CD3ε, в качестве клеток-мишеней, которые конструированы для экспрессии GFP или другой меченой молекулы. В типовом анализе соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней может составлять, например, 4:1. Эффекторные клетки можно инкубировать с клетками-мишенями в течение 4 часов с антителом по изобретению или без него. После инкубации клетки можно отделять с помощью аккутазы. Идентификацию макрофагов можно проводить с помощью антител к CD11b и к CD14, связанных с флуоресцентной меткой, а процентное значение фагоцитоза можно определять на основании % флуоресцентного ЗФБ в макрофагах $CD11^{+}CD14^{+}$ с помощью стандартных способов.

CDC для клеток можно измерять, например, посредством высевания клеток Дауди при 1×10^5 клеток/лунка (50 мкл/лунка) в RPMI-B (RPMI с добавлением 1% BSA), добавления 50 мкл исследуемого белка в лунки до конечной концентрации в

диапазоне 0–100 мкг/мл, инкубирования реакционной смеси в течение 15 мин при комнатной температуре, добавления 11 мкл объединенной человеческой сыворотки в лунки и инкубирования реакционной смеси в течение 45 мин при 37 °C. Процентное значение (%) лизированных клеток можно определять как % окрашенных пропидия йодидом клеток в анализе FACS с помощью стандартных способов.

Белки, содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε по изобретению

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε по изобретению, могут быть сконструированы как моноспецифические или мультиспецифические белки различных конфигураций использованием стандартных способов.

В настоящем изобретении также предложен моноспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε по изобретению.

В других вариантах осуществления моноспецифический белок представляет собой антитело.

В настоящем изобретении также предложен мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε по изобретению.

В других вариантах осуществления мультиспецифический белок является биспецифическим.

В других вариантах осуществления мультиспецифический белок является триспецифическим.

В других вариантах осуществления мультиспецифический белок является тетраспецифическим.

В других вариантах осуществления мультиспецифический белок является моновалентным для связывания с CD3ε.

В других вариантах осуществления мультиспецифический белок является бивалентным для связывания с CD3ε.

В настоящем описании также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген.

В других вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой антиген hK2. В других вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой антиген HLA-G. В других вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой антиген DLL3.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит Fab.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит $F(ab')_2$.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит VHH.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит Fv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержат Fd.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит scFv.

В других вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к C-концу, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

В других вариантах осуществления L1 содержит около 5–50 аминокислот.

В других вариантах осуществления L1 содержит около 5–40 аминокислот.

В других вариантах осуществления L1 содержит около 10–30 аминокислот.

В других вариантах осуществления L1 содержит около 10–20 аминокислот.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

В других вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 6, 12 или 18, HCDR2 с SEQ ID NO: 7, 13 или 19, HCDR3 с SEQ ID NO: 8, 14 или 20, LCDR1 с SEQ ID NO: 9, 15 или 21, LCDR2 с SEQ ID NO: 10 или 16, LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 17 или 22.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно;

SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно; или

SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает Cd3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает Cd3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает Cd3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает Cd3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает Cd3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 60, 71, 72, 73 или 74.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 149, HCDR2 с SEQ ID NO: 150, HCDR3 с SEQ ID NO: 151, LCDR1 с SEQ ID NO: 171, LCDR2 с SEQ ID NO: 172 и LCDR3 с SEQ ID NO: 173; или

VH с SEQ ID NO: 126 и VL с SEQ ID NO: 127.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 149, HCDR2 с SEQ ID NO: 152, HCDR3 с SEQ ID NO: 151, LCDR1 с SEQ ID NO: 174, LCDR2 с SEQ ID NO: 175 и LCDR3 с SEQ ID NO: 173; или

VH с SEQ ID NO: 124 и VL с SEQ ID NO: 125.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 149, HCDR2 с SEQ ID NO: 152, HCDR3 с SEQ ID NO: 151, LCDR1 с SEQ ID NO: 174, LCDR2 с SEQ ID NO: 175 и LCDR3 с SEQ ID NO: 173; или

VH с SEQ ID NO: 128 и VL с SEQ ID NO: 129.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 149, HCDR2 с SEQ ID NO: 152, HCDR3 с SEQ ID NO: 151, LCDR1 с SEQ ID NO: 174, LCDR2 с SEQ ID NO: 175 и LCDR3 с SEQ ID NO: 173; или

VH с SEQ ID NO: 130 и VL с SEQ ID NO: 131.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 149, HCDR2 с SEQ ID NO: 152, HCDR3 с SEQ ID NO: 151, LCDR1 с SEQ ID NO: 171, LCDR2 с SEQ ID NO: 172 и LCDR3 с SEQ ID NO: 173; или

VH с SEQ ID NO: 132 и VL с SEQ ID NO: 133.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 149, HCDR2 с SEQ ID NO: 152, HCDR3 с SEQ ID NO: 151, LCDR1 с SEQ ID NO: 171, LCDR2 с SEQ ID NO: 172 и LCDR3 с SEQ ID NO: 173; или

VH с SEQ ID NO: 134 и VL с SEQ ID NO: 135.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 149, HCDR2 с SEQ ID NO: 152, HCDR3 с SEQ ID NO: 151, LCDR1 с SEQ ID NO: 171, LCDR2 с SEQ ID NO: 172 и LCDR3 с SEQ ID NO: 173; или

VH с SEQ ID NO: 136 и VL с SEQ ID NO: 135.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 149, HCDR2 с SEQ ID NO: 152, HCDR3 с SEQ ID NO: 151, LCDR1 с SEQ ID NO: 171, LCDR2 с SEQ ID NO: 172 и LCDR3 с SEQ ID NO: 173; или

VH с SEQ ID NO: 132 и VL с SEQ ID NO: 135.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 153, HCDR2 с SEQ ID NO: 154, HCDR3 с SEQ ID NO: 155, LCDR1 с SEQ ID NO: 176, LCDR2 с SEQ ID NO: 177 и LCDR3 с SEQ ID NO: 178; или

VH с SEQ ID NO: 137 и VL с SEQ ID NO: 138.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 156, HCDR2 с SEQ ID NO: 157, HCDR3 с SEQ ID NO: 158, LCDR1 с SEQ ID NO: 182, LCDR2 с SEQ ID NO: 183 и LCDR3 с SEQ ID NO: 184; или

VH с SEQ ID NO: 139 и VL с SEQ ID NO: 140.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 159, HCDR2 с SEQ ID NO: 160, HCDR3 с SEQ ID NO: 161, LCDR1 с SEQ ID NO: 179, LCDR2 с SEQ ID NO: 180 и LCDR3 с SEQ ID NO: 181; или

VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 142.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 162, HCDR2 с SEQ ID NO: 163, HCDR3 с SEQ ID NO: 164, LCDR1 с SEQ ID NO: 185, LCDR2 с SEQ ID NO: 186 и LCDR3 с SEQ ID NO: 187; или

VH с SEQ ID NO: 143 и VL с SEQ ID NO: 144.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 165, HCDR2 с SEQ ID NO: 166, HCDR3 с SEQ ID NO: 167, LCDR1 с SEQ ID NO: 191, LCDR2 с SEQ ID NO: 192 и LCDR3 с SEQ ID NO: 193; или

VH с SEQ ID NO: 145 и VL с SEQ ID NO: 146.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 168, HCDR2 с SEQ ID NO: 169, HCDR3 с SEQ ID NO: 170, LCDR1 с SEQ ID NO: 191, LCDR2 с SEQ ID NO: 192 и LCDR3 с SEQ ID NO: 188; или

VH с SEQ ID NO: 147 и VL с SEQ ID NO: 148.

В других вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, содержит VH с SEQ ID NO: 143 и VL с SEQ ID NO: 358.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с первой константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом первой константной области Ig, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, конъюгирован со второй константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом второй константной области Ig.

В других вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит Fc-область.

В других вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит домен CH2.

В других вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит домен CH3.

В других вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

В других вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнирной области, домен CH2 и домен CH3.

В других вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3.

В других вариантах осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит второй линкер (L2) между первым антигенсвязывающим доменом, который связывает CD3ε, и первой константной областью Ig или фрагментом первой константной области Ig, и между вторым антигенсвязывающим доменом, который связывает лимфоцитарный антиген, и второй константной областью Ig или фрагментом второй константной области Ig.

В других вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

В других вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой IgG1, IgG2 и IgG3 или изотип IgG4.

В других вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой изотип IgG1.

В других вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой изотип IgG2.

В других вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой изотип IgG3.

В других вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой изотип IgG4.

Первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig могут быть дополнительно сконструированы, как описано в настоящем документе.

В других вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания мультиспецифического белка с FcγR.

В других вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая приводит к уменьшению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-делеции/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/G236-делеции/G237A/P238S, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

В других вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с Fcγ-рецептором (FcγR).

В других вариантах осуществления по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбирают из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

В других вариантах осуществления FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

В других вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка.

В других вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полувыведения мультиспецифического белка, выбрана из группы,

состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

В других вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig.

В других вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одна мутация в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig выбираются из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, T366L, F405W, K392L, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, T366L/K392L/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, L351Y/Y407V, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В других вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации

L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig; или

L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V во второй константной области Ig.

Получение мультиспецифических белков, которые содержат антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD3ε.

Антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD3ε по изобретению, можно конструировать в мультиспецифические антитела, которые также входят в объем настоящего изобретения.

Антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD3ε, можно конструировать в полноразмерные мультиспецифические антитела, которые созданы с

помощью обмена Fab-плечами, в которых замены вводят в два моноспецифических двухвалентных антитела в пределах константного участка Ig домена CH3, который способствует обмену Fab-плечами *in vitro*. В этих способах два моноспецифических бивалентных антитела конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене CH3, способствующие стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невосстанавливающим. Примерами восстанавливающих агентов, которые можно использовать, являются 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиоэритрит (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °C в присутствии по меньшей мере 25 мм 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 мм дитиотреитола при уровне pH 5–8, например при pH = 7,0 или при pH = 7,4.

Мутации CH3, которые можно использовать, включают в себя такие технологии, как мутации «выступ во впадину» (Genentech), электростатически спариваемые мутации (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), сконструированное посредством обмена цепей доменное тело (SEEDbody) (EMD Serono) и другие асимметричные мутации (например, Zymeworks).

Мутации типа «выступ во впадину» описаны, например, в WO1996/027011 и включают мутации на границе раздела области CH3, в которой аминокислоту с небольшой боковой цепью (впадина) вносят в первую область CH3, а аминокислоту с большой боковой цепью (выступ) вносят во вторую область CH3, что приводит к предпочтительному взаимодействию между первой областью CH3 и второй областью CH3. Примерами мутаций в области CH3, образующих выступ и впадину, являются T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Образование гетеродимера тяжелой цепи можно стимулировать путем использования электростатических взаимодействий посредством замены положительно заряженных остатков в первой области CH3 и отрицательно заряженных остатков во

второй области CH3, как описано в US2010/0015133, US2009/0182127, US2010/028637 или US2011/0123532.

Другими асимметричными мутациями, которые можно применять для стимуляции гетеродимеризации тяжелых цепей, являются L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F, or T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в US2012/0149876 or US2013/0195849 (Zymeworks).

Мутации SEEDbody включают замещение выбранных остатков IgG остатками IgA для стимуляции гетеродимеризации тяжелых цепей, как описано в US20070287170.

Другими примерами мутаций, которые можно использовать, являются R409D_K370E/D399K_E357K, S354C_T366W/Y349C_ T366S_L368A_Y407V, Y349C_T366W/S354C_T366S_L368A_Y407V, T366K/L351D, L351K/Y349E, L351K/Y349D, L351K/L368E, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, K392D/D399K, K392D/ E356K, K253E_D282K_K322D/D239K_E240K_K292D, K392D_K409D/D356K_D399K, описанные в WO2007/147901, WO 2011/143545, WO2013157954, WO2013096291 и US2018/0118849.

Мутации Duobody® (Genmab) описаны, например, в US9150663 и US2014/0303356 и включают в себя мутации F405L/K409R, дикого типа/F405L_R409K, T350I_K370T_F405L/K409R, K370W/K409R, D399AFGHILMNRSTVWY/K409R, T366ADEFGHILMQVY/K409R, L368ADEGHNRSTVQ/K409AGRH, D399FHKRQ/K409AGRH, F405IKLSTVW/K409AGRH и Y407LWQ/K409AGRH.

Дополнительные биспецифические или мультиспецифические структуры, в которые могут быть встроены антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε, включают иммуноглобулины с двойным вариабельным доменом (DVD) (международная патентная публикация № WO2009/134776; DVD представляют собой полноразмерные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую структуру VH1-линкер-VH2-CH, и легкую цепь, имеющую структуру VL1-линкер-VL2-CL; где линкер необязателен), структуры, включающие различные димеризационные домены для соединения двух плеч антител с разной специфичностью, такие как «лейциновая застежка» или коллагеновые димеризационные домены (международная патентная публикация № WO2012/022811, патент США № 5,932,448; патент США № 6,833,441),

два или более доменных антитела (dAb), конъюгированных вместе, диатела, антитела, имеющие только тяжелую цепь, такие как антитела верблюжьего типа и сконструированные антитела верблюжьего типа, антитела с двойным нацеливанием (DT)-Ig (GSK/Domantis), антитело «два в одном» (Genentech), поперечно сшитые Mab (Karmanos Cancer Center), мАт2 (F-Star) и CovX-тело (CovX/Pfizer), IgG-подобные биспецифические антитела (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) и TvAb (Roche), слитые белки ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics) и Dual(ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай), антитела «двойного действия» или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), двухвалентное биспецифическое антитело (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech). Антитела на основе ScFv, диател и доменные антитела включают в себя, без ограничений, биспецифический Т-клеточный активатор (BiTE) (Micromet), тандемное диатело (Tandab) (Affimed), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слитый белок ScFv и человеческого сывороточного альбумина (Merrimack), COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь.

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε по изобретению, также могут быть конструированы в мультиспецифические белки, которые содержат три полипептидных цепи. В таких конструкциях по меньшей мере один антигенсвязывающий домен находится в форме scFv. Иллюстративные конструкции включают (где «1» обозначает первый антигенсвязывающий домен, «2» обозначает второй антигенсвязывающий домен и «3» обозначает третий антигенсвязывающий домен):

Конструкция 1: Цепь A) scFv1-CH2-CH3; Цепь B) VL2-CL; Цепь C) VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3

Конструкция 2: Цепь A) scFv1-шарнир-CH2-CH3; Цепь B) VL2-CL; Цепь C) VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3

Конструкция 3: Цепь A) scFv1-CH1-шарнир-CH2-CH3; Цепь B) VL2-CL; Цепь C) VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3

Конструкция 4: Цепь A) CH2-CH3-scFv1; Цепь B) VL2-CL; Цепь C) VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3

Конструирование CH3 может быть включено в конструкции 1–4, такие как мутации L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в US2012/0149876 или US2013/0195849 (Zymeworks).

Изотипы, аллотипы и Fc-конструирование

Константная область Ig или фрагмент константной области Ig, такой как Fc-область, которая присутствует в белках по настоящему изобретению, может представлять собой любой аллотип или изотип.

В других вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG1.

В других вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG2.

В других вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG3.

В других вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG4.

Константная область Ig или фрагмент константной области Ig могут иметь любой аллотип. Ожидается, что аллотип не влияет на свойства константной области Ig, такие как связывание или опосредованные Fc эффекторные функции. Иммуногенность терапевтических протеинов, содержащих константные области Ig или их фрагменты, связана с повышенным риском реакций на инфузию и сниженной длительностью терапевтического ответа (Baert *et al.*, (2003) *N Engl J Med* 348:602–08). Степень, с которой терапевтические белки, содержащие константные области Ig или их фрагменты, индуцируют иммунный ответ в организме-хозяине, отчасти может определяться аллотипом константной области Ig (Stickler *et al.*, (2011) *Genes and Immunity* 12:213-21). Аллотип константной области Ig связан с вариациями аминокислотной последовательности в конкретных положениях в последовательностях константных областей антитела. В **таблице 3** приведены выбранные аллотипы IgG1, IgG2 и IgG4.

Таблица 3.

Аллотип	Аминокислотный остаток в позиции различия (нумерация остатков: каталог EC)							
	IgG2		IgG4		IgG1			
	189	282	309	422	214	356	358	431
G2m(n)	T	M						
G2m(n-)	P	V						
G2m(n)/(n-)	T	V						
nG4m(a)			L	R				
G1m(17)					K	E	M	A
G1m(17,1)					K	D	L	A
G1m(3)					R	E	M	A

Циркулирующие в крови эндогенные карбоксипептидазы могут удалять С-концевой лизин (CTL) из константной области Ig (Cai *et al.*, (2011) *Biotechnol Bioeng* 108:404-412). Удаление CTL во время получения можно контролировать на уровне ниже максимального посредством контроля концентрации внеклеточного Zn^{2+}, этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) или ЭДТА-Fe^{3+}, как описано в патентной публикации США № US20140273092. Содержание CTL белков можно измерять с помощью известных способов.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig, имеет содержание С-концевого лизина от около 10% до около 90%. В других вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 20% до около 80%. В других вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 40 % до около 70 %. В других вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 55 % до около 70 %. В других вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет около 60 %.

Мутации Fc-области можно получить в антигенсвязывающих доменах, которые связывают CD3ε, конъюгированные с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, для модуляции их эффекторных функций, таких как ADCC, ADCP и/или ADCP и/или фармакокинетических свойств. Это может быть достигнуто путем введения в Fc мутации (-ий), модулирующей (-их) связывание мутантного Fc с

активирующими рецепторами FcγR (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIII), ингибиторным FcγRIIb и/или с FcRn.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в константной области Ig или в фрагменте константной области Ig.

В других вариантах осуществления указанная по меньшей мере одна мутация находится в области Fc.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать мутаций в Fc-области.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая модулирует связывание антитела с FcRn.

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для модуляции периода полужизни (например, связывания с FcRn), включают в себя положения 250, 252, 253, 254, 256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 и 435. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации, являются мутации T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A и H435R. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации для увеличения периода полужизни, являются мутации M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A и T307A/E380A/N434A. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации для уменьшения периода полужизни, являются мутации H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит мутацию M252Y/S254T/T256E.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области,

которая уменьшает связывание белка с активирующим Fcγ-рецептором (FcγR) и/или уменьшает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) или фагоцитоз (ADCP).

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для уменьшения связывания белка с активирующим FcγR и последующего снижения эффекторной функции, включают в себя положения 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 327, 328, 329, 330, 331 и 365. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации, являются мутации K214T, E233P, L234V, L234A, делеция G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S и P331S в IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Примерами комбинаций мутаций, которые приводят к получению белков со сниженной ADCC, являются мутации L234A/L235A в IgG1, L234A/L235A/D265S в IgG1, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в IgG2, F234A/L235A в IgG4, S228P/F234A/L235A в IgG4, N297A во всех изотипах Ig, V234A/G237A в IgG2, K214T/E233P/L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M в IgG1, H268Q/V309L/A330S/P331S в IgG2, S267E/L328F в IgG1, L234F/L235E/D265A в IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S в IgG1, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S в IgG4 и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S в IgG4. Можно также использовать гибридные Fc-домены IgG2/4, такие как Fc с остатками 117–260 из IgG2 и остатками 261–447 из IgG4.

Примером мутации, которая приводит к получению белков со сниженной CDC, является мутация K322A.

Для усиления стабильности IgG4 можно выполнять известную мутацию S228P в IgG4.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию, которую выбирают из группы, состоящей из K214T, E233P, L234V, L234A, делеция G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, K322, A330S и P331S.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит мутацию L234A/L235A/D265S.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит мутацию L234A/L235A.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домн, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая усиливает связывание белка с Fcγ-рецептором (FcγR) и/или усиливает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или фагоцитоз (ADCP).

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для увеличения связывания белка с активирующим FcγR и/или для усиления эффекторных функций Fc, включают в себя положения 236, 239, 243, 256, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 или 430 (нумерация остатков соответствует каталогу EC). Типовые мутации, которые можно проводить по отдельности или в комбинации, представляют собой G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305L, K326A, A330K, I332E, E333A, K334A, A339T и P396L. Примерами комбинаций мутаций, которые позволяют получать белки с повышенными ADCC или ADCP, являются S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E.

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для усиления CDC, включают в себя положения 267, 268, 324, 326, 333, 345 и 430. Примерами мутаций, которые можно выполнять по отдельности или в комбинации, являются S267E, F1268F, S324T, K326A, K326W, E333A, E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430S, E430F и E430T. Примерами комбинаций мутаций, которые позволяют получать белки с уменьшением CDC, являются K326A/E333A, K326W/E333A, H268F/S324T, S267E/H268F, S267E/S324T и S267E/H268F/S324T.

Конкретные мутации, описанные в данном документе, представляют собой мутации по сравнению с аминокислотными последовательностями дикого типа IgG1, igG2 и IgG4 SEQ ID NO: 95, 96 и 97 соответственно.

SEQ ID NO: 95, IgG1 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 96; IgG2 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPA
PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 97; IgG4 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Связывание антитела с FcγR или FcRn можно оценивать с использованием проточной цитометрии на клетках, сконструированных для экспрессии каждого из рецепторов. В примере анализа связывания в 96-луночный планшет высевают 2×10^5 клеток на лунку и блокируют буферным раствором для окрашивания с бычьим сывороточным альбумином (БСА) (BD Biosciences, San Jose, USA) в течение 30 мин при 4 °C. Клетки инкубируют с исследуемым антителом на льду в течение 1,5 ч при 4 °C. После двукратного промывания буферным раствором для окрашивания БСА клетки инкубируют с меченым R-фикоэритрином (R-PE) вторичным антителом к человеческому IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories) в течение 45 мин при 4 °C. Клетки дважды промывают в буферном растворе для окрашивания, после чего повторно суспендируют в 150 мкл буферного раствора для окрашивания, содержащего разведенный в соотношении 1:200 краситель DRAQ7 для живых/мертвых клеток (Cell Signaling Technology, Danvers, USA). Сигналы PE и DRAQ7 от окрашенных клеток с определением с помощью проточного цитометра Miltenyi MACSQuant (Miltenyi Biotec,

г. Оберн, США) с применением, соответственно, каналов B2 и B4. Проводят гейтинг живых клеток по исключению DRAQ7, а среднее геометрическое значение сигналов флуоресценции определяют для по меньшей мере 10000 случаев живых клеток. Для анализа используют программное обеспечение FlowJo (Tree Star). По данным строят график зависимости логарифма концентрации антитела от среднего значения сигналов флуоресценции. Проводят нелинейный регрессионный анализ.

Гликоинженерия

Способность антигенсвязывающего домена, связывающего CD3ε, конъюгированного с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, опосредовать ADCC можно повысить путем конструирования константной области Ig или фрагмента олигосахаридного компонента константной области Ig. IgG1 или IgG3 человека претерпевают N-гликозилирование по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Константную область Ig, содержащую белки, можно продуцировать несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление коровой фукозы из олигосахаридов типа 2-антеннарного комплекса, присоединенной к антигенсвязывающему домену, который связывает CD3ε, конъюгированному с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, усиливает ADCC белка посредством улучшенного связывания FcγRIIIa без изменения связывания антигенов или активности CDC. Такие белки можно получать, используя различные способы, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии иммуноглобулинов с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антеннарного комплекса, такие как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno *et al.,* Cytotechnology 64:249–65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields *et al., J Biol Chem* 277:26733-26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier *et al., MAbs*;2(4): 405–415, 2010; PMID:20562582), применяя линию клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa *et al., J Biol Chem* 278:3466-3473, 2003), внося малую интерферирующую РНК, специфичную к гену 1,6-фукозилтрансферазы (*FUT8)* (Mori *et al., Biotechnol Bioeng* 88:901-908, 2004), или коэкспрессируя β-1,4-*N*-ацетилглюкозаминилтрансферазу III и α-маннозидазу II комплекса Гольджи, или применяя сильный ингибитор альфа-маннозидазы I, кифунензин (Ferrara *et al., J Biol*

Chem 281:5032-5036, 2006, Ferrara *et al., Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou *et al., Biotechnol Bioeng* 99:652–65, 2008).

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig по изобретению, имеет биантеннарную структуру гликанов с содержанием фукозы от около 1% до около 15%, например около 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, имеет структуру гликана с содержанием фукозы около 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% или 20%.

Термин «содержание фукозы» означает количество моносахарида фукозы в пределах сахаридной цепи в положении Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное содержание фукозосодержащих структур, относящихся ко всем гликоструктурам. Они могут характеризоваться и количественно определяться множеством способов, например: 1) при помощи времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) пробы, обработанной N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной заявке № WO2008/077546 2); 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественным определением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (сверхэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ)) с флуоресцентным обнаружением и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) (сверхэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС)); 3) анализом интактного белка нативного или восстановленного мАт с обработкой или без обработки гликанов Asn297 ферментом Endo S или другим ферментом, который расщепляет связь между первым и вторым моносахаридами GlcNAc и при этом сохраняет соединение фукозы и первого GlcNAc; 4) расщеплением мАт на составляющие его пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсин или эндопептидаза Lys-C) и последующим разделением, обнаружением и количественным определением посредством ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); 5) отделением олигосахаридов мАт от белка мАт посредством специфического ферментативного дегликозилирования с PNGase F на Asn

297. Высвобожденные таким образом олигосахариды можно метить флуорофором, разделять и идентифицировать различными вспомогательными методами, которые позволяют: точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определить степень сиалилирования с помощью ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделить и количественно оценить формы олигосахаридов по критерию гидрофильности с помощью ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделить и количественно оценить формы олигосахаридов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

Используемый в настоящем документе термин «низкий уровень фукозы» или «низкое содержание фукозы» относится к антигенсвязывающему домену, который связывает CD3ε, конъюгированному с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, с содержанием фукозы около 1–15%.

Используемый в настоящем документе термин «нормальный уровень фукозы» или «нормальное содержание фукозы» относится к антигенсвязывающему домену, который связывает CD3ε, конъюгированному с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, с содержанием фукозы около 50%, обычно около 80% или более 85%.

Антиидиотипические антитела

Антиидиотипические антитела представляют собой антитела, которые специфически связываются с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD3ε по изобретению.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, которое специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD3ε по изобретению.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, которое специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD3ε, содержащим

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

Антиидиотипическое (Id) антитело является антителом, распознающим антигенные детерминанты (например, паратоп или CDR) антитела. Id-антитело может быть блокирующим или неблокирующим антиген. Антигенблокирующий Id можно использовать для обнаружения свободного антигенсвязывающего домена в образце (*например,* антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε по изобретению). Неблокирующее Id-антитело можно применять для обнаружения всех антител (свободных, частично связанных с антигеном или полностью связанных с антигеном) в пробе. Id-антитело можно получать путем иммунизации животного антителом, для которого получают анти-Id-антитело.

Анти-Id-антитело также можно применять в качестве иммуногена для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело. Анти-анти-Id-антитело может быть эпитопно идентично первичному антигенсвязывающему домену, который индуцировал анти-Id. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам антигенсавязывающего домена, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антигенсвязывающие домены идентичной специфичности. Антиидиотипические антитела можно изменять (тем самым продуцируя варианты антиидиотипических антител) и/или дериватизировать любым приемлемым методом, таким как раскрытый в настоящем документе.

Иммуноконъюгаты

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε по настоящему изобретению, представляют собой белки, содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε, или мультиспецифические белки, которые содержат антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε (в совокупности называемые в данном документе белками, связывающими CD3ε), могут быть конъюгированы с гетерологичной молекулой.

В других вариантах осуществления гетерологичная молекула представляет собой обнаруживаемую метку или цитотоксический агент.

В изобретении также предложен антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с обнаруживаемой меткой.

В изобретении также предложен белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с обнаруживаемой меткой.

В изобретении также предложен мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с обнаруживаемой меткой.

В изобретении также предложен антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с цитотоксическим агентом.

В изобретении также предложен белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с цитотоксическим агентом.

В изобретении также предложен мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с цитотоксическим агентом.

CD3ε связывающие белки по настоящему изобретению можно применять для направления терапевтических средств на опухолевые антиген-экспрессирующие клетки. Альтернативно, клетки, экспрессирующие CD3ε, могут быть мишенями для белка, связывающего CD3ε, по изобретению, связанного с терапевтическим средством, предназначенным для модификации клеточной функции после интернализации.

В других вариантах осуществления обнаруживаемая метка также представляет собой цитотоксический агент.

Белки, связывающие CD3ε, по изобретению, конъюгированные с обнаруживаемой меткой, можно применять для оценки экспрессии CD3ε на различных образцах.

Обнаруживаемые метки включают композиции, которые при конъюгировании с белком, связывающим CD3ε, по изобретению делают его обнаружимым посредством спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств.

Примеры выявляемых меток включают радиоактивные изотопы, магнитные гранулы, металлические гранулы, коллоидные частицы, флуоресцентные красители, электроноплотные реагенты, ферменты (например, широко используемые в иммуноферментном анализе (ИФА)), биотин, дигоксигенин, гаптены, люминисцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, флуорохромы, флуорофоры, гасящие флуоресценцию агенты, цветные молекулы, радиоактивные изотопы, сцинтиллирующие средства, авидин, стрептавидин, протеин A, протеин G, антитела или их фрагменты, полигистидин, Ni^{2+}, Flag-метки, myc-метки, тяжелые металлы, ферменты, щелочную фосфатазу, пероксидазу, люциферазу, доноры/акцепторы электронов, сложные эфиры акридиния и колориметрические субстраты.

Выявляемая метка может испускать сигнал спонтанно, например, когда выявляемая метка представляет собой радиоактивный изотоп. В других случаях выявляемая метка испускает сигнал в результате стимуляции внешним полем.

Примерами радиоактивных изотопов могут быть γ-излучающие, Оже-электрон-излучающие, β-излучающие, альфа-излучающие или позитрон-излучающие радиоактивные изотопы. К примерам радиоактивных изотопов относятся ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{15}N, ^{18}F, ^{19}F, ^{55}Co, ^{57}Co, ^{60}Co, ^{61}Cu, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{68}Ga, ^{72}As, ^{75}Br, ^{86}Y, ^{89}Zr, ^{90}Sr, ^{94m}Tc, ^{99m}Tc, ^{115}In, $^{123}1$, $^{124}1$, ^{125}I, $^{131}1$, ^{211}At, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{226}Ra, ^{225}Ac и ^{227}Ac.

К примерам атомов металлов относятся металлы с атомным номером более 20, например атомы кальция, атомы скандия, атомы титана, атомы ванадия, атомы хрома, атомы марганца, атомы железа, атомы кобальта, атомы никеля, атомы меди, атомы цинка, атомы галлия, атомы германия, атомы мышьяка, атомы селена, атомы брома, атомы криптона, атомы рубидия, атомы стронция, атомы иттрия, атомы циркония, атомы ниобия, атомы молибдена, атомы технеция, атомы рутения, атомы родия, атомы палладия, атомы серебра, атомы кадмия, атомы индия, атомы олова, атомы сурьмы, атомы теллура, атомы йода, атомы ксенона, атомы цезия, атомы бария, атомы лантана, атомы гафния, атомы тантала, атомы вольфрама, атомы рения, атомы осмия, атомы иридия, атомы платины, атомы золота, атомы ртути, атомы таллия, атомы свинца, атомы висмута, атомы франция, атомы радия, атомы актиния, атомы церия, атомы празеодима, атомы неодима, атомы прометия, атомы самария, атомы европия, атомы гадолиния, атомы тербия, атомы диспрозия, атомы гольмия, атомы эрбия, атомы туллия, атомы иттербия, атомы лютеция, атомы тория, атомы протактиния, атомы урана, атомы нептуния, атомы плутония, атомы америция, атомы кюрия, атомы берклия, атомы калифорния, атомы эйнштейния, атомы фермия, атомы менделевия, атомы нобелия или атомы лоуренсия.

В других вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой щелочноземельные металлы с атомным номером более двадцати.

В других вариантах осуществления атомы металлов могут представлять собой лантаниды.

В других вариантах осуществления атомы металлов могут представлять собой актиниды.

В других вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой переходные металлы.

В других вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой бедные металлы.

В других вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой атомы золота, атомы висмута, атомы тантала и атомы гадолиния.

В других вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой металлы с атомным номером от 53 (т. е. йод) до 83 (т. е. висмут).

В других вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой атомы, приемлемые для магнитно-резонансной томографии.

Атомы металлов могут представлять собой ионы металлов со степенью окисления +1, +2, +3, например Ba^{2+}, Bi^{3+}, Cs^{+}, Ca^{2+}, Cr^{2+}, Cr^{3+}, Cr^{6+}, Co^{2+}, Co^{3+}, Cu^{+}, Cu^{2+}, Cu^{3+}, Ga^{3+}, Gd^{3+}, Au^{+}, Au^{3+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, F^{3+}, Pb^{2+}, Mn^{2+}, Mn^{3+}, Mn^{4+}, Mn^{7+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, Ni^{3+}, Ag^{+}, Sr^{2+}, Sn^{2+}, Sn^{4+} и Zn^{2+}. Атомы металлов могут включать оксид металла, такой как оксид железа, оксид марганца или оксид гадолиния.

Приемлемые красители включают любые коммерчески доступные красители, такие как, например, 5(6)-карбоксифлуоресцеин, малеимид IRDye 680RD или IRDye 800CW, красители на основе комплекса рутений/полипиридил и т. п.

К приемлемым флуорофорам относятся флуоресцеин изотиоцианат (FITC), флуоресцеин тиосемикарбазид, родамин, Texas Red, красители CyDye (например, Cy3, Cy5, Cy5.5), красители Alexa Fluor (например, Alexa488, Alexa555, Alexa594; Alexa647), флуоресцентные красители ближнего ИК-диапазона (NIR) (700-900 нм) и карбоцианиновые и аминостирильные красители.

Антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с обнаруживаемой меткой, может использоваться в качестве агента визуализации.

Белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с обнаруживаемой меткой, может использоваться в качестве агента визуализации.

Мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгированный с обнаруживаемой меткой, может использоваться в качестве агента визуализации.

В других вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой химиотерапевтический препарат, лекарственное средство, ингибирующий рост агент, токсин (например, токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, обладающий ферментативной активностью, или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т. е. радиоактивный конъюгат).

В других вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой дауномицин, доксорубицин, метотрексат, виндезин, бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, рицин, гелданамицин, мейтансиноиды или калихеамицин. Цитотоксический агент может индуцировать цитотоксический и цитостатический эффекты посредством механизмов, включающих связывание с тубулином, связывание с ДНК или ингибирование топоизомеразы.

В других вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой токсин с ферментативной активностью, такой как А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *sapaonaria officinali,* гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

В других вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой радионуклид, такой как ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y и ^{186}Re.

В других вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой долостатины или пептидные аналоги и производные долостатина, ауристатин или монометилауристатин фенилаланин. Примеры молекул описаны в патентах США № 5635483 и 5780588. Показано, что долостатины и ауристатины блокируют динамику микротрубочек, гидролиз ГТФ и деление ядра и клетки (Woyke et al (2001) Antimicrob Agents and Chemother. 45(12):3580–3584) и обладают противораковой и противогрибковой активностью. Функциональная группа лекарственного препарата долостатина или ауристатина может быть присоединена к антителу по изобретению, посредством N (амино) конца или С (карбоксильного) конца функциональной группы пептидного лекарственного средства (WO02/088172) или посредством любого цистеина, искусственно внедренного в антитело.

Белки, связывающие CD3ε, по изобретению могут быть конъюгированы с обнаруживаемой меткой с использованием известных способов.

В других вариантах осуществления выявляемая метка находится в комплексе с хелатирующим агентом.

В других вариантах осуществления обнаруживаемая метка конъюгирована с белками, связывающими CD3ε, по изобретению посредством линкера.

Обнаружтваемая метка или цитотоксический фрагмент могут быть связаны непосредственно, или опосредованно, с белками, связывающими CD3ε, по изобретению с

использованием известных способов. Подходящие линкеры известны в данной области техники и включают, например, простетические группы, нефенольные линкеры (производные N-сукцинимидилбензоатов; додекарборат), хелатирующие группы как макролитических, так и ациклических хелаторов, например производные 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10,-тетрауксусной кислоты (DOTA), производные диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), производные S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусной кислоты (NOTA) и производные 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (TETA), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), дифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные фтористые соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол) и другие хелатирующие группы. Подходящие пептидные линкеры хорошо известны.

В других вариантах осуществления белки, связывающие CD3ε, по изобретению удаляют из крови посредством почечного клиренса.

Наборы

В изобретении также предложен набор, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε.

В изобретении также предложен набор, включающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε.

В изобретении также предложен набор, включающий мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε.

Набор можно применять для терапевтических областей применения и в виде диагностических наборов.

Набор можно применять для обнаружения наличия CD3ε в образце.

В других вариантах осуществления набор содержит белок, связывающий CD3ε, по изобретению и реагенты для обнаружения белка, связывающего CD3ε. Набор может содержать один или более из других элементов: инструкцию по применению; другие реагенты, например метку, терапевтический агент или агент, используемый для хелатирования или иного сочетания, антитело для мечения, или терапевтический агент,

или радиозащитную композицию; устройства или другие материалы для подготовки антитела к введению; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для введения пациенту.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, находящийся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В других вариантах осуществления набор включает белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, находящийся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В других вариантах осуществления набор включает мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, находящийся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, находящийся в наборе, имеет метку.

В других вариантах осуществления белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, находящийся в наборе, имеет метку.

В других вариантах осуществления мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, находящийся в наборе, имеет метку.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, который содержит

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30;

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержащий SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 74.

Способы обнаружения CD3ε

В изобретении также предложен способ обнаружения CD3ε в пробе, включающий в себя получение пробы, приведение в контакт с пробой, содержащей

антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε по изобретению, и обнаружение связанного с CD3ε в пробе.

В других вариантах осуществления пробу можно получать из мочи, крови, сыворотки крови, плазмы крови, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, синовиальной жидкости, циркулирующих клеток, клеток, не связанных с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, резецированной хирургическим путем ткани, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т. п.

Антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε по изобретению, можно обнаружить с использованием известных способов. Примеры способов включают в себя прямое мечение антител с использованием флуоресцентных или хемилюминесцентных меток или радиоактивных меток или присоединение к антителам по изобретению легко обнаруживаемой функциональной группы, такой как биотин, ферменты или эпитопные метки. Примерами меток и функциональных групп являются рутений, ^{111}In-DOTA, ^{111}In-диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA), пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и бета-галактозидаза, полигистидин (HIS-метка), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители и красители Alexafluor®.

Антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, можно использовать в ряде анализов для обнаружения CD3ε в пробе. Примерами анализов являются анализ методом вестерн-блоттинга, радиоиммунологический анализ, поверхностный плазмонный резонанс, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммуноанализ, иммуногистохимический анализ, сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или твердофазный ИФА.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий любой белок, связывающий CD3ε по изобретению. Связывающий CD3ε белок включает антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε, белки, содержащие антигенсвязывающие домены, которые связываются CD3ε, мультиспецифические белки, которые содержат антигенсвязывающие домены, которые связывают CD3ε по настоящему изобретению.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий любой белок, связывающий CD3ε, или его фрагменты.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 23.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 24.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 27.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 28.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 29.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 30.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 74.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 65.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 66.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 67.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 68.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 69.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 70.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 71.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 72.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 73.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложена выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотид, который комплементарен полинуклеотидам, кодирующим CD3ε-связывающие белки по изобретению, или полинуклеотидам, которые гибридизуются в жестких условиях с полинуклеотидами, кодирующими CD3ε-связывающие белки по изобретению.

Полинуклеотиды, которые гибридизируются в жестких условиях, могут гибридизироваться в условиях высокой жесткости. Под «условиями высокой жесткости» понимается, что полинуклеотид специфически гибридизируется с целевой последовательностью (нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе) в степени, обнаружимой сильнее, чем неспецифическая гибридизация. Условия высокой жесткости включают условия, которые позволяют различить полинуклеотид с точно комплементарной последовательностью или полинуклеотид, содержащий только несколько разбросанных несовпадений из случайной последовательности, которая имеет несколько небольших областей (например, 3–12 оснований), которые соответствуют нуклеотидной последовательности. Такие небольшие области комплементарности легче расплавляются, чем полноразмерный комплемент из 14–17 или более оснований, и гибридизация с высокой жесткостью делает их легко различимыми. Условия относительно высокой жесткости будут включать, например, условия с низким содержанием соли и/или высокой температурой, такие как обеспечиваемые около 0,02–0,1 M NaCl или его эквивалентом, при температурах примерно 50–70 °C. Такие условия высокой строгости допускают незначительное, если таковое имеется, несоответствие

между последовательностью нуклеотидов и матрицей или цепью-мишенью. Как правило, считается, что условия можно сделать более жесткими путем добавления возрастающих количеств формамида.

Полинуклеотидные последовательности по изобретению могут быть функционально связаны с одним или более регуляторными элементами, такими как промотор или энхансер, которые позволяют экспрессировать нуклеотидную последовательность в предполагаемой клетке-хозяине. Полинуклеотид может представлять собой кДНК. Промотор может представлять собой сильный, слабый, специфичный к ткани, индуцибельный или специфичный к развитию промотор. Типичные промоторы, которые можно использовать, представляют собой гипоксантин-фосфорибозилтрансферазу (HPRT), аденозиндеаминазу, пируваткиназу, бета-актин, человеческий миозин, гемоглобин человека, креатин мышц человека и другие. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и являются приемлемыми для применения в описанных вариантах осуществления. Такие вирусные промоторы включают в себя немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна — Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. Также можно использовать индуцибельные промоторы, такие как промотор металлотионеина, индуцируемый тетрациклином промотор, индуцируемый доксициклином промотор, промоторы, которые содержат один или более интерферон-стимулируемых реагирующих элементов (ISRE), такие как протеинкиназа R 2',5'-олигоаденилатсинтетазы, гены Mx, ADAR1 и т. п.

В настоящем изобретении также предложен вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения. В настоящем изобретении также предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловирусов, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, приемлемые для введения синтетического полинуклеотида настоящего изобретения в данный организм или в данное генетическое окружение любым способом. Полинуклеотиды, кодирующие CD3ε-связывающие белки по изобретению, могут быть функционально связаны с контрольными последовательностями в экспрессионном(-ых) векторе(-ах), который(-ые) обеспечивает(-ют) экспрессию CD3ε-связывающих белков.

К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролирующие терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть встроена точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Экспрессионные векторы могут содержать межнуклеотидные связи природного происхождения или неприродного происхождения или оба типа связей. Неприродные или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора.

После введения вектора в соответствующего хозяина проводят инкубацию хозяина в условиях, приемлемых для высокоуровневой экспрессии CD3ε-связывающих белков по изобретению, кодируемых введенными полинуклеотидами. Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 *Mol. Cell. Biol.* 280 (1983).

Векторы в соответствии с настоящим описанием могут также содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В других вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть сшиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов (т. е. путем введения «спейсерных» нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть

расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

Векторы в соответствии с настоящим описанием могут быть кольцевым или линейными. Они могут быть получены с возможностью наличия системы репликации, функционирующей в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColE1, SV40, 2μ плазмиды, λ, вируса бычьей папилломы и т. п.

Рекомбинантные векторы экспрессии могут быть разработаны либо для транзиентной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для обоих типов. Кроме того, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

Дополнительно могут быть созданы рекомбинантные векторы экспрессии, включающие суицидальный ген. Используемый в данном документе термин «суицидальный ген» относится к гену, который заставляет клетку, экспрессирующую суицидальный ген, погибать. Суицидальный ген может быть геном, который придает чувствительность к агенту, например лекарственному средству, клетке, в которой экспрессируется ген, и заставляет клетку погибать, когда клетку приводят в контакт с агентом или она подвергается его воздействию. Суицидальные гены известны в данной области и включают в себя, например, ген тимидинкиназы (TK) вируса простого герпеса (HSV), цитозиндезаминазу, фосфорил пуриновых нуклеозидов. Векторы также могут содержать маркеры селекции, которые хорошо известны в данной области. Селективные маркеры включают в себя маркер положительной и отрицательной селекции. Маркерные гены включают гены резистентности к биоцидам, например гены резистентности к антибиотикам, тяжелым металлам и т. д., комплементации в ауксотрофном хозяине для обеспечения прототрофности и т. п. Примеры маркерных генов включают в себя гены резистентности к антибиотикам (например, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к пенициллину, ген резистентности к гистидинолу, ген резистентности к гистидинолу x), гены глутамин синтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловирной селекции или ген бактериальной пуриннуклеозидфосфорилазы для селекции по 6-метилпурину (Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)). Нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или сайт клонирования, может располагаться выше или ниже

нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий полипептид или сайт клонирования.

Примерами векторов, которые могут применяться, являются бактериальные: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, Ла-Холья, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция). Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia), pEE6.4 (Lonza) и pEE12.4 (Lonza). Дополнительные векторы включают в себя серии pUC (Fermentas Life Sciences, Глен Берни, штат Мэриленд, США), серии pBluescript (Stratagene, г. Ла-Холья, штат Калифорния, США), серии pET (Novagen, г. Мэдисон, штат Висконсин, США), серии pGEX (Pharmacia Biotech, г. Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США). Можно использовать векторы бактериофагов, такие как λGT10, λGT11, λEMBL4 и λNM1149, λZapII (Stratagene). Примеры векторов экспрессии растений включают pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии на животных включают pEUK-Cl, pMAM и pMAMneo (Clontech). Экспрессионный вектор может представлять собой вирусный вектор, например ретровирусный вектор, например гамма-ретровирусный вектор.азу, и нитроредуктазу.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 23.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 24.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 27.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 28.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 29.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 74.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 65.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 66.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 67.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 68.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 69.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 70.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 71.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 72.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 73.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 74.

В изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая один или более векторов по изобретению. Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую был встроен вектор. Следует понимать, что термин «клетка-хозяин» служит для обозначения не только конкретной заявленной клетки, но и потомства такой клетки, а

также стабильной клеточной линии, полученной из конкретной заявленной клетки. Так как в последующих поколениях могут возникать некоторые модификации вследствие либо мутации, либо воздействий среды, такое потомство может быть неидентичным исходной клетке, но оно также может быть охвачено термином «клетка-хозяин», используемым в настоящем документе. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, прокариотические, растительные клетки или клетки архей. Кишечная палочка (*Escherichia coli)*, бациллы, такие как сенная палочка (*Bacillus subtilis*), и другие энтеробактерии, такие как сальмонеллы, серратия и различные виды псевдомонад, являются примерами прокариотических клеток-хозяев. Для экспрессии также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Сахаромицеты (например, S. cerevisiae) и пихии являются примерами приемлемых дрожжевых клеток-хозяев. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышиные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATTC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1SV (Lonza Biologics, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

В изобретении также предложен способ получения CD3ε-связывающего белка по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях экспрессии CD3ε-связывающего белка и выделение CD3ε-связывающего белка, продуцируемого клеткой-хозяином. Известны способы получения белков и их очистки. После синтеза (химического или рекомбинантного) CD3ε-связывающие белки можно очищать в соответствии со стандартными процедурами, включающими в себя осаждение сульфатом аммония, применение аффинных колонок, колоночную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), гель-электрофорез и т. п. (см. по существу Scopes, Protein Purification (Springer- Verlag, N.Y., (1982)). Заявленный белок может быть по существу чистым, например чистым на по меньшей мере от около 80% до 85%, чистым на по меньшей мере от около 85% до 90%,

чистым на по меньшей мере от около 90% до 95%, чистым на по меньшей мере от около 98% до 99% или более, например не содержащим загрязнителей, таких как клеточный дебрис, макромолекулы и т. д., отличных от заявленного антитела.

Полинуклеотиды, кодирующие CD3ε-связывающие белки по изобретению, могут быть включены в векторы с применением стандартных способов молекулярной биологии. Трансформацию клетки-хозяина, культивирование, экспрессию и очистку антитела выполняют с применением хорошо известных способов.

Для получения полинуклеотидов по настоящему изобретению можно использовать модифицированные нуклеотиды. Примеры модифицированных нуклеотидов включают 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил) урацил, карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, N^6-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5″-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N^6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксизин, псевдоурацил, квеуозин, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N^6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил) урацил и 2,6-диаминопурин.

Фармацевтические композиции / введение

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая CD3ε-связывающий белок по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая белок, включающий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифический белок, включающий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает Cd3ε, и антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель.

Для терапевтического применения возможна подготовка CD3ε-связывающего белка по изобретению в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Стерилизацию проводят с использованием стандартных, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регуляторы pH и буферные агенты, стабилизирующие, загущающие, смазывающие и окрашивающие агенты и т. д.

Термин «фармацевтически приемлемый», используемый в данном документе в отношении фармацевтических композиций, обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и/или людей.

Способы лечения и варианты применения

В описании также предложен биспецифический или мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3ε, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген согласно настоящему изобретению, для применения в терапии.

В описании также предложен биспецифический или мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3ε, и второй антиненсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген согласно настоящему изобретению, для применения при лечении клеточного пролиферативного расстройства.

В описании также предложен биспецифический или мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3ε, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген согласно настоящему изобретению, для применения при лечении рака.

В описании также предложен биспецифический или мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3ε, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген согласно настоящему изобретению, для применения при производстве лекарственного средства для лечения рака.

В одном аспекте изобретение относится по существу к лечению испытуемого, подверженного риску развития рака. Изобретение также включает лечение злокачественного образования, при котором химиотерапия и/или иммунотерапия приводит к значительной иммуносупрессии, таким образом повышая риск развития рака у испытуемого.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у испытуемого, подверженного риску развития ракового состояния, включающий введение испытуемому антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε по изобретению, для лечения неракового состояния.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у испытуемого, подверженного риску развития ракового состояния, включающий введение белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε по изобретению, испытуемому для лечения неракового состояния.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у испытуемого, подверженного риску развития ракового состояния, включающий введение мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε по изобретению, испытуемому для лечения неракового состояния.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у испытуемого, подверженного риску развития ракового состояния, включающий введение иммуноконъюгата по изобретению испытуемому для лечения неракового состояния.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у испытуемого, подверженного риску развития ракового состояния, включающий

введение испытуемому фармацевтической композиции по изобретению для лечения неракового состояния.

В изобретении также предложен способ лечения рака у испытуемого, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, испытуемому для лечения рака, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

В изобретении также предложен способ лечения рака у испытуемого, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, испытуемому для лечения рака, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 74.

Еще одним аспектом изобретения является способ лечения клеточного пролиферативного расстройства у испытуемого, нуждающегося в этом, включающий введение испытуемому терапевтически эффективного количества биспецифического или мультиспецифического белка, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3ε, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления испытуемому вводят биспецифический или мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3ε, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, согласно настоящему изобретению.

В любом из предшествующих применений или способов клеточное пролиферативное расстройство представляет собой злокачественное новообразование. В других вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака пищевода, рака желудка, рака тонкого кишечника, рака толстого кишечника, колоректального рака, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, неходжкинской лимфомы (НХЛ), В-клеточной лимфомы, В-клеточного лейкоза,

множественной миеломы, рака почки, рака предстательной железы, рака печени, рака головы и шеи, меланомы, рака яичников, мезотелиомы, глиобластомы, В-клеточной карциномы, ДВКЛ из В-клеток герминативного центра (GCB), ДВКЛ из активированных В-клеток (ABC), фолликулярной лимфомы (ФЛ), мантийноклеточный лимфомы (МКЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического лимфоидного лейкоза (ХЛЛ), лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), лимфоплазмоцитарной лимфомы (ЛЛ), макроглобулинемии Вальденстрема (МВ), лимфомы центральной нервной системы (CNSL), лимфомы Беркитта (ЛБ), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфомы из клеток маргинальной зоны, лейкоза ворсистых клеток, лимфомы/лейкоза из клеток селезенки, не поддающегося классификации, диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки, варианта волосатоклеточного лейкоза, макроглобулинемии Вальденстрема, заболевания тяжелых цепей, плазмоклеточной миеломы, солитарной плазмоцитомы кости, экстраоссальной плазмоцитомы, экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT-лимфомы), нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, детской нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, детской фолликулярной лимфомы, первичной кожной лимфомы из клеток фолликулярного центра, Т-клеточной/гистиоцитарной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, первичной ДВКЛ ЦНС, первичной кожной ДВКЛ, ножного типа, EBV-положительного ДВКЛ пожилых, ДВКЛ, ассоциированной с хроническим воспалением, лимфогранулематоза, первичной медиастинальной (тимусной) В-крупноклеточной лимфомы. Внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфомы, ALK-позитивной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, плазмобластной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, возникающей при HHV8-ассоциированной многоочаговой болезни Кастлемана, первичной выпотной лимфомы: В-клеточной лимфомы, не поддающегося классификации, с признаками, промежуточными между диффузной В-крупноклеточной лимфомой и лимфомой Беркитта, и В-клеточной лимфомы, не поддающейся классификации, с признаками, промежуточными между диффузной В-крупноклеточной лимфомой, классической лимфомой Ходжкина, и амилоидоза легких цепей.

В других вариантах осуществления рак представляет собой рак пищевода. В других вариантах осуществления рак представляет собой аденокарциному, например

метастатическую аденокарциному (например, колоректальную аденокарциному, аденокарциному желудка или аденокарциному поджелудочной железы).

В другом аспекте изобретение относится к набору, содержащему: (a) композицию, содержащую любой из указанных выше биспецифических или мультиспецифических белков, содержащую первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3ε, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, по настоящему изобретению, и (b) листок-вкладыш в упаковке, содержащий инструкции по введению композиции испытуемому для лечения или задержки прогрессирования клеточного пролиферативного расстройства.

В любом из предшествующих применений или способов испытуемый может представлять собой человека.

Комбинированные терапии

CD3ε-связывающие белки по изобретению можно вводить в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом.

В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго средства лечения, таким образом, существует перекрытие с точки зрения введения. Иногда в настоящем документе это называется как «одновременная» или «сопутствующая доставка». В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе второго средства лечения, или же второе средство лечения снижает симптомы в большей степени, чем наблюдалось бы в том случае, если бы второе средство лечения вводили в отсутствие первого средства лечения, или же аналогичная ситуация наблюдается для первого средства лечения. В других вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что снижение симптома или другого параметра, связанного с заболеванием, является более значительным, чем наблюдалось бы в том случае, если бы одно средство лечения доставляли в отсутствие другого. Доставка может осуществляться таким образом, что эффект первого вводимого средства лечения все еще будет определяться во время доставки второго средства.

CD3ε связывающие белки, описанные в настоящем документе, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент могут вводиться одновременно в одной или в отдельных композициях, либо вводиться последовательно. В случае последовательного введения CD3ε связывающие белки, описанные в настоящем документе, можно вводить первыми, а дополнительное средство можно вводить вторым, либо же порядок введения может быть обратным.

Варианты осуществления:

В данном изобретении предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

1. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает кластер дифференцировки 3ε (CD3ε), причем антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 24;

b. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 27;

c. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 28;

d. HCDR1, HCDR2 HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 29; или

e. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 30.

2. Выделенный белок по варианту осуществления 1, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

a. SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно;

b. SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно; или

c. SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

3. Выделенный белок по варианту осуществления 1 или 2, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv, (scFv) 2, Fv, Fab, F(ab')2, Fd, dAb или VHH.

4. Выделенный белок по варианту осуществления 3, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой Fab.

5. Выделенный белок по варианту осуществления 3, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой VHH.

6. Выделенный белок по варианту осуществления 3, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv.

7. Выделенный белок по варианту осуществления 6, причем scFv содержит, от N- до C-конца, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

8. Выделенный белок по п. 7, причем L1 содержит:

a. около 5–50 аминокислот;

b. около 5–40 аминокислот;

c. около 10–30 аминокислот; или

d. около 10–20 аминокислот.

9. Выделенный белок по варианту осуществления 7, причем L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

10. Выделенный белок по варианту осуществления 9, причем L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 37 или 64.

11. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1–10, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

12. Выделенный белок по варианту осуществления 11, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит:

a. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

b. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

c. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

d. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

e. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

13. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1–12, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 74.

14. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 23 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 103.

15. Выделенный белок по варианту осуществления 14, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv, (scFv)2, Fv, Fab, F(ab')2, Fd, dAb или VHH.

16. Выделенный белок по варианту осуществления 15, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой Fab.

17. Выделенный белок по варианту осуществления 15, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой VHH.

18. Выделенный белок по варианту осуществления 15, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv.

19. Выделенный белок по варианту осуществления 18, причем scFv содержит, от N- до C-конца, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

20. Выделенный белок по п. 19, причем L1 содержит:

a. около 5–50 аминокислот;

b. около 5–40 аминокислот;

c. около 10–30 аминокислот; или

d. около 10–20 аминокислот.

21. Выделенный белок по варианту осуществления 20, причем L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

22. Выделенный белок по варианту осуществления 21, причем L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 37 или 64.

23. Выделенный белок по варианту осуществления 14–22, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

24. Выделенный белок по варианту осуществления 23, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит:

a. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

b. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

c. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

d. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

e. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30;

25. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1–24, причем выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок.

26. Выделенный белок по варианту осуществления 25, причем мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок.

27. Выделенный белок по варианту осуществления 25, причем мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок.

28. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1–27, дополнительно содержащий константную область иммуноглобулина (Ig) или фрагмент константной области Ig.

29. Выделенный белок по варианту осуществления 28, причем фрагмент константной области Ig содержит Fc-область.

30. Выделенный белок по варианту осуществления 28, причем фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

31. Выделенный белок по варианту осуществления 28, причем фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

32. Выделенный белок по варианту осуществления 28, причем фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

33. Выделенный белок по варианту осуществления 28, причем фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнирной области, домен CH2 и домен CH3.

34. Выделенный белок по варианту осуществления 28, причем фрагмент константной области Ig содержит шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

35. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 28–34, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

36. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 28–34, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

37. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 28–36, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig посредством второго линкера (L2).

38. Выделенный белок по варианту осуществления 37, причем L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

39. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 28–38, причем мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, отличный от CD3ε.

40. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 39, причем антиген клеточной поверхности представляет собой опухолеассоциированный антиген.

41. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 39–40, причем клеточный антиген выбран из группы, состоящей из родственной калликреину пептидазы 2 (hK2), человеческого лейкоцитарного антигена G (HLA-G) и дельта-подобного белка 3 (DLL3).

42. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 28–41, причем константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 изотип.

43. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 28–42, причем константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания белка с Fcγ-рецептором (FcγR).

44. Выделенный белок по варианту осуществления 43, причем по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания белка с FcγR, выбирают из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

45. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 28–42, причем константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR.

46. Выделенный белок по варианту осуществления 45, причем по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR, выбирают из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

47. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 43–46, причем FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

48. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 28–47, причем константная область Ig фрагмента константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни белка.

49. Выделенный белок по варианту осуществления 48, причем по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полувыведения белка, выбирают из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

50. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 28–49, причем указанный белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig.

51. Выделенный белок по варианту осуществления 40, причем по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области выбирали из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, T366L, F405W, K392L, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, T366L/K392L/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, L351Y/Y407V, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

52. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1–51 и фармацевтически приемлемый носитель.

53. Полинуклеотид, кодирующий выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1–51.

54. Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 53.

55. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 54.

56. Способ получения выделенного белка по любому из вариантов осуществления 1–51, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 55 в условиях, в которых белок экспрессируется, и выделение белка, продуцируемого клеткой-хозяином.

57. Способ лечения злокачественного новообразования у испытуемого, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела по любому из вариантов осуществления 1–51 испытуемому, нуждающемуся в этом, для лечения рака.

58. Способ по варианту осуществления 57, причем рак представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.

59. Способ по варианту осуществления 58, причем солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого, плоскоклеточный рак, глиому, рак молочной железы, рак почки, неоваскулярное нарушение, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК), рак поджелудочной железы, ренальный рак, рак уротелия или аденокарциному печени.

60. Способ по варианту осуществления 58, причем гематологическая злокачественная опухоль представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) или опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритических клеток (ОБПДК).

61. Способ по любому из вариантов осуществления 57–60, причем антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

62. Антиидиотипическое антитело, связывающееся с выделенным белком по любому из вариантов осуществления 1–51.

63. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на CD3ε (SEQ ID NO: 1), причем эпитоп представляет собой прерывающийся эпитоп, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 100, 101 и 102.

64. Выделенный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75, 76, 717, 718, 79, 80, 81, 82, 83, и 84.

65. Выделенный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 747, 748, 77, 78, 749, 750, 751, 752, 753 и 754.

66. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 75.

67. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 76.

68. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 717.

69. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 718.

70. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79.

71. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 80.

72. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 81.

73. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 82.

74. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 83.

75. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84.

76. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 747.

77. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 748.

78. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 77.

79. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 78.

80. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 749.

81. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 750.

82. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 751.

83. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 752.

84. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 753.

85. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 754.

86. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 86.

87. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 88.

88. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 90.

89. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 92.

90. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 94.

91. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 719 и 86.

92. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 719 и 88.

93. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 719 и 90.

94. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 719 и 92.

95. Выделенный белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 719 и 94.

Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из описанных в данном документе вариантов осуществления. Целью примеров является иллюстрация, а не ограничение описанных вариантов осуществления.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение и определение характеристик мАт к CD3

Антитела к CD3 получали с применением платформы трансгенных мышей линии Ablexis. Мыши линии Ablexis® производят антитела, имеющие вариабельные домены человека, связанные с доменами CH1 и CL человека, химерной человеческой/мышиной шарнирной областью и мышиными Fc-областями. В двух специфических штаммах, названных штаммами мышей Kappa и мышей Lambda Ablexis®, отсутствуют специфические мышиные последовательности, и они описаны в WO11/123708 и WO2003000737.

Мышей линии Ablexis иммунизировали TRCW5 (SEQ ID NO: 3), включая 13 мышей Kappa и 12 мышей Lambda. TRCW5 состоит из внеклеточной области CD3, слитого из 26 аминокислот, с внеклеточной областью CD3ε, как указано в Kim et al, JMB (2000) 302(4): 899–916. Этот полипептид имел на своем C-конце домен Fc IgG1 человека с C-концевой Avi-меткой, используемой для сайт-специфического биотинилирования (Fairhead & Howarth, Methods Mol Biol (2015); 1266: 171–184).

TRCW5 (SEQ ID NO: 3):

FKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGT
DIYKDKESTVQVHYRMGSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGSDGNEEMGGITQT
PYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQS
GYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGKGGGLNDIFEAQKIEWHE

Мышей иммунизировали два раза в неделю в течение 7 недель. В сутки 42 мышей иммунизировали для проведения гибридомного слияния путем введения 50 мкг TRCW5 и 50 мкг CD40 мАт в 8 мест, включая 6 подкожных и 2 внутрикожных инъекций. Для конечной иммунизации мышам вводили 20 мкл клеток Jurkat, T-клеточную линию, которая эндогенно экспрессирует рецепторный комплекс T-клеток, включая CD3ε (Schneider et al (1977) Int. J. Cancer, 19 (5): 621-6), при $4{,}74 \times 10^7$ клеток/мл.

У мышей извлекали лимфатические узлы и селезенки, а слияние проводили по когортам. Клетки лимфатических узлов подсчитывали и объединяли в соотношении 1 : 1 с клетками FO миеломы (ATCC (CRL-1646) и инкубировали в течение 10 суток при 37 °C перед скринингом антител. Затем супернатанты из слитых клеток гибридомы анализировали на связывание с TRCW5 с применением TRCW5, в том числе неспецифически иммобилизованного на планшете (ELISA, Thermo, кат. № 34022), или путем конъюгации стрептавидина с биотинилированным TRCW5 (SPARCL ELISA, Lumigen), в соответствии с инструкциями производителя. Твердофазный ИФА проводили с помощью планшета, покрытого 0,5 мкг/мл TRCW5 и 0,5 мкг/мл HVEM-Fc (R&D, кат. № 365-HV) в течение ночи при 4 °C. Планшеты блокировали добавлением 0,4% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение ночи при 4 °C. Планшеты промывали 1 × PBS с добавлением 0,02% (об./об.) Tween 20. В каждую лунку вносили 50 мкл супернатанта гибридомы и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Связанное антитело обнаруживали путем добавления Fc козьего антитела к мышиному IgG Fc, конъюгированному с пероксидазой хрена (Jackson, кат. № 115-036-071), разводили в соотношении 1 : 10 000 в блокирующем буфере с последующей инкубацией в течение 30 мин при комнатной температуре. Субстратный буфер 3, 3′, 5, 5′-тетраметилбензидин (TMB) (Thermo, кат. № 34022) добавляли в количестве 25 мкл/лунку и инкубировали в течение 10 мин в темноте. Реакции останавливали добавлением 4M H_2SO_4 в количестве 25 мкл/лунку. Люминесценцию считывали при 450 нм с помощью микропланшетного фотометра BioTek® Epoch2. Отбирали совпадения, имеющие сигнал по меньшей мере в 3 раза выше, чем фоновый.

Два формата анализа давали 426 совпадений (264 из твердофазного ИФА, 194 из твердофазного ИФА SPARCL, а 70 совпадений были идентифицированы в обоих анализах). Из этих 426 исходных совпадений было подтверждено 49, полученных методом твердофазного ИФА, и 32 полученных методом твердофазного ИФА SPARCL. Гибридомные слияния, соответствующие положительным связующим веществам, провели повторно и исследовали их способность связывать клетки Jurkat методом проточной цитометрии. Результаты предполагают, что три антитела, включая клон 003_F12, клон 036_E10 и клон 065_D03, продемонстрировали значительное связывание с клетками Jurkat, эндогенно экспрессирующими CD3, на основании среднего индекса флуоресценции (MFI, см. таблицу 4). Несмотря на подтверждение положительности клонов 003_F12 и 036_E10 (от человека/мышей линии Kappa) для легкой цепи человека/мышей линии Kappa с

помощью твердофазного ИФ, клон 065_D03 (от человека/мышей линии Lambda) был отрицательным для линии Lambda человека. Затем вариабельные гены этих трех клонов секвенировали.

Таблица 4. Средний индекс флуоресценции (MFI) для связывания выбранных клонов с клетками Jurkat

№ клона	MFI (относительные единицы измерения)
003_F12	176147
036_E10	43133
065_D03	136269
Без Ab	2075.61
10 нМ UCHT1	89214,29

Затем эти три клона подвергали скринингу на способность связывать первичные Т-клетки человека и яванского макака. Вкратце, первичные Т-клетки человека и яванского макака повторно суспендировали в количестве 1×10^6 клеток/мл в буфере для окрашивания в потоке и клетки высевали в концентрации 50000 клеток/лунку. В каждую лунку добавляли 50 мкл супернатанта гибридомы и смесь инкубировали на льду в течение 30 мин. После инкубации добавляли 200 мкл окрашивающего буфера и клетки осаждали центрифугированием при $300 \times G$ в течение 5 мин. Мышиное антитело к IgG, конъюгированное с Alexa-647, добавляли в концентрации 2 мкг/мл в буфер для окрашивания общего объема 50 мкл и инкубировали в течение 30 мин на льду. Добавляли 150 мкл окрашивающего буфера, а клетки осаждали центрифугированием при $300 \times G$ в течение 5 мин. Клетки повторно суспендировали в 30 мкл рабочего буфера, содержащего клетки, разведенные в соотношении 1 : 1000 с помощью зеленого красителя для окрашивания мертвых клеток Sytox, и проанализировали на платформе iQue Screener. Клетки гейтировали на FCS/SCS для удаления детрита. Синглеты гейтировали на SCS-A/SCS-H и из популяции синглетов гейтировали и выбирали живые клетки на канале с использованием BL1 канала для низкого-отрицательного зеленого окрашивания Sytox. Связывание CD3 оценивали путем сравнения исследуемых препаратов с отрицательным контролем с помощью геометрического среднего RL1 (Alexa-647). В этом анализе клон 065_D03 продемонстрировал самый высокий сигнал связывания с клетками (Фиг. 1А–1Б).

Таким образом, вариабельную область клона 065_D03 клонировали в каркас IgG1, в результате чего антитело стало называться CD3B815 (последовательности показаны в таблице 5). Проведенный повторный скрининг CD3B815 на связывание с клетками Jurkat продемонстрировал положительное связывание с клетками Jurkat.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности CD3B815.

Белки	Аминокислотные последовательности
CD3B815 Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 25)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKG LEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAED TAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CD3B815 Легкая цепь (SEQ ID NO: 26)	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLI KYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSNSWPY TFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Гуманизация и форматирование scFv CD3-связывающих доменов

Легкую цепь (LC) v-области CD3B815 гуманизировали в формате scFv. Вкратце, LC из CD3B815 была привита на зародышевую линию IGHV3-21*04 человека, и были идентифицированы два положения (Y49K и L78V, в соответствии с системой нумерации по Кэботу) обратных мутаций человек-мышь. В результате получили варианты с позициями Y49K или L78 V или как с Y49K, так и с L78V. LC из CD3B815 также содержала мотив NS, который повышает вероятность дезамидирования в положениях 92–93. Таким образом, несколько полученных вариантов также содержали N92G. Эти варианты и связанные с ними мутации описаны в таблице 6, а последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот VH и VL показаны в таблицах 7 и 8. Последовательности CDR приведены в таблицах 9–11.

Таблица 6. Мутации в гуманизированных вариантах scFv, определенные в соответствии с номенклатурой Кэбота.

Идентификация	**Описание**	**Мутации VL**

scFv		
CD3W234	CD3B815-HL-scFV, содержит VL мыши	нет
CD3W238	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	нет
CD3W241	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	L78V
CD3W242	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	Y49K
CD3W243	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	Y49K, L78V
CD3W244	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	L78V, N92G
CD3W245	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	Y49K, N92G
CD3W246	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	Y49K, L78V, N92G
CD3W247	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	N92G
CD3W248	CD3B815-HL-scFV, содержит VL мыши	N92G

Таблица 7. Аминокислотные последовательности VH и VL гуманизированных вариантов scFv.

Название связывающего домена	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
CD3B815	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSS	23	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK	119
CD3W244	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSS	23	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK	27

Название связывающего домена	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
CD3W245	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSS	23	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK	28
CD3W246	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSS	23	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK	24
CD3W247	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSS	23	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK	29
CD3W248	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSS	23	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIK	30

Таблица 8. Последовательности нуклеиновых кислот VH и VL гуманизированных вариантов scFv.

Название связывающего домена	Нуклеотидная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
CD3B815	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAG	113	GATATACTTCTTACCCAGAGTCCCGGCATCCTCTCCGTTAGCCCTGGG	120

Название связывающего домена	Нуклеотидная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
	CCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATT CACCTTCAGTAGAT ATAACATGAACTG GGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGC TGGAGTGGGTCTC ATCCATTAGTACTA GTAGTAATTACAT ATACTACGCAGAC TCAGTGAAGGGCC GATTCACCTTCTCC AGAGACAACGCCA AGAACTCACTGGA TCTGCAAATGAGC GGCCTGAGAGCCG AGGACACGGCTAT TTATTACTGTACGA GAGGCTGGGGGCC TTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCT GGTCACCGTCTCCT CA		GAGAGAGTCTCATTCT CATGCCGAGCCAGAC AGTCAATTGGTACCGC AATACACTGGTATCA ACAGCGGACCAATGG TTCTCCCCGACTTCTG ATAAAGTACGCATCA GAATCAATTAGTGGA ATACCATCAAGATTTA GTGGCTCAGGGAGTG GAACCGATTTTACTCT GACCATCAACTCAGT GGAATCTGAGGACAT TGCCGACTACTACTGT CAACAAAGCAATAGT TGGCCATATACCTTCG GAGGCGGAACTAAAT TGGAGATAAAA	
CD3W244	GAGGTGCAACTGG TGGAGTCTGGGGG AGGCCTGGTCAAG CCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATT CACCTTCAGTAGAT ATAACATGAACTG GGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGC TGGAGTGGGTCTC ATCCATTAGTACTA GTAGTAATTACAT ATACTACGCAGAC TCAGTGAAGGGCC GATTCACCTTCTCC AGAGACAACGCCA AGAACTCACTGGA TCTGCAAATGAGC GGCCTGAGAGCCG AGGACACGGCTAT	113	GACATCCAGATGACA CAGTCACCTTCTAGTT TGTCTGCTTCTGTAGG CGACCGTGTAACTATC ACCTGTCGAGCCCGTC AAAGTATTGGTACTGC CATTCACTGGTACCAA CAAAAACCTGGCAAA GCTCCAAAACTCTTGA TCTACTATGCCTCCGA AAGCATATCAGGGGT CCCAAGCAGATTCTCA GGCAGTGGCAGTGGC ACTGACTTCACTCTCA CCATTTCTAGCGTGCA ACCAGAGGACTTCGC CACTTATTACTGCCAA CAGTCAGGGAGCTGG CCCTACACCTTCGGCC AAGGTACAAAACTGG AGATCAAA	114

Название связывающего домена	Нуклеотидная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
	TTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA			
CD3W245	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGTAATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	113	GACATACAAATGACACAATCACCCTCTTCTCTTTCTGCAAGCGTTGGCGACCGTGTCACTATCACTTGTCGAGCCCGCCAGTCCATAGGTACTGCCATTCACTGGTATCAACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAACTCCTGATTAAGTATGCCAGCGAGAGCATTTCCGGCGTACCTTCAAGATTTTCCGGCTCCGGTAGTGGGACAGATTTCACTCTCACTATATCTAGCCTCCAACCAGAAGATTTCGCCACTTACTACTGTCAACAATCAGGTTCATGGCCTTACACTTTCGGCCAGGGGACAAAATTGGAGATCAAG	115
CD3W246	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTA	113	GACATCCAAATGACTCAATCACCTAGCAGCCTCTCCGCCTCCGTTGGAGATAGAGTGACAATAACTTGCCGAGCCCGGCAAAGTATCGGAACTGCTATTCACTGGTATCAACAAAAACCTGGAAAGGCACCTAAGCTCTTGATTAAATACGCTTCTGAGTCCATCTCCGGCGTGCCTTCACGATTC	116

Название связывающего домена	Нуклеотидная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
	GTAGTAATTACAT ATACTACGCAGAC TCAGTGAAGGGCC GATTCACCTTCTCC AGAGACAACGCCA AGAACTCACTGGA TCTGCAAATGAGC GGCCTGAGAGCCG AGGACACGGCTAT TTATTACTGTACGA GAGGCTGGGGGCC TTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCT GGTCACCGTCTCCT CA		AGCGGCAGCGGTAGT GGTACTGACTTTACCC TCACTATTAGTTCTGT TCAGCCAGAGGACTT CGCAACTTATTACTGC CAACAGAGTGGTTCCT GGCCATACACTTTTGG CCAGGGGACTAAATT GGAAATCAAA	
CD3W247	GAGGTGCAACTGG TGGAGTCTGGGGG AGGCCTGGTCAAG CCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATT CACCTTCAGTAGAT ATAACATGAACTG GGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGC TGGAGTGGGTCTC ATCCATTAGTACTA GTAGTAATTACAT ATACTACGCAGAC TCAGTGAAGGGCC GATTCACCTTCTCC AGAGACAACGCCA AGAACTCACTGGA TCTGCAAATGAGC GGCCTGAGAGCCG AGGACACGGCTAT TTATTACTGTACGA GAGGCTGGGGGCC TTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCT GGTCACCGTCTCCT CA	113	GACATCCAAATGACT CAAAGCCCCTCTAGTT TGAGTGCATCTGTAGG TGACCGGGTAACAAT CACCTGCCGTGCCCGG CAAAGTATAGGTACT GCAATCCACTGGTACC AGCAAAAACCCGGCA AAGCACCAAAGCTGC TCATATACTATGCTAG TGAGAGCATTTCTGGC GTTCCTAGTCGATTTT CTGGATCAGGGAGTG GAACTGATTTTACACT GACAATCAGCAGCCT CCAACCCGAAGACTT CGCCACCTACTATTGT CAGCAGTCTGGGTCCT GGCCTTACACATTCGG TCAAGGAACTAAATT GGAGATCAAA	117
CD3W248	GAGGTGCAACTGG TGGAGTCTGGGGG AGGCCTGGTCAAG	113	GACATTTTGCTGACAC AGAGCCCTGGTATCCT CTCAGTCAGTCCAGG	118

Название связывающего домена	Нуклеотидная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
	CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGTAATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA		GGAACGCGTTTCATTTAGCTGCCGTGCTCGACAGAGCATTGGGACCGCAATCCACTGGTACCAACAAAGAACTAACGGTTCACCACGGCTTTTGATTAAGTATGCCTCCGAATCCATCAGTGGCATTCCTAGTCGTTTTTCTGGATCAGGATCAGGCACCGACTTTACTCTCACAATTAATAGTGTCGAAAGTGAGGACATTGCAGACTATTATTGTCAGCAATCCGGTTCCTGGCCCTATACTTTTGGTGGTGGTACTAAGTTGGAAATTAAA	

Таблица 9. Последовательности CDR, определенные с применением разграничения по Кэботу.

	HCDR1 (SEQ ID NO:)	HCDR2 (SEQ ID NO:)	HCDR3 (SEQ ID NO:)	LCDR1 (SEQ ID NO:)	LCDR2 (SEQ ID NO:)	LCDR3 (SEQ ID NO:)
CD3 B815	RYNMN (6)	SISTSSNYIYYADSVKG (7)	GWGPFDY (8)	RARQSIGTAIH (9)	YASESIS (10)	QQSNSWPYT (121)
CD3 W244	RYNMN (6)	SISTSSNYIYYADSVKG (7)	GWGPFDY (8)	RARQSIGTAIH (9)	YASESIS (10)	QQSGSWPYT (11)
CD3 W245	RYNMN (6)	SISTSSNYIYYADSVKG	GWGPFDY (8)	RARQSIGTAIH (9)	YASESIS (10)	QQSGSWPYT (11)

		(7)				
CD3W246	RYNMN (6)	SISTSSNYIYYADSVKG (7)	GWGPFDY (8)	RARQSIGTAIH (9)	YASESIS (10)	QQSGSWPYT (11)
CD3W247	RYNMN (6)	SISTSSNYIYYADSVKG (7)	GWGPFDY (8)	RARQSIGTAIH (9)	YASESIS (10)	QQSGSWPYT (11)
CD3W248	RYNMN (6)	SISTSSNYIYYADSVKG (7)	GWGPFDY (8)	RARQSIGTAIH (9)	YASESIS (10)	QQSGSWPYT (11)

Таблица 10. Последовательности CDR, определенные с применением разграничения по Чотиа.

	HCDR1 (SEQ ID NO:)	HCDR2 (SEQ ID NO:)	HCDR3 (SEQ ID NO:)	LCDR1 (SEQ ID NO:)	LCDR2 (SEQ ID NO:)	LCDR3 (SEQ ID NO:)
CD3B815	GFTFSRY (12)	STSSNY (13)	GWGPFD (14)	RQSIGTA (15)	YAS (16)	SNSWPY (122)
CD3W244	GFTFSRY (12)	STSSNY (13)	GWGPFD (14)	RQSIGTA (15)	YAS (16)	SGSWPY (17)
CD3W245	GFTFSRY (12)	STSSNY (13)	GWGPFD (14)	RQSIGTA (15)	YAS (16)	SGSWPY (17)
CD3W246	GFTFSRY (12)	STSSNY (13)	GWGPFD (14)	RQSIGTA (15)	YAS (16)	SGSWPY (17)
CD3W247	GFTFSRY (12)	STSSNY (13)	GWGPFD (14)	RQSIGTA (15)	YAS (16)	SGSWPY (17)
CD3W248	GFTFSRY (12)	STSSNY (13)	GWGPFD (14)	RQSIGTA (15)	YAS (16)	SGSWPY (17)

Таблица 11. Последовательности CDR, определенные с применением разграничения по IMGT.

	HCDR1 (SEQ ID NO:)	HCDR2 (SEQ ID NO:)	HCDR3 (SEQ ID NO:)	LCDR1 (SEQ ID NO:)	LCDR2 (SEQ ID NO:)	LCDR3 (SEQ ID NO:)
CD3B815	GFTFSRYN	ISTSSNYI (19)	TRGWGPFDY	QSIGTA (21)	YAS (16)	QQSNSWPYT

	(18)		(20)			(123)
CD3W244	GFTFSRYN (18)	ISTSSNYI (19)	TRGWGPFDY (20)	QSIGTA (21)	YAS (16)	QQSGSWPYT (22)
CD3W245	GFTFSRYN (18)	ISTSSNYI (19)	TRGWGPFDY (20)	QSIGTA (21)	YAS (16)	QQSGSWPYT (22)
CD3W246	GFTFSRYN (18)	ISTSSNYI (19)	TRGWGPFDY (20)	QSIGTA (21)	YAS (16)	QQSGSWPYT (22)
CD3W247	GFTFSRYN (18)	ISTSSNYI (19)	TRGWGPFDY (20)	QSIGTA (21)	YAS (16)	QQSGSWPYT (22)
CD3W248	GFTFSRYN (18)	ISTSSNYI (19)	TRGWGPFDY (20)	QSIGTA (21)	YAS (16)	QQSGSWPYT (22)

На Фиг. 3 показано выравнивание областей VL CD3B815, CD3W244, CD3W245, CD3W246 и CD3W247. Консенсусную аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 103** определяли для области VL, а остатки CDR подчеркнуты.

SEQ ID NO: 103

DIQX_1TQSPX_2X_3LSX_4SX_5GX_6RV$X_7X_8X_9$CRARQSIGTAIHWYQQK$X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$PX_{14}LLIX_{15}YASESISGX_{16}PSRFSGSGSGTDFTLTIX_{17}SX_{18}QX_{19}EDX_{20}AX_{21}YYCQQSX_{22}SWPYTFGX_{23}GTKLEIK

где X_1 представляет собой L или M; X_2 представляет собой G или S; X_3 представляет собой I или S; X_4 представляет собой V или A; X_5 представляет собой P или V; X_6 представляет собой E или D; X_7 представляет собой S или T; X_8 представляет собой F или I; X_9 представляет собой S или T; X_{10} представляет собой T или P; X_{11} представляет собой N или G; X_{12} представляет собой G или K; X_{13} представляет собой S или A; X_{14} представляет собой R или K; X_{15} представляет собой K или Y; X_{16} представляет собой I или V; X_{17} представляет собой N или S; X_{18} представляет собой V или L; X_{19} представляет собой S или P; X_{20} представляет собой I или F; A_{21} представляет собой D или T; X_{22} представляет собой N или G; X_{23} представляет собой G или D.

Связывание гуманизированных вариантов scFv антител CD3 с CD3 после теплового шока.

Далее вариабельная область из CD3B815 была отформатирована в виде scFv в ориентации VH-VL с применением линкера GTEGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 64) (таблица 12) для экспрессии в E.coli, а затем скринирована на связывание с рекомбинантным CD3 (CD3W147, SEQ ID NO: 4), связывание с Т-клетками и термостабильность.

Таблица 12. Аминокислотные последовательности scFv-HL-E.c.

scFv	Аминокислотная последовательность
CD3W234-HL-E.c. (SEQ ID NO: 104)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGK GLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGTEGKSSGSGSESKST DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLL IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSNSWP YTFGGGTKLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W238-HL-E.c. (SEQ ID NO: 105)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGK GLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGTEGKSSGSGSESKST DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPK LLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNS WPYTFGQGTKLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W242-HL-E.c. (SEQ ID NO: 106)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGK GLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGTEGKSSGSGSESKST DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPK LLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNS WPYTFGQGTKLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W243-HL-E.c. (SEQ ID NO:107)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGK GLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGTEGKSSGSGSESKST DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPK LLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSN SWPYTFGQGTKLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W244-HL-E.c. (SEQ ID NO: 108)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGK GLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGTEGKSSGSGSESKST DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPK LLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSG SWPYTFGQGTKLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W245-HL-E.c. (SEQ ID NO: 109)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGK GLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGTEGKSSGSGSESKST

scFv	Аминокислотная последовательность
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPK LLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGS WPYTFGQGTKLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W246-HL-E.c. (SEQ ID NO: 110)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGK GLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGTEGKSSGSGSESKST DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPK LLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSG SWPYTFGQGTKLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W247-HL-E.c. (SEQ ID NO: 111)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGK GLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGTEGKSSGSGSESKST DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPK LLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGS WPYTFGQGTKLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W248-HL-E.c. (SEQ ID NO: 112)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGK GLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGTEGKSSGSGSESKST DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLL IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSGSWP YTFGGGTKLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS

CD3W147 (SEQ ID NO: 4):

QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNI GSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGSADDAKKDAAKK DDAKKDDAKKDGSQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGF LTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMGSGSLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTFPPSQEEMTK NQVSLRCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTKPVLDSDGSFRLESRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGGHHHHHH

Определяли связывание вариантов scFv антител к CD3 (таблица 7), экспрессированных в E. coli, с CD3. Вкратце, последовательности, кодирующие scFv, клонировали в вектор pADL™-22c, имеющий лидерную последовательность PelB для секреции (Antibody Design Labs, San Diego, CA). Клетки E. coli трансформировали с помощью плазмид и выращивали в течение ночи при 37 °C в среде для выращивания микроорганизмов 2xYT с добавлением 100 мкг/мл карбенициллина. Выращенные в течение ночи культуры применяли для инокуляции культур экспрессии объемом 5 мл и выращивали при 37 °C до OD_{600} ~ 2,0. Экспрессию белка индуцировали добавлением

1 мм IPTG, а культуры выращивали в течение ночи. После экспрессии клетки осаждали центрифугированием при 2200 × g в течение 5 мин, а супернатанты собирали и исследовали непосредственно с помощью анализа ИФА.

Для анализа ИФА биотинилированный CD3W147 (гомодимерный CD3εγ-Fc, SEQ ID NO: 4) иммобилизовали на планшете в концентрациях от 0,039 мкг/мл до 2,5 мкг/мл в двукратных разведениях с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 45 мин. Планшеты блокировали 1 × PBS-Tween с добавлением 3% молока. Планшеты промывали 1 × PBS-Tween. Супернатанты E. coli нагревали до 60 °C, затем охлаждали до комнатной температуры для оценки их термостабильности. В каждый планшет добавляли супернатант и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Связанный scFv определяли с помощью куриной анти-HA-пероксидазы хрена, разбавленной 1:1000, при 50 мкл на лунку, а затем определяли с помощью субстрата хемилюминесценции (Sigma, кат. № 11582950001). Все испытанные молекулы scFv, полученные из CD3B815, связывали CD3ε (Фиг. 2).

Затем молекулы scFv исследовали на их способность связывать Т-клетки методом проточной цитометрии. Вкратце, человеческие Т-клетки размораживали и повторно суспендировали в буферном растворе для поточного окрашивания в количестве 1 × 10^6 клеток/мл и высевали при 50 000 клеток/лунку. Для сравнения связывания применяли положительный контроль (CD3W36), содержащий антитело к CD3 SP34, отформатированное как LH-scFv, и отрицательный контроль (B23) – scFv, нацеленный на F-гликопротеин из респираторно-синцитиального вируса. Супернатанты E. coli добавляли в количестве 150 мкл/лунку и инкубировали при 4 °C в течение 1 ч. После инкубации планшеты промывали буфером для окрашивания, а обнаружение проводили с помощью антитела к His, конъюгированного с Alexa-647, разведенного 1:100 в буфере для окрашивания с инкубацией в течение 30 мин при 4 °C. После инкубации в смесь добавляли 200 мкл рабочего буфера IntelliCytt, и клетки повторно суспендировали в 30 мкл рабочего буфера, содержащего зеленый краситель Sytox в соотношении 1 : 1000, и анализировали на платформе iQue Screener. Гейтинг и анализ проводили как указано выше. Все молекулы scFv, полученные из CD3B815, показывали средние индексы флуоресценции, соответствующие связыванию Т-клеток (**таблица 13**).

Таблица 13. Т-клеточное связывание гуманизированных молекул scFv.

Белки	**MFI (n = 2)**
CD3W245-HL-E.c.	178140,0
CD3W244-HL-E.c.	165631,0
CD3W246-HL-E.c.	153895,8
CD3W238-HL-E.c.	137380,4
CD3W242-HL-E.c.	126105,9
CD3W243-HL-E.c.	111347,6
CD3W241-HL-E.c.	120793,8
CD3W247-HL-E.c.	110932,3
CD3W248-HL-E.c.	60437,1
CD3W234-HL-E.c.	66790,3
B23	51,8
CD3W36	99451,6

Идентификация эпитопа

Эпитоп на CD3 определяли методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS). Клон антитела OKT3 использовали в качестве контроля для эксперимента HDX, поскольку его эпитоп на CD3ε известен на основании кристаллической структуры (идентификатор PDB 1SY6) (Kjer-Nielsen, L. *et al.; Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7675-7680).

Эксперимент по обмену данными для HDX-MS. Реакцию обмена инициировали путем смешивания 10 мкл 10 мкм CD3W220 (SEQ ID NO: 5), который был образован из CD3εγ, слитого с линкерной областью 26-аа, слитой с сывороточным альбумином, с 1,2 молярным избытком лиганда или без него, и 30 мкл H_2O или дейтерированного буфера (20 мм MES, pH 6,4, 150 мм NaCl в 95% D_2O или 20 мм Tris, pH 8,4, 150 мм NaCl в 95% D_2O). Реакционную смесь инкубировали в течение 15, 50, 150, 500 или 1500 сек при 1,2 °C. Ионообменный раствор гасили путем добавления 40 мкл охлажденной 8 М мочевины, 1 М TCEP, pH 3,0, и сразу анализировали.

CD3W220 (CD3εγ-HSA-6xHis) (SEQ ID NO: 5):

QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNI
GSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGSADDAKKDAAKK
DDAKKDDAKKDGSQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGF
LTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMGGGSDAHKSEVAHRF

KDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMC
TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPK
LDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTD
LTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEN
DEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAK
TYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALL
VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
EKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQI
KKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAA
SQAALGLGGGSHHHHHHHH

Общая процедура получения данных HDX-MS. Подготовку образцов HDx-MS проводили с помощью автоматизированной системы HDx (LEAP Technologies, г. Морристилл, штат Северная Каролина). Колонки и насосы; протеаза, протеаза типа XIII (протеаза из Aspergillus saitoi, тип XIII) /пепсин (масс./масс., 1 : 1; 2,1 × 30 мм) (NovaBioAssays Inc., Вобурн, штат Массачусетс); обращенно-фазная предколонка ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (2,1 мм × 5 мм) (Waters, Милфорд, штат Массачусетс), аналитическая колонка Accucore C18 (2,1 мм × 100 мм) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс); и LC насос, VH-P10-A (Thermo Fisher Scientific). Параметры загрузочного насоса (из колонки с протеазой в предколонку) были установлены следующим образом: скорость потока 600 мкл/мин, 99% воды, 1% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты. Настройки градиентного насоса (от предколонки к аналитической колонке): от 8% до 28% ацетонитрила в 0,1% водной муравьиной кислоте в течение 20 мин при 100 мкл/мин.

Сбор данных МС. Анализы методом масс-спектрометрии проводили с использованием масс-спектрометра LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) с температурой капилляра 275 °C, разрешением 150 000 и диапазоном масс (масса/заряд) 300–1800.

Извлечение данных HDX-MS. Приложение BioPharmma Finder 3.0 (Thermo Fisher Scientific) использовали для идентификации пептидов недейтерированных образцов перед проведением экспериментов HDX. Для экстракции значений центроидов из MS файлов необработанных данных для проведения экспериментов HDX использовали программу HDExaminer версии 2.5 (Sierra Analytics, г. Модесто, штат Калифорния).

Анализ данных HDX-MS. Извлеченные данные HDX-MS дополнительно анализировали в Excel. Все временные точки обмена (при pH 6,4 или pH 8,4 при 1,2 °C) преобразовывали в эквивалентные временные точки при pH 7,4 и 23 °C (например, 15 сек при pH 6,4 и 1,2 °C эквивалентны 0,15 сек при pH 7,4 и 23 °C; таблица 14).

Таблица 14. Условия реакции HDX и продолжительность обмена в зависимости от временных точек обмена с поправкой на pH 7,4 и 23 °C.

Время, регулируемое при pH 7,4, 23 °C (сек)	pH 6,4 1,2 °C (сек)	pH 8,4 1,2 °C (сек)
0,015	-----	-----
0,05	-----	-----
0,15	15	-----
0,5	50	-----
1,5	150	-----
5	500	-----
15	1500	15
50	-----	50
150	-----	150
500	-----	500
1500	-----	1500

Результаты. Инкубация KLCB91, биспецифические антитела, содержащие CD3W245 в качестве плеча против CD3 (описанного в примере 3) с рекомбинантным CD3ε (SEQ ID NO: 5) приводила к различным паттернам общей защиты и степеней защиты в конкретных сегментах антигена. Как KLCB91, так и OKT3 защищали прерывистые сегменты (Фиг. 4), указывая на конформационные неидентичные эпитопы. Защищенные сегменты сопоставлялись с кристаллической структурой CD3ε (PDB 1SY6) для визуализации связывающих эпитопов в трех измерениях.

В соответствии с кристаллической структурой OKT3, связанной с CD3ε (Uniprot ID P07766), было обнаружено, что эпитоп OKT3 состоит из пептидов, покрывающих остатки 29–37, 79–84 и 87–89 CD3ε (SEQ ID NO: 5 и Фиг. 4). CD3W245, связанный с эпитопом, частично перекрывающимся с OKT3, включал аминокислотные остатки 29–37 (PQYPGSEIL, SEQ ID NO: 100), 55–63 (GSDEDHLSL, SEQ ID NO: 101) и 79–84 (PRGSKP, SEQ ID NO: 102) CD3ε (SEQ ID NO: 5 и Фиг. 4).

Пример 2. Получение антител к родственной калликреину пептидазе 2 (hK2) и scFv

Получение антител посредством гуманизации исходного антитела m11B6.

Исходное мышиное антитело m11B6 к родственной калликреину пептидазе 2 (hK2) было описано Väisänen et al (Clinical Chemistry 50:9, 1607–1617 (2004)). Гуманизированный 11B6 (упоминаемый в настоящем документе как hu11B6) был получен и описан в патенте США № 9,345,782 и патенте США № 10,100,125.

Конструирование hu11B6 было инициировано для создания дополнительных антител к HK2 с улучшенными свойствами, такими как улучшенная термостабильность. Позиции остатков были идентифицированы в каркасах hu11B6, которые потенциально могут быть изменены для улучшения термостабильности hu11B6 с помощью моделирования. Идентифицированные позиции представляли собой остатки P41, I49, M70 и A88 в VH и S80, L82, A88 и Y91 в VL (нумерация остатков в соответствии с аминокислотными последовательностями hu11B6_VH **SEQ ID NO: 124** и hu11B6_VL **SEQ ID NO: 125**).

В ориентации VH-линкер-VL были сформированы двоичные комбинаторные библиотеки scFv, в которых одна из вариабельных областей представляла собой комбинаторную библиотеку, а вторая — родительскую hu11B6 VH или VL. Линкерную последовательность **GGSEGKSSGSGSESKGGS (SEQ ID NO: 31)** применяли для конъюгации областей VH/VL. Сконструированные scFv экспрессировали в *E. coli,* а полученные scFv в супернатантах тестировали на предмет связывания с hK2 человека методом твердофазного ИФА и сравнивали со связыванием hu11B6. Любые новые варианты, демонстрирующие связывание с hu11B6, консолидировали и дополнительно исследовали на предмет связывания с hK2 человека после инкубации супернатантов при 55°C, 60°C и 65°C в течение 10 минут. Молекулы, сохраняющие сопоставимое связывание с hu11B6 после инкубации при 55°C, 60°C и 65°C и улучшенную термостабильность помещали в матрицу в обеих ориентациях (VH-линкер-VL; VL-линкер-VH) и преобразовывали в scFv млекопитающих для дальнейшего определения характеристик.

Кроме того, другая гуманизация исходной мышиной 11B6 выполнялась в соответствии с подходом, описанным Singh et al (MAbs. 2015;7(4):778-91) с обширными вариациями зародышевой линии и тщательным скринингом вариантов для повышения

термостабильности. На основании сохранения последовательностей для адаптации каркасной области выбрали зародышевую линию тяжелой цепи IGHV4-30 человека и зародышевую линию легкой цепи IGKV3D-11. Дифференцированная библиотека scFv конструировалась с остатками, содержащими выбранный набор соматических сайтов гипермутации и вариации мышиной/человеческой зародышевой линии. Варианты клонировали и экспрессировали в E. coli, как описано выше. Супернатанты подвергали скринингу при различных температурах в единичных измерениях методом твердофазной ИФА для повышения термостабильности. В качестве родительского контроля использовали химерный Fab мышиного/человеческого 11B6. Клон KL2B359, который сохранил связывающую активность, аналогичную мышиному 11B6 и значение Tm, равное 67°C, преобразовали в scFv-Fc для дополнительного профилирования. Аффинность (K_D) KL2B359 к hK2, измеренная методом SPR, составляла ~ 0,7–1 нм. HCF3-LCD6, HCG5-LCB7, KL2B357, KL2B358 и KL2B360 также получали в результате этой кампании и дополнительно характеризовали на основании функциональности.

Получение антител с использованием трансгенных мышей (Ablexis®) и трансгенных крыс (OmniRat®), экспрессирующих локусы иммуноглобулина человека.

Крысы OmniRat® содержат химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента V_Hs, все человеческие сегменты D и J_H в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом C_H), а также полностью человеческие локусы IgL (12 Vκs, связанных с Jκ-Cκ, и 16 Vλs, связанных с Jλ-Cλ). (см. например, Osborn, et al. (2013) J Immunol 190(4): 1481-1490). Соответственно, крысы демонстрируют сниженную экспрессию крысиного иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации для создания высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных антител IgG с полностью человеческими вариабельными областями. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в WO14/093908.

Мышей линии Ablexis® (описано в примере 1) и крыс линии OmniRat® иммунизировали растворимым полноразмерным белком KLK2 (человеческий белок калликреин-2 6-His).

человеческий белок калликреин-2 6-His (SEQ ID NO: 355):

VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDSSHDLMLL
RLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLRPRSLQCVSLHYSEKVT
EFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHY
RKWIKDTIAANPHHHHHH

Лимфоциты от мышей линии Abblexis и крыс линии OniRats экстрагировали из лимфатических узлов и проводили слияния по когортам. Клетки объединяли и сортировали на основании экспрессии CD138. Скрининг гибридомы проводили в формате миниатюрного MSD с высокой пропускной способностью с использованием растворимого антигена к hK2. Было установлено, что приблизительно более 300 образцов способны связывать hK2. Связывание более 300 образцов супернатанта антител к hKLK2 с белком KLK2 человека измеряли методом оценки кинетики одиночного цикла с помощью чувствительного элемента Biacore 8K SPR. Кроме того, образцы супернатанта исследовали на связывание с белком KLK3 человека. Параллельно также тестировали супернатанты на связывание с клеточными линиями, экспрессирующими KLK2, линией VCap и отрицательной клеточной линией DU145 методом проточной цитометрии. Выбранные вещества, связывающие клетки, стимулировали для конверсии scFv как в ориентации VH-VL, так и в ориентации VL/VH, а также в тестах оценки термостабильности, как описано выше. KL2B413, KL2B30, KL2B53 и KL2B242 получали в результате иммунизации мышей линии Abblexis. KL2B467 и KL2B494 получали в результате иммунизации крыс линии OmniRat.

Антитела, полученные посредством различных кампаний иммунизации и гуманизации, описанных выше, экспрессировали в формате Fab, формате мАт, формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или формате scFv в ориентации VL-линкер-VH и дополнительно анализировали, как описано ниже. Линкерную последовательность SEQ ID NO: 31, описанную выше, использовали для конъюгирования областей VH/VL.

Определение структурных характеристик антител к KLK2

В настоящем документе представлены вариабельные домены антитела и фрагменты антител scFv, которые демонстрировали наивысшую эффективность при внутриклеточном анализе. Вариабельные домены экспрессировали в формате Fab, формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или формате scFv в ориентации VL-линкер-VH.

Вариабельные домены VH, VL и CDR

В **таблице 15** приведены аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к hK2. В таблице **16** показаны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к hK2 по Кэботу. В **таблице 17** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбранных антител к hK2 по Кэботу. В **таблице 18** показы HCDR1, HCDR2 и HCDR3 AbM выбранных антител к hK2 по AbM. В **таблице 19** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител к hK2 по AbM. В **таблице 20** обобщена последовательность вариабельного домена и SEQ ID NO выбранных антител к hK2. В **таблице 21** показан белок и ДНК SEQ ID NO для областей VH и VL.

Таблица 15. Аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к hK2.

Название мАт	Название по VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Название по VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
m11B6	m11B6_VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	126	m11B6_VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWYRQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIK	127
h11B6	hu11B6_VH	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	124	hu11B6_VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	125
HCF3-LCD6	HCF3_VH	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA	128	LCD6_VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSL	129

Название мАт	Название по VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Название по VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
		WNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS			MHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	
HCG5-LCB7	HCG5_VH	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	130	LCB7_VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	131
KL2B357	KL2B357_VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	132	KL2B357_VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	133
KL2B358	KL2B358_VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	134	KL2B358_VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	135
KL2B359	KL2B359_VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA	136	KL2B359_VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSL	135

Название мАт	Название по VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Название по VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
		WNWIRQFPGKR LEWIGYISYSGS TTYNPSLKSRVT ISRDTSKNQFSL KLSSVTAADTA VYYCATGYYY GSGFWGQGTLV TVSS			MHWYQQKPGQ PPRLLIYAASNV ESGIPARFSGSG SGTDFTLTISSV EPEDFAVYFCQ QTRKVPYTFGG GTKVEIK	
KL2B360	KL2B360_VH	QVQLQESGPGL VKPSQTLSLTCT VSGNSITSDYA WNWIRQFPGKG LEWIGYISYSGS TTYNPSLKSRVT ISRDTSKNQFSL KLSSVTAADTA VYYCATGYYY GSGFWGQGTLV TVSS	132	KL2B360_VL	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSCR ASESVEYFGTSL MHWYQQKPGQ PPRLLIYAASNV ESGIPARFSGSG SGTDFTLTISSV EPEDFAVYFCQ QTRKVPYTFGG GTKVEIK	135
KL2B413	KL2B413_VH	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTFSSYW MTWVRQAPGK GLEWVANIKQD GSERYYVDSVK GRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCARD QNYDILTGHYG MDVWGQGTTV TVSS	137	KL2B413_VL	EIVLTQSPSFLSA SVGDRVTITCRA SQGISSYLSWYQ QKPGKAPKLLIY ATSTLQSGVPSR FSGSGSGTEFTL TISSLQPEDFAT YYCQQLNSYPR TFGQGTKVEIK	138
KL2B30	KL2B30_VH	QVQLQESGPGL VKPSETLSLTCT VSGGSISSYYWS WIRQPPGKGLE WIGYIYYSGSTN YNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLK LSSVTAADTAV YYCAGTTIFGV VTPNFYYGMDV WGQGTTVTVSS	139	KL2B30_VL	DIQMTQSPSFLS ASVGDRVTITCR ASQGISSYLAW YQQKPGKAPKF LIYAASTLQSGV PSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDF ATYYCQQLNSY PLTFGGGTKVEI K	140
KL2B53	KL2B53_VH	EVQLVESGGGV VQPGRSLRLSC	141	KL2B53_VL	DIVMTQSPSSLS ASVGDRVTITCR	142

Название мАт	Название по VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Название по VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
		VASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVED SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSS			ASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIK	
KL2B242	KL2B242_VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS	143	KL2B242_VL	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	144
KL2B467	KL2B467_VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS	145	KL2B467_VL	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV	146
KL2B494	KL2B494_VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSS	147	KL2B494_VL	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL	148

Название мАт	Название по VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Название по VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
KL2B242 LC_C33S	KL2B242_VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS	143	KL2B242_LC_C33S_VL	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	358

Таблица 16. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к KLK2 по Кэботу.

	HCDR1 по Кэботу		HCDR2 по Кэботу		HCDR3 по Кэботу	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
m11B6	SDYAWN	149	YISYSGSTTYSPSLKS	150	GYYYGSGF	151
hu11B6	SDYAWN	149	YISYSGSTTYNPSLKS	152	GYYYGSGF	151
HCF3-LCD6	SDYAWN	149	YISYSGSTTYNPSLKS	152	GYYYGSGF	151
HCG5-LCB7	SDYAWN	149	YISYSGSTTYNPSLKS	152	GYYYGSGF	151
KL2B357	SDYAWN	149	YISYSGSTTYNPSLKS	152	GYYYGSGF	151
KL2B358	SDYAWN	149	YISYSGSTTYNPSLKS	152	GYYYGSGF	151
KL2B359	SDYAWN	149	YISYSGSTTYNPSLKS	152	GYYYGSGF	151
KL2B360	SDYAWN	149	YISYSGSTTYNPSLKS	152	GYYYGSGF	151
KL2B413	SYWMT	153	NIKQDGSERYYVDSV	154	DQNYDILTGHYGMD	155

			KG		V	
KL2B30	SYYWS	156	YIYYSGSTNYNPSLKS	157	TTIFGVVTPNFYYGMDV	158
KL2B53	SYDIH	159	IISYDGSKKDYTDSVKG	160	ESGWSHYYYYGMDV	161
KL2B242	SYYWS	162	RLYVSGFTNYNPSLKS	163	DSGNYWGWFDP	164
KL2B467	YYGMH	165	FISYDGSNKYYADSVKG	166	LPYSGSYWAFDY	167
KL2B494	HYAMS	168	TIGGSGGSTYYADSVKG	169	PHIVMVTALLYDGMDV	170

Таблица 17. Аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбранных антител к hK2 по Кэботу.

	LCDR1 по Кэботу		LCDR2 по Кэботу		LCDR3 по Кэботу	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
m11B6	RASESVEYFGTSLMH	171	AASNVES	172	QQTRKVPYT	173
hu11B6	KASESVEYFGTSLMH	174	AASNRES	175	QQTRKVPYT	173
HCF3-LCD6	KASESVEYFGTSLMH	174	AASNRES	175	QQTRKVPYT	173
HCG5-LCB7	KASESVEYFGTSLMH	174	AASNRES	175	QQTRKVPYT	173
KL2B357	RASESVEYFGTSLMH	171	AASNVES	172	QQTRKVPYT	173
KL2B358	RASESVEYFGTSLMH	171	AASNVES	172	QQTRKVPYT	173
KL2B359	RASESVEYFGTSLMH	171	AASNVES	172	QQTRKVPYT	173
KL2B360	RASESVEYFGTSLMH	171	AASNVES	172	QQTRKVPYT	173
KL2B413	RASQGISSYLS	176	ATSTLQS	177	QQLNSYPRT	178
KL2B30	RASQGISSYLA	182	AASTLQS	183	QQLNSYPLT	184
KL2B53	RASQDISNYLA	179	AASTLHS	180	QKYNSAPYT	181
KL2B242	SGDQLGENYAC	185	QDSKRPS	186	QAWDNSIVV	187
KL2B467	GGDNIGSKSVH	720	DNSDRPS	721	QVWDSSSDHP	193

					VV	
KL2B494	GGNNIGSKSVH	191	DDSDRPS	192	QVWDSSSDHVV	188

Таблица 18. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 мАт выбранных антител к hK2 по AbM.

	HCDR1 AbM		HCDR2 AbM		HCDR3 AbM	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO:
m11B6	GNSITSDYAWN	194	YISYSGSTT	195	GYYYGSGF	151
hu11B6	GNSITSDYAWN	194	YISYSGSTT	195	GYYYGSGF	151
HCF3-LCD6	GNSITSDYAWN	194	YISYSGSTT	195	GYYYGSGF	151
HCG5-LCB7	GNSITSDYAWN	194	YISYSGSTT	195	GYYYGSGF	151
KL2B357	GNSITSDYAWN	194	YISYSGSTT	195	GYYYGSGF	151
KL2B358	GNSITSDYAWN	194	YISYSGSTT	195	GYYYGSGF	151
KL2B359	GNSITSDYAWN	194	YISYSGSTT	195	GYYYGSGF	151
KL2B360	GNSITSDYAWN	194	YISYSGSTT	195	GYYYGSGF	151
KL2B413	GFTFSSYWMT	189	NIKQDGSERY	190	DQNYDILTGHYGMDV	155
KL2B30	GGSISSYYWS	202	YIYYSGSTN	203	TTIFGVVTPNFYYGMDV	158
KL2B53	GFTFSSYDIH	196	IISYDGSKKD	197	ESGWSHYYYYGMDV	161
KL2B242	GGSISSYYWS	198	RLYVSGFTN	199	DSGNYWGWFDP	164
KL2B467	GFTFSYY	200	FISYDGSNKY	201	LPYSGSYWAFDY	167
KL2B494	GFTFSHYAMS	204	TIGGSGGSTYY	205	PHIVMVTALLYDGMDV	206

Таблица 19. Аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 мАт выбранных антител к hK2 по AbM.

	LCDR1 AbM		LCDR2 AbM		LCDR3 AbM	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO:

m11B6	RASESVEYFGTSLMH	171	AASNVES	172	QQTRKVPYT	173
hu11B6	KASESVEYFGTSLMH	174	AASNRES	175	QQTRKVPYT	173
HCF3-LCD6	KASESVEYFGTSLMH	174	AASNRES	175	QQTRKVPYT	173
HCG5-LCB7	KASESVEYFGTSLMH	174	AASNRES	175	QQTRKVPYT	173
KL2B357	RASESVEYFGTSLMH	171	AASNVES	172	QQTRKVPYT	173
KL2B358	RASESVEYFGTSLMH	171	AASNVES	172	QQTRKVPYT	173
KL2B359	RASESVEYFGTSLMH	171	AASNVES	172	QQTRKVPYT	173
KL2B360	RASESVEYFGTSLMH	171	AASNVES	172	QQTRKVPYT	173
KL2B413	RASQGISSYLS	176	ATSTLQS	177	QQLNSYPRT	178
KL2B30	RASQGISSYLA	182	AASTLQS	183	QQLNSYPLT	184
KL2B53	RASQDISNYLA	179	AASTLHS	180	QKYNSAPYT	181
KL2B242	SGDQLGENYAC	185	QDSKRPS	186	QAWDNSIVV	187
KL2B467	GGDNIGSKSVH	720	DNSDRPS	192	QVWDSSSDHPVV	193
KL2B494	GGNNIGSKSVH	191	DDSDRPS	192	QVWDSSSDHVV	188

Таблица 20. Аминокислотные последовательности вариабельных доменов выбранных антител к hK2

Антитело	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
m11B6	HCDR1	SDYAWN	149
	HCDR2	YISYSGSTTYSPSLKS	150
	HCDR3	GYYYGSGF	151
	LCDR1	RASESVEYFGTSLMH	171
	LCDR2	AASNVES	172
	LCDR3	QQTRKVPYT	173
	VH (m11B6_VH)	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYFCATGYYY	126

Антитело	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
		GSGFWGQGTLVTVSS	
	VL (m11B6_VL)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWYRQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIK	127
h11B6	HCDR1	SDYAWN	149
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	152
	HCDR3	GYYYGSGF	151
	LCDR1	KASESVEYFGTSLMH	174
	LCDR2	AASNRES	175
	LCDR3	QQTRKVPYT	173
	VH (hu11B6_VH)	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	124
	VL (hu11B6_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	125
HCF3-LCD6	HCDR1	SDYAWN	149
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	152
	HCDR3	GYYYGSGF	151
	LCDR1	KASESVEYFGTSLMH	174
	LCDR2	AASNRES	175
	LCDR3	QQTRKVPYT	173
	VH (HCF3_VH)	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	128
	VL (LCD6_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	129
HCG5-LCB7	HCDR1	SDYAWN	149
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	152
	HCDR3	GYYYGSGF	151
	LCDR1	KASESVEYFGTSLMH	174

Антитело	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
	LCDR2	AASNRES	175
	LCDR3	QQTRKVPYT	173
	VH (HCG5_VH)	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA WNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSR VTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYY YGSGFWGQGTLVTVSS	130
	VL (LCB7_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFG QGTKLEIK	131
KL2B357	HCDR1	SDYAWN	149
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	152
	HCDR3	GYYYGSGF	151
	LCDR1	RASESVEYFGTSLMH	171
	LCDR2	AASNVES	172
	LCDR3	QQTRKVPYT	173
	VH (KL2B357_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA WNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRV TISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYY GSGFWGQGTLVTVSS	132
	VL (KL2B_357_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSL MHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFG GGTKVEIK	133
KL2B358	HCDR1	SDYAWN	149
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	152
	HCDR3	GYYYGSGF	151
	LCDR1	RASESVEYFGTSLMH	171
	LCDR2	AASNVES	172
	LCDR3	QQTRKVPYT	173
	VH (KL2B358_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA WNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRV TISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYY GSGFWGQGTLVTVSS	134
	VL (KL2B_358_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSL MHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSG SGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGG	135

Антитело	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
		TKVEIK	
KL2B359	HCDR1	SDYAWN	149
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	152
	HCDR3	GYYYGSGF	151
	LCDR1	RASESVEYFGTSLMH	171
	LCDR2	AASNVES	172
	LCDR3	QQTRKVPYT	173
	VH (KL2B359_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	136
	VL (KL2B_359_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	135
KL2B360	HCDR1	SDYAWN	149
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	152
	HCDR3	GYYYGSGF	151
	LCDR1	RASESVEYFGTSLMH	171
	LCDR2	AASNVES	172
	LCDR3	QQTRKVPYT	173
	VH (KL2B360_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	132
	VL (KL2B_360_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	135
KL2B413	HCDR1	SYWMT	153
	HCDR2	NIKQDGSERYYVDSVKG	154
	HCDR3	DQNYDILTGHYGMDV	155
	LICDR1	RASQGISSYLS	176
	LCDR2	ATSTLQS	177
	LCDR3	QQLNSYPRT	178
	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM	137

Антитело	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
	(KL2B413_VH)	TWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVSS	
	VL (KL2B_413_VL)	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK	138
KL2B30	HCDR1	SYYWS	156
	HCDR2	YIYYSGSTNYNPSLKS	157
	HCDR3	TTIFGVVTPNFYYGMDV	158
	LCDR1	RASQGISSYLA	182
	LCDR2	AASTLQS	183
	LCDR3	QQLNSYPLT	184
	VH (KL2B30_VH)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS	139
	VL (KL2B30_VL)	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK	140
KL2B53	HCDR1	SYDIH	159
	HCDR2	IISYDGSKKDYTDSVKG	160
	HCDR3	ESGWSHYYYYGMDV	161
	LCDR1	RASQDISNYLA	179
	LCDR2	AASTLHS	180
	LCDR3	QKYNSAPYT	181
	VH (KL2B53_VH)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSS	141
	VL (KL2B53_VL)	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIK	142
KL2B242	HCDR1	SYYWS	162
	HCDR2	RLYVSGFTNYNPSLKS	163

Антитело	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
	HCDR3	DSGNYWGWFDP	164
	LCDR1	SGDQLGENYAC	185
	LCDR2	QDSKRPS	186
	LCDR3	QAWDNSIVV	187
	VH (KL2B242_VH)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS	143
	VL (KL2B242_VL)	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	144
KL2B467	HCDR1	YYGMH	165
	HCDR2	FISYDGSNKYYADSVKG	166
	HCDR3	LPYSGSYWAFDY	167
	LCDR1	GGDNIGSKSVH	191
	LCDR2	DNSDRPS	721
	LCDR3	QVWDSSSDHPVV	193
	VH (KL2B467_VH)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS	145
	VL (KL2B467_VL)	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV	146
KL2B494	HCDR1	HYAMS	168
	HCDR2	TIGGSGGSTYYADSVKG	169
	HCDR3	PHIVMVTALLYDGMDV	170
	LCDR1	GGNNIGSKSVH	191
	LCDR2	DDSDRPS	192
	LCDR3	QVWDSSSDHVV	188
	VH (KL2B494_VH)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSS	147

Антитело	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
	VL (KL2B494_VL)	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL	148

Таблица 21. SEQ ID NO последовательностей белка и ДНК доменов VH и VL выбранных антител hK2.

Антитело	Белок VH SEQ ID NO:	Белок VL, SEQ ID NO:	кДНК VH с SEQ ID NO:	кДНК VL с SEQ ID NO:
m11B6	126	127	225	237
hu11B6	124	125	226	238
HCF3-LCD6	128	129	227	239
HCG5-LCB7	130	131	228	240
KL2B357	132	133	229	241
KL2B358	134	135	230	242
KL2B359	139	135	231	242
KL2B360	132	135	229	242
KL2B413	137	138	230	243
KL2B30	139	140	231	244
KL2B53	141	142	234	245
KL2B242	143	144	361	246
KL2B467	145	146	362	247
KL2B494	147	148	235	236

SEQ ID NO:225 (кДНК VH m11B6)

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCTGGACCCGGACTTGTTAAACCAAGTCAGTCTCTGTCCCTGACCTGTACCGTCACCGGCAACAGCATCACAAGCGATTACGCATGGAACTGGATCAGGCAGTTCCCTGGAAATCGACTCGAATGGATGGGCTACATTTCATACTCCGGTTCAACCACTTACTCTCCATCCTTGAAATCTAGGTTCAGCATCACCCGTGATACCTCAAAGAACCAATTTTTTCTGCAACTGAATAGCGTAACTCCAGAGGACAC

AGCCACATATTTCTGCGCCACTGGGTATTACTATGGCTCAGGTTTCTGGGGTCAG
GGCACTCTCGTCACCGTCAGCAGC

SEQ ID NO: 226 (кДНК VH hu11B6)

CAGGTCCAACTGCAAGAGAGCGGACCGGGCCTGGTAAAGCCATCCGACAC
ATTGTCCCTGACGTGTGCGGTAAGTGGAAACTCTATCACTAGCGACTATGCGTGG
AATTGGATAAGACAACCGCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGATAGGATATATCAGC
TATTCCGGTTCTACGACATACAATCCTTCCCTGAAAAGCAGAGTCACTATGTCAC
GCGACACGTCCAAGAATCAGTTCTCATTGAAATTGTCATCCGTAACGGCCGTTGA
CACTGCGGTTTATTATTGCGCAACCGGATATTACTACGGCTCTGGTTTTTGGGGAC
AGGGAACACTTGTTACTGTTAGTTCA

SEQ ID:NO 227 (кДНК VH HC3-LCD6)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGCGACA
CCCTGAGCCTGACCTGCGCCGTGAGCGGCAACAGCATCACCAGCGACTACGCCTG
GAACTGGATCCGCCAGTTCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCAG
CTACAGCGGCAGCACCACCTACAACCCAAGCCTGAAGAGCCGCGTCACCATCAG
CCGCGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCCCTGT
GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCACCGGCTACTACTACGGCAGCGGCTTCTGG
GGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 228 (кДНК VH HCG5-LCB7)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGCGACA
CCCTGAGCCTGACCTGCGCCGTGAGCGGCAACAGCATCACCAGCGACTACGCCTG
GAACTGGATCCGCCAGTTCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACATCAG
CTACAGCGGCAGCACCACCTACAACCCAAGCCTGAAGAGCCGCGTCACCATCAG
CCGCGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCCCTGT
GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCACCGGCTACTACTACGGCAGCGGCTTCTGG
GGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 229 (кДНК VH KL2B357, KL2B360)

CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGAC
CCTGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGA
ACTGGATTCGGCAGTTCCCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTA
CTCCGGTTCCACCACCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGC
GACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATA
CCGCCGTGTACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACA
GGGCACACTGGTTACCGTGTCTAGT

SEQ ID NO: 230 (кДНК VH KL2B358)

CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGAC
CCTGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGA
ACTGGATTCGGCAGCCACCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTA
CTCCGGTTCCACCACCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGC
GACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATA
CCGCCGTGTACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACA
GGGCACACTGGTTACCGTGTCTAGT

SEQ ID NO: 231 (кДНК VH KL2B359)

CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGAC
CCTGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGA
ACTGGATTCGGCAGTTCCCTGGCAAGCGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTA
CTCCGGTTCCACCACCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGC
GACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATA
CCGCCGTGTACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACA
GGGCACACTGGTTACCGTGTCTAGT

SEQ ID NO: 232 (кДНК VH KL2B413)

GAGGTGCAACTTGTGGAGAGCGGCGGAGGTCTGGTCCAACCCGGAGGAAG
TCTCCGTCTCTCCTGTGCTGCTAGTGGCTTCACTTTCAGCTCATATTGGATGACAT
GGGTGAGACAAGCCCCAGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTAGCTAACATTAAACAGG
ACGGCTCCGAACGGTACTATGTTGATTCTGTGAAGGGACGGTTCACTATATCCAG
GGATAATGCAAAAAATTCACTCTATCTTCAAATGAACTCACTCAGAGCAGAGGAC
ACTGCCGTGTATTATTGCGCCAGGGATCAAAATTATGACATACTGACCGGTCATT
ATGGAATGGATGTTTGGGGCCAGGGAACAACCGTTACCGTCTCAAGT

SEQ ID NO:233 (кДНК VH KL2B30)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAC
CCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTATTGGAGCT
GGCTCCGGCAGCCCGCCGGGTCGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTTTATATGTCAG
TGGGTTCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCTTGTCACTAGAC
CCGTCCAGGAACCAGTTGTCCCTGAAACTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGG
CCGTATATTATTGTGCGGGAGATAGTGGGAACTACTGGGGTTGGTTCGACCCCTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 234 (кДНК VH KL2B53)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGACATACACT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATTTCATATGA
TGGAAGTAAAAAAGACTATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTTGAGGA
CTCGGCTGTGTATTCCTGTGCGAGAGAAAGTGGCTGGTCCCACTACTACTATTAC
GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

SEQ ID NO: 361 (кДНК VH KL2B242)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAC
CCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTATTGGAGCT
GGCTCCGGCAGCCCGCCGGGTCGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTTTATATGTCAG
TGGGTTCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCTTGTCACTAGAC
CCGTCCAGGAACCAGTTGTCCCTGAAACTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGG
CCGTATATTATTGTGCGGGAGATAGTGGGAACTACTGGGGTTGGTTCGACCCCTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 724 (кДНК VH KL2B467)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTTACTATGGCATGCACT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTATATCATATGA
TGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA
GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCCCACCTCCCTTATAGTGGGAGCTACTGGGCCTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCTTCA

SEQ ID NO: 235 (кДНК VH KL2B494)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCATTATGCCATGAGCT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTGGTGGTA
GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACCTCATATTGTAATGGTGACTGCTCTTCTCT
ACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 237 (кДНК VL m11B6)

GACATTGTGCTGACACAGAGTCCAGCATCCTTGGCAGTATCTTTGGGGCAG
CGGGCAACAATTTCATGCCGTGCATCTGAAAGTGTGGAGTATTTTGGAACTTCTC

TTATGCACTGGTATCGCCAGAAGCCTGGGCAGCCTCCCAAACTCCTTATATATGC
CGCTTCCAACGTGGAGTCCGGAGTACCAGCACGCTTTTCCGGCTCTGGGTCCGGC
ACAGACTTTTCCCTCAATATCCAACCTGTTGAAGAAGACGATTTTTCCATGTATTT
TTGCCAACAGACACGCAAGGTTCCATATACATTCGGCGGCGGCACTAAACTTGAG
ATCAAA

SEQ ID NO: 238 (кДНК VL hu11B6)

GACATAGTCTTGACTCAGAGCCCGGATTCCCTTGCTGTGTCTCTGGGAGAA
CGAGCTACGATCAACTGCAAGGCAAGTGAATCCGTAGAATACTTCGGGACATCAT
TGATGCATTGGTATCAACAGAAACCGGGGCAACCGCCCAAATTGCTGATATATGC
GGCTAGTAATAGAGAATCAGGAGTACCGGATAGGTTTAGTGGTTCAGGATCAGG
TACAGATTTCACCCTGACAATAAGTAGCTTGCAAGCCGAAGACGTAGCAGTGTAT
TACTGCCAACAAACCCGAAAGGTGCCATATACGTTTGGACAGGGTACAAAGTTG
GAAATCAAA

SEQ ID NO: 239 (кДНК VL HCF3-LCD6)

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAG
CGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCGAGAGCGTGGAGTACTTCGGCACCAGCCT
GATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCTG
CCAGCAACCGCGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCCAGAGCGTGCAGGCCGAGGACGTCTCCGTGTACTTCTG
CCAGCAGACCCGCAAGGTGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCA
AG

SEQ ID NO: 240 (кДНК VL HCG5-LCB7)

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAG
CGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCGAGAGCGTGGAGTACTTCGGCACCAGCCT
GATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCTG
CCAGCAACCGCGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGGCCGAGGACGTCGCCGTGTACTACT
GCCAGCAGACCCGCAAGGTGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATC
AAG

SEQ ID NO: 241 (кДНК VL KL2B357)

GACATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGACTCTCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAG
AGAGCCACCATCAACTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTC
TGATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACGC
CGCCTCCAACGTGGAATCTGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGC

ACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCTCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACT
TCTGTCAGCAGACCCGGAAGGTGCCCTACACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGG
AAATCAAG

SEQ ID NO: 242 (кДНК VL KL2B358, KL2B359, KL2B360)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAG
AGAGCCACCCTCTCTTGTAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTCT
GATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAGACTGCTGATCTACGCC
GCCTCCAACGTCGAATCTGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCAC
AGACTTTACCCTGACCATCTCCTCCGTGGAACCCGAGGATTTCGCTGTGTACTTTT
GCCAGCAGACCCGGAAGGTGCCCTACACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAA
TCAAG

SEQ ID NO: 243 (кДНК VL KL2B413)

GAAATCGTACTGACCCAGTCCCCTTCTTTCTTGAGTGCATCAGTTGGGGAT
AGAGTGACCATTACTTGTAGAGCATCTCAAGGTATTTCTTCATACTTGTCTTGGTA
TCAACAAAAACCTGGCAAGGCACCCAAACTCTTGATCTACGCCACCTCTACATTG
CAAAGTGGGGTTCCTTCTAGGTTTTCAGGCTCCGGCTCTGGTACCGAGTTCACCCT
CACTATAAGCAGTCTCCAACCTGAAGATTTCGCTACTTATTATTGTCAGCAGCTTA
ATTCTTATCCCCGAACCTTTGGTCAAGGAACTAAGGTCGAGATCAAA

SEQ ID NO: 244 (кДНК VL KL2B30)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGT
ATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTT
GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCAC
TCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG
CTTAATAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

SEQ ID NO: 245 (кДНК VL KL2B53)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTT
GCACTCTGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT
CTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGT
ATAACAGTGCCCCGTACACTTTTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

SEQ ID NO: 246 (кДНК VL KL2B242)

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGAGAGACA
GCCAGCATCACCTGCTCTGGAGATCAATTGGGGGAAAATTATGCTTGCTGGTATC
AGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTATCAAGATAGTAAGCGGCC
CTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTG
ACCATCAGCGGGACCCAGGCTCTGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGG
ACAACAGTATTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

SEQ ID NO: 247 (кДНК VL KL2B467)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCCGGGCAGACG
GCCAGTATTACCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATAATAGCGACCGGC
CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGACCACGGCCACCCT
GACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTG
GGATAGTAGTAGTGATCATCCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTC
CTA

SEQ ID: 235 (ДНК KLK2B494_VH)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCATTATGCCATGAGCT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTGGTGGTA
GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACCTCATATTGTAATGGTGACTGCTCTTCTCT
ACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID: 236 (ДНК KLK2B494_VL)

TCTTCTGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACG
GCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCGGC
CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCT
GACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTG
GGATAGTAGTAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

Консенсусные последовательности VH и VL

На **Фиг.** 5 показано выравнивание последовательностей доменов VH mu11B6, hu11B6, KL2B357, KL2B358, KL2B359, KL2B360, HC3 и HCG5. На **Фиг.** 6 показано выравнивание последовательностей доменов VL mu11B6, hu11B6, KL2B357, KL2B358,

KL2B359, KL2B360, LDC6 и LCB7. Консенсусную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 356 и SEQ ID NO: 357 определяли для доменов VH и VL, соответственно. Остатки HCDR и LCDR выделены подчеркиванием.

SEQ ID NO: 356

QVQLQESGPGLVKPSX_1TLSLTCX_2VSGNSITSDYAWNWIRQX_3PGKX_4LEWX_5GYISYSGSTT

YNPSLKSRVTX_6SRDTSKNQFSLKLSSVTX_7X_8DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

где X_1 представляет собой D или Q; X_2 представляет собой A или T; X_3 представляет собой P или F; X_4 представляет собой G или R; X_5 представляет собой I или M; X_6 представляет собой I или M; X_7 представляет собой A или P; X_8 представляет собой V или A.

SEQ ID NO: 357

X_1IVLTQSPX_2X_3LX_4X_5SX_6GERATX_7X_8CX_9ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPX_{10}LLIYAASNX_{11}

ESGX_{12}PX_{13}RFSGSGSGTDFTLTIX_{14}S$X_{15}X_{16}$QX_{17}ED$X_{18}X_{19}$VYX$_{20}$CQQTRKVPYTFGX_{21}GTKX_{22}EIK

где $\times_1$ представляет собой D или E; X_2 представляет собой D или A; X_3 представляет собой S или T; X_4 представляет собой A или S; X_5 представляет собой V или L; X_6 представляет собой L или P; X_7 представляет собой I, V или L; X_8 представляет собой N или S; X_9 представляет собой R или K; X_{10} представляет собой K или R; X_{11} представляет собой V или M; X_{12} представляет собой V или I; X_{13} представляет собой A или D; X_{14} представляет собой O или S; X_{15} представляет собой L или V; X_{16} представляет собой Q или E; X_{17} представляет собой P или A; X_{18} представляет собой F или V; X_{19} представляет собой A или S, X_{20} представляет собой Y или F; X_{21} представляет собой Q или G; и X_{22} представляет собой L или V.

Fab-Fc и scFv

Специфические области VH/VL hK2 конструировали как VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и VL-CL и экспрессировали как IgG2 или IgG4 или конструировали как scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH. Линкер, используемый в scFv, представлял собой линкер **SEQ ID NO: 31**, описанный выше. ScFv применяли для получения биспецифических антител, как описано в примере 3.

В **таблице 22** приведены аминокислотные последовательности выбранных антител к hK2 в формате мАт. В **таблице 23** приведены аминокислотные последовательности LC выбранных антител к hK2 в формате мАт. В **таблице 24** приведен сводный обзор HC и LC ДНК SEQ ID NO выбранных антител к hK2 в формате мАт. В **таблице 25** показаны аминокислотные последовательности выбранных scFv в ориентациях VH-линкер-VL или VL-линкер-VH.

Таблица 22. Аминокислотная последовательность HC (VH-CH1-линкер-CH2-CH3) выбранных антител к hK2 в формате мАт.

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ KLK2	БЕЛОК HC, SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ HC
m11B6_HC	207	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWI RQFPGNRLEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKN QFFLQLNSVTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVT VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSST WPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCP APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTN NGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVE RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
h11B6_HC	208	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSK NQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
KL2B30_HC	210	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ PPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ KLK2	БЕЛОК HC, SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ HC
		DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
K2B53_HC	211	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVR QAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMDV WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
KL2B242_HC	212	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLR QPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRN QLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
KL2B467_HC	213	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWV RQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYW GQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
KL2B494_HC	219	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWV RQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDG

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ KLK2	БЕЛОК HC, SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ HC
		MDVWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

Таблица 23. Аминокислотные последовательности LC (VL-CL) выбранных антител к hK2 в формате мАт (Fab-Fc).

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ KLK2	БЕЛОК LC SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ LC
m11B6_LC	214	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHW YRQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLN IQPVEEDDFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIKRADAA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
h11B6_LC	215	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMH WYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B30_LC	221	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQ KPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B53_LC	222	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQ KPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B242_L	223	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQK

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ KLK2	БЕЛОК LC SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ LC
C		PGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ ALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
KL2B467_LC	224	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRV EAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
KL2B494_LC	220	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRV EAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Таблица 24. SEQ ID NO последовательностей кДНК HC и LC выбранных антител к hK2

Антитело	Белок HC, SEQ ID NO:	Белок LC SEQ ID NO:	кДНК HC с SEQ ID NO:	кДНК LC с SEQ ID NO:
m11B6	207	214	248	255
hu11B6	208	215	249	256
KL2B30	210	221	250	257
KL2B53	211	222	251	258
KL2B242	212	223	252	259
KL2B467	213	224	253	260
KL2B494	219	220	254	261

SEQ ID NO: 248 (кДНК HC m11B6)

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCTGGACCCGGACTTGTTAAACCAAGTCAGTCT
CTGTCCCTGACCTGTACCGTCACCGGCAACAGCATCACAAGCGATTACGCATGGA
ACTGGATCAGGCAGTTCCCTGGAAATCGACTCGAATGGATGGGCTACATTTCATA
CTCCGGTTCAACCACTTACTCTCCATCCTTGAAATCTAGGTTCAGCATCACCCGTG
ATACCTCAAAGAACCAATTTTTTCTGCAACTGAATAGCGTAACTCCAGAGGACAC
AGCCACATATTTCTGCGCCACTGGGTATTACTATGGCTCAGGTTTCTGGGGTCAG

GGCACTCTCGTCACCGTCAGCAGCGCCAAAACAACAGCACCAAGTGTCTATCCAC
TGGCCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGT
CAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCC
AGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCA
GCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGT
GGCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCC
CACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGA
CCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAG
CCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAG
ATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCAT
AGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACC
AGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCC
CAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCAC
AGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCT
GACCTGCATGGTCACCGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAAC
AACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGAT
GGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAA
AGAAATAGCTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGA
CTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 249 (кДНК HC hu11B6)

CAGGTCCAACTGCAAGAGAGCGGACCGGGCCTGGTAAAGCCATCCGACAC
ATTGTCCCTGACGTGTGCGGTAAGTGGAAACTCTATCACTAGCGACTATGCGTGG
AATTGGATAAGACAACCGCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGATAGGATATATCAGC
TATTCCGGTTCTACGACATACAATCCTTCCCTGAAAAGCAGAGTCACTATGTCAC
GCGACACGTCCAAGAATCAGTTCTCATTGAAATTGTCATCCGTAACGGCCGTTGA
CACTGCGGTTTATTATTGCGCAACCGGATATTACTACGGCTCTGGTTTTTGGGGAC
AGGGAACACTTGTTACTGTTAGTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC
CCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA
CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT
CTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG

ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 250 (кДНК HC KL2B30)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC
CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGG
ATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATATATCTATTACAGTGG
GAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGT
CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTG
TATTACTGTGCGGGGACTACGATTTTTGGAGTGGTTACCCCCAACTTCTACTACGGT
ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGG
CCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGC
CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT
CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA
CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAAC
CTACACTTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG
AGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGA
CCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTT
CAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCT
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTA
CACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC
TGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT

CCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCT
CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCTGGGTAAA

SEQ ID NO: 251 (кДНК HC KL2B53)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGACATACACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATTTCATATGATGG
AAGTAAAAAAGACTATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTTGAGGACTCGGCT
GTGTATTCCTGTGCGAGAGAAAGTGGCTGGTCCCACTACTACTATTACGGTATGGAC
GTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATC
CGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACAC
TTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCC
AAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATC
AGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACT
GGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
GTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT
GAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCT
GCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
CAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CTGGGTAAA

SEQ ID NO: 252 (кДНК HC KL2B242)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAC
CCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTATTGGAGCT
GGCTCCGGCAGCCCGCCGGGTCGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTTTATATGTCAG
TGGGTTCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCTTGTCACTAGAC

CCGTCCAGGAACCAGTTGTCCCTGAAACTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGG
CCGTATATTATTGTGCGGGAGATAGTGGGAACTACTGGGGTTGGTTCGACCCCTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTC
TTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGC
CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACA
CTTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGT
CCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACC
ATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGT
TCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCC
GTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACA
GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGGAGG
GGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

SEQ ID NO: 253 (кДНК HC KL2B467)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTATATCATATGATGG
AAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCCCACCTCCCTTATAGTGGGAGCTACTGGGCCTTTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT
CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC
TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG
ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT

GTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCG
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 254 (кДНК HC KL2B494)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCATTATGCCATGAGCT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTGGTGGTA
GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACCTCATATTGTAATGGTGACTGCTCTTCTCT
ACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCAGCCTC
CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG
TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGT
GCCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA

GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 255 (кДНК LC mu11B6)

GACATTGTGCTGACACAGAGTCCAGCATCCTTGGCAGTATCTTTGGGGCAG
CGGGCAACAATTTCATGCCGTGCATCTGAAAGTGTGGAGTATTTTGGAACTTCTC
TTATGCACTGGTATCGCCAGAAGCCTGGGCAGCCTCCCAAACTCCTTATATATGC
CGCTTCCAACGTGGAGTCCGGAGTACCAGCACGCTTTTCCGGCTCTGGGTCCGGC
ACAGACTTTTCCCTCAATATCCAACCTGTTGAAGAAGACGATTTTTCCATGTATTT
TTGCCAACAGACACGCAAGGTTCCATATACATTCGGCGGCGGCACTAAACTTGAG
ATCAAACGGGCTGATGCTGCACCGACTGTGTCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGC
AGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAA
AGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCT
GAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCAC
CCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCC
ACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT

SEQ ID NO: 256 (кДНК LC hu11B6)

GACATAGTCTTGACTCAGAGCCCGGATTCCCTTGCTGTGTCTCTGGGAGAA
CGAGCTACGATCAACTGCAAGGCAAGTGAATCCGTAGAATACTTCGGGACATCAT
TGATGCATTGGTATCAACAGAAACCGGGGCAACCGCCCAAATTGCTGATATATGC
GGCTAGTAATAGAGAATCAGGAGTACCGGATAGGTTTAGTGGTTCAGGATCAGG
TACAGATTTCACCCTGACAATAAGTAGCTTGCAAGCCGAAGACGTAGCAGTGTAT
TACTGCCAACAAACCCGAAAGGTGCCATATACGTTTGGACAGGGTACAAAGTTG
GAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG
AGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
TGT

SEQ ID NO: 257 (кДНК LC KL2B30)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGT
ATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTT
GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCAC
TCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG
CTTAATAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTA
CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 258 (кДНК LC KL2B53)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTT
GCACTCTGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT
CTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGT
ATAACAGTGCCCCGTACACTTTTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGTAC
GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT
ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAG
CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG
CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 259 (кДНК LC KL2B242)

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGAGAGACA
GCCAGCATCACCTGCTCTGGAGATCAATTGGGGGAAAATTATGCTTGCTGGTATC
AGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTATCAAGATAGTAAGCGGCC
CTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTG
ACCATCAGCGGGACCCAGGCTCTGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGG
ACAACAGTATTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCC
CAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCC
AACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAG

TGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACAC
CCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGC
CTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGA
GCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO: 260 (кДНК LC KL2B467)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCCGGGCAGACG
GCCAGTATTACCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATAATAGCGACCGGC
CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGACCACGGCCACCCT
GACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTG
GGATAGTAGTAGTGATCATCCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTC
CTAGGTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGG
AGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGG
AGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGA
GACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCT
GAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCAC
GCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO: 261 (кДНК LC KL2B494)

TCTTCTGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACG
GCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCGGC
CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCT
GACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTG
GGATAGTAGTAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
GGTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGC
TTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGC
CGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGAC
CACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAG
CCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCA
TGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

Таблица 25. Аминокислотные последовательности вариабельного домена выбранных антител scFv к hK2 в формате VH-линкер-VL (HL) или VL-линкер-VH (LH).

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
scFv1	HCG5_LDC6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	262
scFv2	HCG5_hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	263
scFv3	HCF3_hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	264
scFv4	HCG5_LCB7_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	265
scFv5	LCD6_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	266

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
scFv6	hu11B6_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPY TFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQ LQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTIS RDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS GFWGQGTLVTVSS	267
scFv7	hu11B6_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPY TFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQ LQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTI SRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG SGFWGQGTLVTVSS	268
scFv8	LCB7_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPY TFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQ LQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTIS RDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS GFWGQGTLVTVSS	269
scFv9	LCB7_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPY TFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQ LQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTI SRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG SGFWGQGTLVTVSS	270
scFv10	LCD6_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPY TFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQ LQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTIS RDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS GFWGQGTLVTVSS	271
scFv11	hu11B6_LCB7_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA WNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSR VTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATG YYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESK	272

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
		STGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESV EYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQT RKVPYTFGQGTKLEIK	
scFv12	hu11B6_LCD6_ HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA WNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSR VTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATG YYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESK STGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESV EYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR KVPYTFGQGTKLEIK	273
scFv13	hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA WNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSR VTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATG YYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESK STGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESV EYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIK	274
scFv14	LCD6_hu11B6_L H	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPY TFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQ LQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTM SRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYY GSGFWGQGTLVTVSS	275
scFv15	hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPY TFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQ LQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTM SRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYY GSGFWGQGTLVTVSS	276
scFv16	LCB7_hu11B6_L H	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPY TFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQ LQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTM SRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYY GSGFWGQGTLVTVSS	277

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
scFv17	KL2B413_HL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVSSGGSE GKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPSFLSASVGDR VTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYY CQQLNSYPRTFGQGTKVEIK	278
scFv18	KL2B413_LH	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSW YQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGT EFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTK VEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPG KGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILT GHYGMDVWGQGTTVTVSS	279
scFv19	KL2B359_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA WNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSR VTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGY YYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKS TGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEY FGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKV PYTFGGGTKVEIK	280
scFv20	KL2B359_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTS LMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSG SGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTF GGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQL QESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWI RQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGF WGQGTLVTVSS	281
scFv21	KL2B357_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA WNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSR VTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGY YYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKS TGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVE YFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRK VPYTFGGGTKVEIK	282
scFv22	KL2B357_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPY TFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQV	283

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
		QLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAW NWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVT ISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYY GSGFWGQGTLVTVSS	
scFv23	KL2B358_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA WNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSR VTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGY YYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKS TGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEY FGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKV PYTFGGGTKVEIK	284
scFv24	KL2B358_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTS LMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSG SGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTF GGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQL QESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISR DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGS GFWGQGTLVTVSS	285
scFv25	KL2B360_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA WNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSR VTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGY YYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKS TGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEY FGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKV PYTFGGGTKVEIK	286
scFv26	KL2B360_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTS LMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSG SGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTF GGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQL QESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWI RQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISR DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGS GFWGQGTLVTVSS	287
scFv27	KL2B467_HL	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYG MHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA HLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSQSVLTQPPSVSVAPGQTASITC GGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDNSDRP SGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQ VWDSSSDHPVVFGGGTKVTV	288

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
scFv28	KL2B467_LH	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVH WYQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNS GTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVV FGGGTKVTVGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQL VESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHW VRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPY SGSYWAFDYWGQGTQVTVSS	289
scFv39	KL2B494_HL	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYA MSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK PHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSS GGSEGKSSGSGSESKSTGGSSSELTQPPSVSVAP GQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG DEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL	290
scFv40	KL2B494_LH	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHW YQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSG NTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVF GGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSW VRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHI VMVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSS	291
scFv41	KL2B30_HL	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYW SWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVT ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFG VVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDIQMTQSPSFLSASVGDRVTITC RASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQS GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQL NSYPLTFGGGTKVEIK	365
scFv42	KL2B30_LH	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLA WYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGG TKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFY YGMDVWGQGTTVTVSS	366
scFv43	KL2B53_HL	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDI HWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARE SGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSSGGSEGKS	367

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
		SGSGSESKSTGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASTLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQ KYNSAPYTFGQGTRLEIK	
scFv44	KL2B53_LH	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLA WYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQ GTRLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVES GGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQA PGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSHY YYYGMDVWGQGTMVTVSS	368
scFv45	KL2B242_HL	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYW SWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRV TLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSG NYWGWFDPWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSE SKSTGGSSYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLG ENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERF SGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSI VVFGGGTKLTVL	369
scFv46	KL2B242_LH	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACW YQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGT KLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAG SGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRN QLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDP WGQGTLVTVSS	370

Определение биофизических характеристик антител к hK2

Аффинность и термостабильность антител к hK2.

Аффинность выбранных антител к hK2 к растворимому hK2 измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). SPR представляет собой способ изучения силы взаимодействия между двумя партнерами по связыванию без использования меток путем измерения изменения массы при формировании и диссоциации комплекса. Антитела захватывали на чипе датчика, покрытом антителом к Fc, с последующей инъекцией растворимого hK2 в различных концентрациях, и определяли время ассоциации и диссоциации. После диссоциации поверхность восстанавливали подходящим раствором для подготовки к следующему

взаимодействию. Кинетическую информацию (константы скорости ассоциации и диссоциации) экстрагировали путем подбора сенсограмм к модели связывания Ленгмюра в соотношении 1 : 1. Аффинность связывания (K_D) регистрировалась как отношение констант скорости ($k_{диссоциации}/k_{ассоциации}$). Значения K_D выбранных антител hK2 перечислены в **таблице 26.**

Термостабильность определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (NanoDSF) на автоматическом приборе Prometeus. NanoDSF использовали для измерения $T_м$ молекул в концентрации 0,5 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7,4. Измерения проводили путем загрузки образцов в 24-капиллярную матрицу из 384-луночного планшета для образцов. Для каждого образца выполняли повторные измерения. Термическое сканирование образов охватывает диапазон от 20°C до 95°C со скоростью 1,0°C/мин. Флуоресценцию интактного триптофана и тирозина мониторили при длинах волн излучения 330 нм и 350 нм, а соотношение F350/F330 нм наносили на график зависимости от температуры для создания кривых разворачивания белка. Измеренные значения Tm перечислены в **таблице 26**.

Таблица 26. K_D и Tm выбранных молекул

Молекула	K_D (нМ)	Tm (°C)
KL2B413 (scFv-LH-Fc)	34,3	67
KL2B359 (scFv-LH-Fc)	0,7–1	67
KL2B30 (Fab)	0,460	>70
KL2B242 (Fab)	0,040	>70
KL2B53 (Fab)	0,080	>70
KL2B467 (Fab)	0,078	>70
KL2B494 (Fab)	0,053	>70

scFv KL2B413, полученный в результате кампании иммунизации мышей линии Ablexis, имел термостабильность (Tm) 67°C, измеренную с помощью Nano DSF, и аффинность связывания (K_D) с hK2 человека около 34 нм. Клон KL2B359, полученный для проведения повторной гуманизации и который сохранял аффинность связывания, аналогичную мышиному 11B6, преобразовали в scFv-Fc и CAR-T для дополнительного профилирования. ScFv KL2B359 показывает значения Tm 67°C и аффинности

связывания (K_D) с hK2 ~0,7 нм–1 нм. KL2B30, KL2B242, KL2B53, KL2B467 и KL2B494 Fab демонстрировали показатели аффинности связывания менее 0,5 нм, а значения Tm выше 70°C.

Эпитоп и сопоставление паратопа

Эпитоп на и паратоп выбранных антител к hK2 определяли методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS). Для эксперимента по картированию эпитопа и паратопа использовали антиген KLK2 человека.

Вкратце, очищенный антиген KLK2 инкубировали с антителами к hK2 и без них в буфере для мечения оксидом дейтерия. Смесь, полученную в результате водородно-дейтериевого обмена (HDX), гасили в разные моменты времени путем добавления 8 М мочевины, 1М TCEP, pH 3,0. Гашенный образец пропускали через колонку с иммобилизованным пепсином/FPXIII при 600 мкл/мин, уравновешенную буфером А (1% ацетонитрил, 0,1% МК в H2O) при комнатной температуре. Пептические фрагменты загружали в обращенно-фазную предколонку при концентрации 600 мкл/мин с буфером А и обессоливали в течение 1 мин (600 мкл буфера А). Обессоленные фрагменты разделяли с помощью колонки C18 с линейным градиентом от 8% до 35% буфера В (95% ацетонитрила, 5% H2O, 0,0025% TFA) при 100 мкл/мин в течение 20 мин и анализировали методом масс-спектрометрии. Анализы методом масс-спектрометрии проводили с использованием масс-спектрометра LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) с температурой капилляра 275 °C, разрешением 150 000 и диапазоном масс (масса/заряд) 300–1800. Приложение BioPharmma Finder 3.0 (Thermo Fisher Scientific) использовали для идентификации пептидов недейтерированных образцов перед проведением экспериментов HDX. Для экстракции значений центроидов из MS файлов необработанных данных для проведения экспериментов HDX использовали программу HDExaminer версии 2.5 (Sierra Analytics, г. Модесто, штат Калифорния).

Инкубация антител hK2, hu11B6, KL2B494, KL2B467, KL2B30, KL2B413 и KL2B53 с растворимым белком hK2 приводила к различным паттернам водородного обмена и общего уровня защиты. Для визуализации связывающих эпитопов защищенные сегменты сопоставляли с последовательностью антигена hK2 (**Фиг. 7**). KL2B494, KL2B467 и KL2B30, связанные с общими последовательностями (i) остатков 173–178 (**SEQ ID NO:** 209, KVTEF) (например, KL2B494, KL2B467 и KL2B30, связанные по меньшей мере с тремя остатками SEQ ID NO: 209, а именно остатки KVT

173-175) и (ii) остатков 230–234 (**SEQ ID NO:** 216, HYRKW) (например, KL2B494, KL2B467 и KL2B30, связанные по меньшей мере с тремя остатками SEQ ID NO: 216, а именно остатками HYR в 230–232). KL2B413 также связывают все остатки SEQ ID NO: 209 и остатки KW SEQ ID NO: 216, как показано на **Фиг. 7**. В одном варианте осуществления настоящего изобретения также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем указанный антигенсвязывающий домен связывается с hK2 в эпитопах, имеющих последовательности SEQ ID NO: 209 и SEQ ID NO: 216; например, указанный антигенсвязывающий домен связывает все остатки или по меньшей мере четыре остатка или по меньшей мере три остатками SEQ ID NO: 209 и связывает все остатки или по меньшей мере четыре остатка или по меньшей мере три остатка SEQ ID NO: 216.

KL2B53 показал другой характер защиты и был связан с последовательностью, состоящей из остатков 27-32 (SEQ ID NO: 217, SHGWAH), 60–75 (**SEQ ID NO:** 218, RHNLFEPEDTGQRVP) и 138–147 (**SEQ ID NO:** 292, GWGSIEPEE).

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/CD3 (например, hu11B6, KL2B494, KL2B467, KL2B30, KL2B413 или KL2B53) содержит hK2-специфичный антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с диспергированным эпитопом (т. е., с эпитопами, остатки которых отдаленно расположены в последовательности) hK2, содержащим одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 209, 216, 217, 218 и 292.

Паратоп антител к hK2 hu11B6, KL2B494, KL2B467, KL2B413 и биспецифических антител к hK2/CD3 KLCB113 и KLCB80 идентифицировали на основании существенных различий в поглощении дейтерия на графиках остатков, созданных программой HDExaminer. KL2BB494 содержит три области паратопа, две из которых расположены в вариабельном домене тяжелой цепи KL2B494 (GFTFSH (SEQ ID NO: 729) и TAVYYCAKPHIVMVTAL (SEQ ID NO: 730)), а одна область паратопа расположена в вариабельном домене легкой цепи (YDDSDRPSGIPER (SEQ ID NO: 731)). KL2BB467 содержит три области паратопа, две из которых расположены в вариабельном домене тяжелой цепи KLKL2B467 (FTFSY (SEQ ID NO: 732) и GSYWAFDY (SEQ ID NO: 733)), а одна область паратопа расположена в вариабельном домене легкой цепи (DNSD (SEQ ID NO: 734)). Hu11B6 содержит одну область эпитопа, расположенную в тяжелой цепи (GNSITSDYA

(SEQ ID NO: 735)). KL2B413 содержит две области паратопа, расположенные в вариабельном домене тяжелой цепи (GFTF (SEQ ID NO: 736) и ARDQNYDIL (SEQ ID NO: 737)). KL2B30 биспецифического KLCB80 содержит область паратопа, расположенную в тяжелой цепи (содержащей аминокислотные остатки TIF и VTPNF (SEQ ID NO: 738)), и область паратопа, расположенную в легкой цепи (YAASTLQSG (SEQ ID NO: 739)). KL2B53 биспецифического KLCB113 содержит одну область паратопа, расположенную в тяжелой цепи (содержащей аминокислотные остатки ESGWSHY (SEQ ID NO: 740)). На **Фиг. 11 (11A–11E)** показан связывающий паратоп этих антител к hK2 и биспецифических антител к hK2/CD3 (подчеркнутые последовательности указывают области CDR, а выделенные последовательности указывают на области паратопов).

Пример 3. Получение биспецифических антител к hK2 × антител к CD3

Области VH/VL антител к hK2, полученные в примере 2, и области VH/VL антител к CD3, полученные в примере 1, конструировали в биспецифический формат и экспрессировали как IgG1.

Конструирование scFv CD3 для получения биспецифического hK2/CD3

Области VH/VL CD3 конструировали как scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH с использованием линкера SEQ ID NO: 31 **(таблица 27)**. Молекулы VH-линкер-VL или VL-линкер-VH, связывающие CD3, дополнительно сконструировали в формат scFv-шарнирная область-CH2-CH3 (также называемый scFv-Fc), содержащий молчащую мутацию Fc (L234A/L235A/D265S) и мутации T350V/L351Y/F405A/Y407V, сконструированные для активации селективной гетеродимеризации (**таблица 28**). Полипептид SEQ ID NO: 293 применяли в качестве домена шарнирной области-CH2-CH3. Белки scFv-шарнирная область-CH2-CH3, связывающие CD3, были сконструированы либо как имеющие C-концевой лизин в домене CH3, либо без него (**таблица 28**). Последовательности ДНК молекул антител CD3 в формате scFv и формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3 (scFv-Fc) показаны в **таблице 29**.

SEQ ID NO: 293 (huIgG1_G1m(17)-шарнирная область-Fc_C220S_AAS_ZWA)

EPKSSDKTHTCPPCPAPE<u>A</u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV<u>S</u>VSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVY<u>VY</u>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP

ENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

Таблица 27. CD3-специфические последовательности scFv.

Сокращение	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
CD3W244_HL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASES ISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSGSW PYTFGQGTKLEIK	65
CD3W244_LH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS RYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGR FTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDY WGQGTLVTVSS	66
CD3W245_HL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASES ISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSW PYTFGQGTKLEIK	67
CD3W245_LH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS RYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGR FTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDY WGQGTLVTVSS	68
CD3W246_HL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASES ISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSGSW PYTFGQGTKLEIK	69
CD3W246_LH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	70

Сокращение	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
	RYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGR FTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDY WGQGTLVTVSS	
CD3W247_HL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASES ISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSW PYTFGQGTKLEIK	71
CD3W247_LH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS RYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGR FTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDY WGQGTLVTVSS	72
CD3W248_HL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDILLTQSPGILSVSPG ERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESIS GIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSGSWPY TFGGGTKLEIK	73
CD3W248_LH	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESE DIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIKGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSR YNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRF TFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDY WGQGTLVTVSS	74

Таблица 28. CD3-специфические плечи scFv-Fc (CH2-CH3 scFv-шарнирной области).

Сокращение	Аминокислотная последовательность (показана с С-концевым лизином (K))	SEQ ID NO: (с С-концевым лизином)	SEQ ID NO: (без С-концевого лизина)
CD3W244_HL-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSS NYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQ MSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQ GTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGS	75	747

Сокращение	Аминокислотная последовательность (показана с С-концевым лизином (K))	SEQ ID NO: (с С-концевым лизином)	SEQ ID NO: (без С-концевого лизина)
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSI GTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATY YCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK		
CD3W244_LH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSI GTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATY YCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKS SGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPG KGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFS RDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTR GWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	76	748
CD3W245_HL-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSS NYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQ MSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQ GTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSI GTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTK	717	77

Сокращение	Аминокислотная последовательность (показана с С-концевым лизином (K))	SEQ ID NO: (с С-концевым лизином)	SEQ ID NO: (без С-концевого лизина)
	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		
CD3W245_LH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	718	78
CD3W246_HL-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	79	749
CD3W246_LH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKS	80	750

Сокращение	Аминокислотная последовательность (показана с С-концевым лизином (K))	SEQ ID NO: (с С-концевым лизином)	SEQ ID NO: (без С-концевого лизина)
	SGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPG KGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFS RDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTR GWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK		
CD3W247_HL-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSS NYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQ MSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQ GTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSI GTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	81	751
CD3W247_LH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSI GTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKS SGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPG KGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFS RDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTR GWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK	82	752

Сокращение	Аминокислотная последовательность (показана с С-концевым лизином (K))	SEQ ID NO: (с С-концевым лизином)	SEQ ID NO: (без С-концевого лизина)
	TISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		
CD3W248_HL-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	83	753
CD3W248_LH-Fc	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	84	754

Таблица 29. SEQ ID NO ДНК для scFv антител CD3 и scFv-шарнирной области-CH2-CH3 (scFv-Fc)

	ДНК scFv SEQ ID NO:	ДНК scFv-Fc SEQ ID NO
CD3W244_HL	294	304
CD3W244_LH	295	305
CD3W245_HL	296	306
CD3W245_LH	297	307
CD3W246_HL	298	308
CD3W246_LH	299	309
CD3W247_HL	300	310
CD3W247_LH	301	311
CD3W248_HL	302	312
CD3W248_LH	303	313

SEQ ID NO: 294 (CD3W244_HL)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAG
CCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAAC
TGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACC
AGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCC
GCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGG
ACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCA
GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTC
CGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
AAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGC
CAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCA
AAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCA
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAG
AGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGG
CCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 295 (CD3W244_LH)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAG

AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGG
GCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG
GAAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCA
GCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAA
CTGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAC
CAGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGC
CGCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAG
GACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCC
AGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 296 (CD3W245_HL)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAG
CCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAAC
TGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACC
AGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCC
GCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGG
ACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCA
GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTC
CGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
AAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGC
CAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCA
AAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTC
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCA
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCG
GCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 297 (CD3W245_LH)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGG
GCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG

GAAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCA
GCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAA
CTGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAC
CAGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGC
CGCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAG
GACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCC
AGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 298 (CD3W246_HL)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAG
CCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAAC
TGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACC
AGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCC
GCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGG
ACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCA
GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTC
CGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
AAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGC
CAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCA
AAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTC
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCA
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCG
GCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 299 (CD3W246_LH)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGG
GCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG
GAAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCA
GCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAA
CTGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAC
CAGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGC

CGCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAG
GACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCC
AGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 300 (CD3W247_HL)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAG
CCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAAC
TGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACC
AGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCC
GCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGG
ACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCA
GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTC
CGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
AAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGC
CAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCA
AAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCA
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAG
AGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGG
CCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 301 (CD3W247_LH)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGG
GCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG
GAAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCA
GCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAA
CTGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAC
CAGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGC
CGCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAG
GACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCC
AGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 302 (CD3W248_HL)

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAG
TAGTAATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGA
GACAACGCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTATTTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGG
CAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGG
CATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGACAG
AGCATTGGCACAGCCATACACTGGTATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGG
CTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGCGG
CAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGAT
ATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTGGGAGCTGGCCGTACACGTTCGGAGGGG
GGACCAAGCTGGAAATAAAA

SEQ ID NO: 303 (CD3W248_LH)

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGGCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAA
AGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGACAGAGCATTGGCACAGCCATACACTGGT
ATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTC
TATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGCGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACT
CTTACCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAA
GTGGGAGCTGGCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAGGCG
GATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAA
GCGAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTG
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGT
AGTAATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTATTTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGG
AACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 304 (CD3W244_HL-scFv-Fc)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAG
CCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAAC
TGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACC
AGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCC

GCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGG
ACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCA
GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTC
CGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
AAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGC
CAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCA
AAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCA
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAG
AGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGG
CCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACAC
ATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG
TGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCC
CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTC
GTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 305 (CD3W244_LH-scFv-Fc)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGG
GCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG
GAAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCA
GCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAA
CTGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAC

CAGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGC
CGCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAG
GACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCC
AGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACA
CATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC
GTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACC
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCT
CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 306 (CD3W245_HL-scFv-Fc)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAG
CCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAAC
TGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACC
AGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCC
GCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGG
ACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCA
GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTC
CGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
AAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGC
CAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCA
AAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTC
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCA
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCG
GCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACA
CATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC

GTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACC
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCT
CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 307 (CD3W245_LH-scFv-Fc)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGG
GCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG
GAAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCA
GCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAA
CTGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAC
CAGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGC
CGCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAG
GACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCC
AGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACA
CATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC
GTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACC
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA

AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCT
CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 308 (CD3W246_HL-scFv-Fc)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAG
CCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAAC
TGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACC
AGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCC
GCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGG
ACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCA
GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTC
CGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
AAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGC
CAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCA
AAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTC
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCA
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCG
GCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACA
CATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC
GTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACC
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCT
CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 309 (CD3W246_LH-scFv-Fc)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGG
GCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG
GAAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCA
GCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAA
CTGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAC
CAGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGC
CGCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAG
GACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCC
AGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACA
CATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC
GTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACC
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCT
CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 310 (CD3W247_HL-scFv-Fc)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAG
CCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAAC
TGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACC
AGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCC
GCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGG
ACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCA

GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTC
CGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
AAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGC
CAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCA
AAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCA
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAG
AGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGG
CCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACAC
ATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG
TGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCC
CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTC
GTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 311 (CD3W247_LH-scFv-Fc)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGG
GCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG
GAAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCA
GCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAA
CTGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAC
CAGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGC
CGCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAG

GACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCC
AGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACA
CATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC
GTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACC
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCT
CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 312 (CD3W248_HL-scFv-Fc)

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAG
TAGTAATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGA
GACAACGCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTATTTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGG
CAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGG
CATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGACAG
AGCATTGGCACAGCCATACACTGGTATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGG
CTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGCGG
CAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGAT
ATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTGGGAGCTGGCCGTACACGTTCGGAGGGG
GGACCAAGCTGGAAATAAAAGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTC
CACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG

TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATC
CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGC
AAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
GGGTAAA

SEQ ID NO: 313 (CD3W248_LH-scFv-Fc)

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGGCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAA
AGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGACAGAGCATTGGCACAGCCATACACTGGT
ATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTC
TATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGCGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACT
CTTACCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAA
GTGGGAGCTGGCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAGGCG
GATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAA
GCGAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTG
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGT
AGTAATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTATTTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGG
AACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGT
CCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT
GGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCA
TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTCGTGA

GCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCGGGTAAA

Конструирование Fab CD3 для получения биспецифического hK2/CD3

Специфические области VH и VL CD3 конструировали в форматах VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и VL-CL, соответственно, и экспрессировали в виде IgG1. Полипептид **SEQ ID NO: 314**, содержащий молчащую мутацию L234A/L235A/D265S Fc и мутацию T350V/L351Y/F405A/Y407V CH3, сконструированную с возможностью активации селективной гетеродимеризации, применяли для создания CD3-специфичной молекулы VH-CH1-линкер-CH2-CH3 (**таблица 30**). Тяжелые цепи VH-CH1-линкер-CH2-CH3 конструировали либо с С-концевым лизином, либо без него в домене CH3. Тяжелая цепь VH-CH1-линкер-CH2-CH3, не содержащая С-концевой лизин, показана в SEQ ID NO: 85.

SEQ ID NO: 314 (huIgG1_G1m(17)_AAS_ZWA)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Полипептиды SEQ ID NO: 363 или 364 использовали для создания CD3-специфической последовательности VL-CL (**таблица 31**)

SEQ ID NO: 363 (легкая цепь kappa человека)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 364 (легкая цепь lambda человека)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV
ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Последовательности ДНК молекул антител к CD3 в формате VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и формате Vl-CL показаны в **таблице 32**.

Таблица 30. Аминокислотная последовательность плеча антитела к CD3 VH-CH1-линкер-CH2-CH3 биспецифического антитела.

Белок HC	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность HC
CD3W244 HC, CD3W245 HC, CD3W246 HC, CD3W247 HC, CD3W248 HC,	719	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQ APGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSL DLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
CD3B376 HC	349	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSR NQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG

Таблица 31. Аминокислотная последовательность плеча легкой цепи антитела к CD3 (VL-CL) биспецифического антитела

Белок LC	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность LC
CD3W244 LC	86	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CD3W245 LC	88	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CD3W246 LC	90	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CD3W247 LC	92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CD3W248 LC	94	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESED IADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
CD3B376 LC	350	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQ HPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Таблица 32. SEQ ID NO кДНК плеч антител к CD3 H биспецифических антител в формате VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и LC в формате VL-CL.

Антитело	кДНК HC с SEQ ID NO:	кДНК LC с SEQ ID NO:
CD3W244	315	316
CD3W245	315	317
CD3W246	315	318
CD3W247	315	319
CD3W248	315	320
CD3B376	351	352

SEQ ID NO: 315 (кДНК HC CD3W244, CDRW245, CD3W246, CD3W247, CD3W248)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAG
CCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAAC
TGGGTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACC

AGCAGCAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCC
GCGACAACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGG
ACACCGCCATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCA
GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC
CTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG
TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA
GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC
TTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGG
ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 316 (кДНК LC CD3W244)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGC
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGC

TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC
AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 317 (кДНК LC CD3W245)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGC
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGC
TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC
AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 318 (кДНК LC CD3W246)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGC
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGC
TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC
AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 319 (кДНК LC CD3W247)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGA
CCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAG
AGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC

AGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGC
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGC
TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC
AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 320 (кДНК LC CD3W248)

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGGCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAA
AGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGACAGAGCATTGGCACAGCCATACACTGGT
ATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTC
TATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGCGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACT
CTTACCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAA
GTGGGAGCTGGCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTA
CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 351 (HC CD3B376)

CAGGTGCAGCTCCAACAGAGTGGTCCCAGACTCGTGAGACCCTCTCAAAC
ACTCAGTTTGACTTGTGCCATCTCAGGCGATTCAGTTTTCAACAACAATGCAGCTT
GGAGCTGGATTAGGCAGTCACCTAGTCGCGGTCTTGAATGGCTTGGGCGTACATA
CTATCGCTCTAAATGGTTGTATGATTACGCTGTGTCCGTGAAGAGCCGAATCACC
GTAAACCCTGATACCTCCAGGAATCAGTTCACATTGCAACTGAATAGTGTGACTC
CCGAGGATACTGCACTCTATTATTGTGCCCGAGGATATAGCAGTAGCTTCGACTA
TTGGGGACAAGGGACACTCGTTACCGTTAGTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG
GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG
AGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGC

AGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA
ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCT
AGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 352 (LC CD3B376)

CAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGCTCTCCCGGCCAGTCC
ATCACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCCAACATCGGCACCTACAAGTTCGTGT
CCTGGTATCAGCAGCACCCCGACAAGGCCCCCAAAGTGCTGCTGTACGAGGTGTC
CAAGCGGCCCTCTGGCGTGTCCTCCAGATTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACC
GCCTCCCTGACCATCAGCGGACTGCAGGCTGAGGACCAGGCCGACTACCACTGTG
TGTCCTACGCTGGCTCTGGCACCCTGCTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGT
GCTGGGTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAG
GAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGG
GAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG
AGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATC
TGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCA
CGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

Конструирование scFv hK2-Fc для получения биспецифического hK2/CD3

Области VH/VL hK2, конструированные как scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH с использованием линкера SEQ ID NO: 31 (**таблица 2**), как описано в примере 2, дополнительно сконструировали в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3, содержащем молчащую мутацию Fc (L234A/L235A/D265S) и мутации T350 V/T366L/K392L/T394W, сконструированные для активации селективной гетеродимеризации, и экспрессировали как IgG1 (**таблица 33**). Полипептид

SEQ ID NO: 321 применяли в качестве шарнирной области-CH2-CH3 константного домена.

SEQ ID NO: 321 (huIgG1_G1m (17)-шарнирная область-Fc_C220S_AAS_ZWB)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

Таблица 33. Аминокислотные последовательности scFvs-Fc антител к hK2 для получения биспецифического hK2/CD3

Белки	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
KL2B359-LH-scFv-Fc	322	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGT DFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEI KGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS QTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKRLEWIGYI SYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSL LCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
KL2B413-LH-scFv-Fc	323	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQ QKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQD GSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVS SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREE MTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYL TWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

Белки	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
KL2B467-LH-scFv-Fc	324	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQ QKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLT ISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV LGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAF ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVS SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREE MTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYL TWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B494-LH-scFv-Fc	325	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQ QKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATL TISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTV LGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVST IGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGT MVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVL PPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Конструирование Fab-Fc hK2 для получения биспецифического hK2/CD3

Специфические области VH и VL hK2 конструировали в формате VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и VL-CL, соответственно. Полипептид **SEQ ID NO: 326**, содержащий молчащую мутацию L234A/L235A/D265S Fc и мутацию T350V/T366L/K392L/T394W CH3, сконструированную с возможностью активации селективной гетеродимеризации, применяли для создания CD3-специфичной молекулы VH-CH1-линкер-CH2-CH3.

SEQ ID NO: 326 (huIgG1_G1m(17)_AAS_ZWB)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

QPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Полипептиды SEQ ID NO: 363 или 364 применяли для получения hK2-специфической VL-CL.

SEQ ID NO: 363 (легкая цепь kappa человека)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 364 (легкая цепь lambda человека)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV
ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Аминокислотные последовательности плеча hK2 показаны в **таблице 34.**

Таблица 34. Аминокислотные последовательности для Fab-Fc антител к hK2 для биспецифического получения hK2/CD3

Белки	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
KL2B30 Fab HC	327	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWS WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTP NFYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B242 Fab HC	328	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWS WLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLS LDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWG WFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Белки	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
KL2B53 Fab HC	329	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIH WVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSH YYYYGMDVWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B30 Fab w/K477	330	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWS WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTP NFYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Биспецифические hK2/CD3

Анти-CD3-специфические плечи CD3W245 и CD3B376, сконструированные в виде Fab и областей VH/VL hK2 KL2B359, KL2B413, KL2B467 и KL2B494, сконструированные в виде scFv в обеих ориентациях HL и LH, как описано выше, экспрессировали для создания биспецифических антител к hK2/CD3 с плечом связывания hK2 в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3, а также плечом связывания CD3 в формате: тяжелая цепь: VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и легкая цепь: VL-CL. В альтернативном варианте осуществления области VH/VL антител к CD3 CD3W245, сконструированные в виде scFv в ориентации LH-линкер-VH, и области VH/VL антител к hK2 KL2B30, KL2B242 и KL2B53, сконструированные в виде Fab, описанные выше, экспрессировали для создания биспецифических антител к hK2/CD3 с плечом связывания hK2 в формате VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и легкой цепи VL-CL и плечом связывания CD3 в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3. Линкер,

применяемый для получения антител к scFv, представляет собой линкер **SEQ ID NO: 31**.

Мутации T350 V_L351Y_F405A_Y407 V CH3 были сконструированы в одну тяжелую цепь, а мутации T350 V_T366L_K392L_T394W CH3 были сконструированы в другую тяжелую цепь, как описано выше. Кроме того, оба связывающих плеча HK2 и CD3 были сконструированы таким образом, чтобы содержать молчащие мутации L234A_L235A_D265S Fc-эффектора, как описано выше.

Сконструированные цепи экспрессировали, а полученные биспецифические антитела очищали с использованием стандартных способов. Биспецифические антитела характеризовались способностью связываться с hK2 и CD3 и цитотоксичностью, как описано в примере 5. В **таблице 35** показаны SEQ ID NO: выбранных биспецифических антител к hKL2/CD3. В **таблице 36** показаны VH, VL и scFv SEQ ID NO: выбранных биспецифических антител к hKL2/CD3. В **таблице 37** показаны SEQ ID NO HC1, HC2, LC1 и LC2 выбранных биспецифических антител к hKL2/CD3. HC1 и LC1 относятся к тяжелой и легкой цепям плеча, связывающего hKL2. В альтернативном варианте HC1 может также относиться к scFv-шарнирная область-CH2-CH3 плеча, связывающего hKl2. HC2 и LC2 относятся к тяжелой и легкой цепям плеча, связывающего CD3. В альтернативном варианте HC2 может также относиться к scFv-шарнирная область-CH2-CH3 плеча, связывающего CD3. В **таблице 38** показаны аминокислотные последовательности HC1, LC1, HC2 и LC2. В **таблице 39** показаны последовательности HC1, LC1, HC2 и LC2.

Таблица 35. CDR SEQ ID NO по Кэботу биспецифических антител к hK2/CD3

Биспецифическое антитело	Исходное (плечо к hK2/плечо к CD3)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
KLCB91	KL2B359-LH-scFv	149	152	151	171	172	173
	Fab CD3W245	6	7	8	9	10	11
KLCB105	KL2B359-LH-scFv	149	152	151	171	172	173
	Fab CD3B376	340	341	342	343	344	345
KLCB95	KL2B413-LHscFv	153	154	155	176	177	178
	Fab CD3W245	6	7	8	9	10	11
KLCB9	KL2B413-LH-scFv	153	154	155	176	177	178

6	Fab CD3B376	340	341	342	343	344	345
KLCB170	KL2B467-LH-scFv	165	166	167	191	192	193
	Fab CD3W245	6	7	8	9	10	11
KLCB80	Fab KL2B30	156	157	158	182	183	184
	CD3W245-LH-scFv-Fc	6	7	8	9	10	11
KLCB81	KL2B242 LC_C33S Fab	162	163	164	185	186	187
	CD3W245-LH-scFv-Fc	6	7	8	9	10	11
KLCB113	Fab KL2B53	159	160	161	179	180	181
	CD3W245-LH-scFv-Fc	6	7	8	9	10	11
KLCB281	KL2B467-LH-scFv	165	166	167	191	192	193
	CD3B376-Fab	340	341	342	343	344	345
KLCB174	KL2B494-LH-scFv	168	169	170	191	192	188
	CD3B376-Fab	340	341	342	343	344	345
KLCB153	KL2B494-LH-scFv	168	169	170	191	192	188
	CD3W245-Fab	6	7	8	9	10	11
KLCB245	KL2B30-Fab w/ K447	156	157	158	182	183	184
	CD3W245-LH-scFv w/ K447	6	7	8	9	10	11

Таблица 36. SEQ ID NO вариабельной области плеча hKL2 и плеча CD3 выбранных биспецифических антител к KL2/CD3.

Название биспецифического соединения	Плечо к hK2				Плечо к CD3			
	Название	VH1 SEQ ID NO:	VL1 SEQ ID NO:	scFv SEQ ID NO	Название	VH2 SEQ ID NO:	VL2 SEQ ID NO:	scFv SEQ ID NO:
KLCB91	KL2B359-LH-scFv(scFv20)			281	Fab CD3W245	23	28	
KLCB105	KL2B359-LHscFv (scFv20)			281	Fab CD3B376	346	347	
KLCB95	KL2B413-LH-scFv			279	Fab CD3W245	23	28	

	(scFv18)						
KLCB96	KL2B413-LH-scFv(scFv18)			279	Fab CD3B376	346	347
KLCB170	KL2B467-LH-scFv(scFv28)			289	Fab CD3W245	23	28
KLCB80	Fab KL2B30	139	140		CD3W245-LH-scFv (scFv34)		348
KLCB81	KL2B242 LC_C33S Fab	143	358		CD3W245-LH-scFv (scFv34)		348
KLCB113	Fab KL2B53	141	142		CD3W245-LH-scFv (scFv34)		348
KLCB281	KL2B467-LH-scFv (scFv28)			289	Fab CD3B376	346	347
KLCB174	KL2B494-LH-scFv			291	CD3B376-Fab	346	347
KLCB153	KL2B494-LH-scFv			352	CD3W245-Fab	23	28
KLCB245	KL2B30-Fab w/ K447	139	140		CD3W245-LH-scFv w/ K447		348

Таблица 37. SEQ ID NO аминокислот HC и LC биспецифических антител к hK2/CD3

Название биспецифического соединения	Плечо к hK2			Плечо к CD3		
	Название	HC1 или scFv-Fc SEQ ID NO:	LC1 SEQ ID NO:	Название	HC2 или scFv-Fc SEQ ID NO:	LC2 SEQ ID NO:
KLCB91	KL2B359 LH-Fc	322		Fab CD3W245	85	88
KLCB105	KL2B359-LH-Fc	322		Fab CD3B376	349	350
KLCB95	KL2B413-LH-Fc	323		Fab CD3W245	85	88
KLCB96	KL2B413-LH-Fc	323		Fab CD3B376	349	350
KLCB170	KL2B467-LH-Fc	324		Fab CD3W245	85	88

KLCB80	Fab KL2B30	327	221	CD3W245- LH-scFv-Fc	78	
KLCB81	KL2B242 LC_C33S Fab	328	359	CD3W245- LH-scFv-Fc	78	
KLCB113	Fab KL2B53	329	222	CD3W245- LH-scFv-Fc	78	
KLCB281	KL2B467-LH-scFv (scFv28)	324		Fab CD3B376	349	350
KLCB174	KL2B494-LH-scFv	325		CD3B376-Fab	349	350
KLCB153	KL2B494-LH-scFv	325		CD3W245-Fab	85	88
KLCB245	KL2B30-Fab w/ K447	330	221	CD3W245-LH-scFv w/ K447	331	

Таблица 38. Аминокислотные последовательности биспецифических HC1 и HC2

Белки	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
KL2B359-LH-scFv-Fc	322	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGT DFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKRLEWIG YISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMT KNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLT WPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B413-LH-scFv-Fc	323	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQ QKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIKGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIK QDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTV TVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPP SREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV

Белки	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
		FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B467-LH-scFv-Fc	324	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWY QQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTAT LTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTK VTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGL EWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQ GTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B30 Fab HC	327	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWS WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTP NFYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B242 Fab HC	328	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWS WLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLS LDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWG WFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B242LC_C33S_Fab LC	359	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYASWYQ QKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATL TISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLG QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY

		LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
KL2B53 Fab HC	329	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIH WVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSH YYYYGMDVWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B494-LH-scfV-Fc	325	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQ QKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATL TISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLT VLGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEW VSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVW GQGTMVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B30 Fab w/K477	330	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWS WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTP NFYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CD3W245 Fab HC	85	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMN WVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTF SRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP

		KDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYV YPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Fab CD3B376	349	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAA WSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKS RITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSS SFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY VYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
CD3W245-LH-scfv-Fc	78	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWY QQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSIST SSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
CD3W245-LH-scfv-Fc w/K447	331	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWY QQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSIST SSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

Таблица 39. HC и LC ДНК SEQ ID NO биспецифических антител к hK2/CD3

Название биспецифического соединения	Плечо к hK2			Плечо к CD3		
	Название	HC1 или scFv-Fc ДНК SEQ ID NO:	LC1 ДНК SEQ ID NO:	Название	HC2 или scFv-Fc ДНК SEQ ID NO:	LC2 ДНК SEQ ID NO:
KLCB91	KL2B359 LH - scFv -Fc	332		Fab CD3W245	315	88
KLCB105	KL2B359-LH-scFv-Fc	332		Fab CD3B376	351	352
KLCB95	KL2B413-LH-scFv-Fc	333		Fab CD3W245	315	317
KLCB96	KL2B413-LH-scFv-Fc	333		Fab CD3B376	351	352
KLCB170	KL2B467-LH-scFv-Fc	334		Fab CD3W245	315	317
KLCB80	Fab KL2B30	335	257	CD3W245-LH-scFv-Fc	353	
KLCB81	KL2B242 LC_C33S Fab	336	360	CD3W245-LH-scFv-Fc	353	
KLCB113	Fab KL2B53	337	258	CD3W245-LH-scFv-Fc	353	
KLCB281	KL2B467-LH-scFv-Fc	334		Fab CD3B376	351	352
KLCB174	KL2B494-LH-scFv	338		CD3B376-Fab	351	352
KLCB153	KL2B494-LH-scFv	338		CD3W245-Fab	315	317
KLCB245	KL2B30-Fab w/ K447	339	257	CD3W245-LH-scFv-Fc w/ K447	354	

SEQ ID NO: 332 (KL2B359-LH-scFv-Fc)

GAGATTGTTCTCACCCAATCCCCAGCTACTCTCTCTCTTTCACCCGGTGAGC
GGGCAACCCTCTCCTGTAGAGCCAGCGAGAGCGTGGAGTATTTTGGCACATCCCT
GATGCACTGGTATCAGCAAAAACCAGGACAACCCCCCAGACTCCTCATATATGCC
GCCTCAAATGTCGAGAGTGGGATACCTGCACGGTTTTCAGGAAGCGGCAGCGGT
ACTGACTTCACATTGACTATATCCTCTGTAGAGCCAGAGGATTTTGCAGTCTACTT

CTGCCAGCAAACTAGGAAGGTTCCATATACTTTTGGGGGCGGTACAAAAGTTGAG
ATAAAGGGCGGCTCCGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAG
CACCGGCGGCAGCCAAGTACAGCTCCAGGAGTCAGGACCTGGGCTCGTCAAACC
ATCTCAGACATTGTCCCTGACATGCACAGTTTCCGGCAACAGTATTACTTCCGACT
ATGCTTGGAATTGGATCAGGCAATTCCCAGGAAAGCGGCTCGAGTGGATAGGTTA
TATTTCTTACTCTGGATCTACTACCTACAATCCCAGTTTGAAGTCTCGCGTGACAA
TTAGCCGGGACACATCAAAAAATCAATTCTCACTTAAACTTAGTTCTGTAACCGC
TGCCGATACAGCCGTGTACTACTGCGCCACTGGTTATTATTATGGAAGCGGATTTT
GGGGGCAAGGAACTTTGGTGACCGTCTCTTCCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAAC
TCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
CATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT
GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGT
GCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT
TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 333 (KL2B413 – LH – scFv – Fc)

GAGGTACAACTTGTCGAAAGTGGCGGTGGAGTCGTCCAGCCTGGGCGATCA
CTTCGCCTCTCCTGTGTAGCCTCTGGTTTCACTTTCTCATCTTACGACATACACTGGG
TCCGCCAGGCACCTGGTAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCCATCATTAGTTACGATGGC
TCCAAAAAAGATTACACCGATAGCGTAAAGGGCAGATTTACCATTTCCAGGGATAA
TTCAAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTCCGCGTCGAAGACTCTGCAG
TTTATAGCTGTGCCAGGGAGTCAGGCTGGTCCCATTATTACTATTATGGTATGGACG
TTTGGGGCCAGGGAACCATGGTCACTGTTAGTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG
GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT
CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC

TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA
AATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
GTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 334 (KL2B467-LH-scFv-Fc)

CAGAGCGTACTTACCCAGCCTCCCAGCGTGTCTGTAGCCCCAGGACAGAC
AGCCAGTATTACATGCGGTGGTGACAATATAGGTTCCAAATCCGTGCATTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGGCAAGCTCCCGTGCTCGTGGTATATGATAATTCCGACCGCC
CTTCCGGCATTCCCGAACGGTTTAGTGGTTCAAATTCAGGCACCACAGCAACTCT
GACCATAAGCAGAGTCGAAGCTGGAGACGAAGCCGACTACTACTGTCAGGTATG
GGACTCTAGTAGTGACCACCCTGTCGTCTTCGGTGGGGGAACCAAAGTGACCGTT
CTGGGCGGCTCCGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCAC
CGGCGGCAGCCAGGTCCAGCTCGTAGAAAGTGGGGGCGGCGTAGTTCAGCCAGG
CAGGAGTCTCCGGCTGAGTTGTGCAGCCAGCGGCTTTACTTTTTCCTACTATGGAA
TGCACTGGGTACGTCAGGCACCCGGCAAAGGTTTGGAGTGGGTCGCATTCATTTC
TTATGATGGATCAAATAAGTATTATGCCGATAGTGTAAAGGGCAGATTTACAATA
AGTCGAGACAACTCAAAGAACACTCTCTACCTCCAAATGAATAGTCTTCGGGCAG
AGGATACTGCAGTGTACTATTGTGCTCATCTTCCTTATTCCGGTTCTTACTGGGCA
TTCGATTATTGGGGGCAAGGGACACAAGTTACCGTGTCTAGCGAGCCCAAATCTA
GCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGAC
CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC

AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC
CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 338 (KL2B494-LH-scFv-Fc)

AGCAGCGAATTGACCCAACCACCTTCCGTCAGCGTCGCACCAGGGCAAAC
CGCCCGCATCACATGCGGTGGGAACAATATAGGAAGCAAATCTGTCCACTGGTAC
CAGCAAAAACCAGGACAAGCCCCTGTTCTGGTCGTCTATGATGACAGCGACAGA
CCAAGTGGTATTCCCGAGAGATTCTCCGGTAGCAACTCTGGAAATACAGCTACTT
TGACCATCTCCAGAGTTGAGGCTGGTGACGAGGCAGATTACTATTGCCAGGTCTG
GGACAGCTCCAGCGACCACGTCGTATTCGGTGGCGGGACCAAGCTGACTGTGCTG
GGCGGCTCCGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGG
CGGCAGCCAGGTGCAGTTGGTAGAGTCAGGAGGGGGCCTCGTTCAACCTGGTGG
CAGCCTCCGTTTGTCTTGTGCTGCCAGTGGATTTACTTTCAGTCACTACGCAATGA
GCTGGGTGAGACAAGCACCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTCTCCACTATCGGCG
GTTCAGGGGGGAGCACTTACTACGCTGACTCTGTAAAAGGTCGCTTTACTATATC
TAGAGATAACTCTAAAAACACACTCTACTTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGA
AGATACAGCCGTGTACTACTGCGCCAAGCCTCATATTGTAATGGTCACTGCCCTC
TTGTATGATGGCATGGATGTTTGGGGCCAAGGGACAATGGTGACAGTCTCAAGCG
AGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGC
AGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA
ACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCT

AGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 335 (кДНК HC Fab KLK2B30)

CAGGTTCAACTTCAAGAATCCGGGCCAGGTCTGGTCAAGCCTTCAGAGAC
TTTGTCCCTTACTTGCACAGTGAGCGGTGGCTCTATCTCAAGTTACTACTGGTCAT
GGATACGGCAGCCCCCAGGAAAGGGGCTTGAGTGGATTGGGTACATTTATTACTC
AGGGTCAACAAACTACAATCCCTCCCTCAAATCCCGAGTGACAATTAGTGTCGAT
ACATCTAAAAACCAGTTTTCCCTGAAATTGAGCTCAGTCACCGCAGCTGATACTG
CAGTCTATTATTGTGCTGGCACAACAATCTTCGGGGTAGTAACTCCAAACTTCTAC
TACGGGATGGACGTGTGGGGGCAAGGAACAACCGTAACAGTAAGTAGTGCCTCC
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG
GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT
GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT
TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTG
CCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC
AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCG
TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG
TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCTCA
CCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 722 (кДНК LC KLK2B30)

GATATTCAAATGACCCAGTCACCATCATTCCTGTCCGCCTCAGTGGGAGAT
CGCGTCACTATTACTTGTCGTGCTAGCCAGGGGATATCATCATATTTGGCTTGGTA
TCAACAAAAGCCAGGAAAGGCCCCAAAATTCCTTATATATGCAGCTAGTACACTC
CAGAGTGGTGTTCCTAGCCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCAGGGACCGAGTTCACCC
TGACAATCTCCAGCTTGCAGCCCGAAGACTTTGCAACCTACTATTGCCAGCAACT

GAACTCCTATCCTCTGACTTTCGGGGGAGGAACCAAGGTTGAGATTAAACGGACA
GTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGG
CACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTG
CAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACC
GAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCCA
AGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCC
TGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT

SEQ ID NO: 337 (кДНК HC Fab KL2B53)

GAGGTACAACTTGTCGAAAGTGGCGGTGGAGTCGTCCAGCCTGGGCGATCA
CTTCGCCTCTCCTGTGTAGCCTCTGGTTTCACTTTCTCATCTTACGACATACACTGGG
TCCGCCAGGCACCTGGTAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCCATCATTAGTTACGATGGC
TCCAAAAAAGATTACACCGATAGCGTAAAGGGCAGATTTACCATTTCCAGGGATAA
TTCAAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTCCGCGTCGAAGACTCTGCAG
TTTATAGCTGTGCCAGGGAGTCAGGCTGGTCCCATTATTACTATTATGGTATGGACG
TTTGGGGCCAGGGAACCATGGTCACTGTTAGTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG
GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT
CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC
TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA
AATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
GTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 723 (кДНК LC KL2B53)

GATATTGTAATGACTCAGTCACCCTCTTCACTGAGTGCATCAGTAGGTGAT
CGCGTTACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAAGACATTTCAAATTACCTTGCATGGTA
CCAACAAAAGCCCGGAAAAGTGCCAAAGTTTTTGATTTATGCCGCTTCAACACTC
CATTCAGGAGTGCCCTCTCGTTTCAGTGGATCTGGCAGTGGCACCGATTTTACTCT
CACAATAAGCAGTCTCCAGCCTGAGGATGTAGCCACCTATTATTGCCAAAAATAT
AATTCAGCCCCCTATACTTTTGGACAGGGCACACGCCTTGAGATTAAACGGACAG
TGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGC
ACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGC
AGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCG
AGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCCAA
GGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCT
GTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT

SEQ ID NO: 336 (кДНК HC Fab KLK2B242 и HC Fab KL2B242LC_C33S)

CAAGTACAACTTCAAGAGTCTGGCCCTGGGCTTGTTAAGCCCTCAGAGACC
TTGTCACTGACCTGTACCGTATCAGGCGGGTCAATTTCATCTTACTACTGGAGTTG
GCTTCGTCAGCCTGCCGGATCTGGACTGGAGTGGATAGGTAGACTGTATGTTTCC
GGCTTTACAAATTACAACCCATCTTTGAAAAGCCGTGTGACTCTCAGCCTCGACC
CTTCTCGGAATCAACTTTCACTTAAATTGTCTTCTGTTACAGCTGCCGACACTGCA
GTATATTATTGTGCAGGGGACTCAGGCAACTATTGGGGATGGTTTGATCCTTGGG
GGCAGGGGACCCTGGTAACCGTGAGTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT
CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC
CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCC
TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC
CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC
TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAG
GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG

TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGAT
GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA
CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 360 (кДНК LC Fab KLK2B242LC_C33S)

AGTTATGAGCTGACTCAACCACCCAGTGTCAGCGTATCCCCAGGAGAAAC
TGCCTCTATAACATGCAGCGGAGACCAGTTGGGAGAAAATTACGCCTCCTGGTAC
CAACAGAAGCCTGGACAAAGTCCTGTCCTCGTTATTTATCAAGATTCTAAACGTC
CCTCTGGGATCCCCGAACGATTCTCCGGCTCTAACTCTGGGAATACCGCTACCTTG
ACAATAAGTGGTACACAGGCACTTGATGAAGCTGATTATTACTGCCAGGCATGGG
ATAACAGCATTGTGGTTTTCGGGGGCGGCACCAAACTCACAGTTCTCGGTCAGCC
CAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCC
AACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAG
TGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACAC
CCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGC
CTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGA
GCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO: 339 (кДНК HC Fab wK477 KLK2B30)

CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCTTCCGAGAC
ACTGTCTCTGACCTGCACCGTGTCTGGCGGCTCCATCTCCTCCTACTACTGGTCCT
GGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACTC
CGGCTCCACCAACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCTCCGTGGAC
ACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCG
CCGTGTACTATTGTGCTGGCACCACCATCTTCGGCGTGGTCACCCCTAACTTCTAC
TACGGCATGGACGTGTGGGGCCAAGGCACAACAGTGACAGTCTCTTCTGCCTCCA
CCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC
AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACTTGTCCACCGTGC
CCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA
AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGT
GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT

GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT
GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTGTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCTCA
CCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA

SEQ ID NO: 353 (кДНК CB3W245 – LH-scFv-Fc)

GACATACAAATGACACAATCACCCTCTTCTCTTTCTGCAAGCGTTGGCGACC
GTGTCACTATCACTTGTCGAGCCCGCCAGTCCATAGGTACTGCCATTCACTGGTATC
AACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAACTCCTGATTAAGTATGCCAGCGAGAGCATT
TCCGGCGTACCTTCAAGATTTTCCGGCTCCGGTAGTGGGACAGATTTCACTCTCACT
ATATCTAGCCTCCAACCAGAAGATTTCGCCACTTACTACTGTCAACAATCAGGTTCA
TGGCCTTACACTTTCGGCCAGGGGACAAAATTGGAGATCAAGGGCGGCTCCGAGGG
CAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGCGGCAGCGAGGTGCA
ACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTC
CAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGTAATTACATATAC
TACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTC
ACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTTATTACTGTA
CGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
TCAGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGA
AGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA
TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAG

GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 354 (CD3W245-LH-scFv-Fc c K447)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACA
GAGTGACCATTACCTGCCGGGCCAGACAGTCTATCGGCACCGCTATCCACTGGTAT
CAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATTAAGTACGCCTCCGAGTCCAT
CTCCGGCGTGCCCTCCAGATTTTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGACTTTACCCTGAC
AATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTCCGGCTC
TTGGCCTTACACCTTTGGTCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGCGGATCTGAGG
GAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTGCA
GCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTAAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTG
TGCTGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCCGGTACAACATGAACTGGGTCCGACAGGCTCC
TGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCTCCATCTCCACCTCCAGCAACTACATCTACTA
CGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCTTCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCC
TGGACCTGCAGATGTCTGGCCTGAGAGCTGAGGACACCGCTATCTACTACTGCACC
AGAGGCTGGGGACCCTTCGATTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCATC
TGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACTTGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAG
CAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC
CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAG
CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA

SEQ ID NO: 725 (CD3W245 Fab-HC-Fc)

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAG
TAGTAATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGA

GACAACGCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTATTTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG
GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG
CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA
GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACC
GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC
AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
GGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 726 (CD3W245 Fab-LC-Fc)

GACATACAAATGACACAATCACCCTCTTCTCTTTCTGCAAGCGTTGGCGAC
CGTGTCACTATCACTTGTCGAGCCCGCCAGTCCATAGGTACTGCCATTCACTGGTA
TCAACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAACTCCTGATTAAGTATGCCAGCGAGAG
CATTTCCGGCGTACCTTCAAGATTTTCCGGCTCCGGTAGTGGGACAGATTTCACTC
TCACTATATCTAGCCTCCAACCAGAAGATTTCGCCACTTACTACTGTCAACAATCA
GGTTCATGGCCTTACACTTTCGGCCAGGGGACAAAATTGGAGATCAAGCGGACA
GTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGG
CACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTG
CAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACC
GAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCCA
AGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCC
TGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT

SEQ ID NO: 351 (CD3B376 Fab-HC-Fc)

CAGGTGCAGCTCCAACAGAGTGGTCCCAGACTCGTGAGACCCTCTCAAAC
ACTCAGTTTGACTTGTGCCATCTCAGGCGATTCAGTTTTCAACAACAATGCAGCTT
GGAGCTGGATTAGGCAGTCACCTAGTCGCGGTCTTGAATGGCTTGGGCGTACATA
CTATCGCTCTAAATGGTTGTATGATTACGCTGTGTCCGTGAAGAGCCGAATCACC
GTAAACCCTGATACCTCCAGGAATCAGTTCACATTGCAACTGAATAGTGTGACTC
CCGAGGATACTGCACTCTATTATTGTGCCCGAGGATATAGCAGTAGCTTCGACTA
TTGGGGACAAGGGACACTCGTTACCGTTAGTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG
GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG
AGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGC
AGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA
ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCT
AGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 352 (CD3B376 Fab-LC-Fc)

CAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGCTCTCCCGGCCAGTCC
ATCACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCCAACATCGGCACCTACAAGTTCGTGT
CCTGGTATCAGCAGCACCCCGACAAGGCCCCCAAAGTGCTGCTGTACGAGGTGTC
CAAGCGGCCCTCTGGCGTGTCCTCCAGATTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACC
GCCTCCCTGACCATCAGCGGACTGCAGGCTGAGGACCAGGCCGACTACCACTGTG
TGTCCTACGCTGGCTCTGGCACCCTGCTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGT
GCTGGGTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAG

GAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGG
GAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG
AGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATC
TGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCA
CGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

Пример 4. Определение биофизических характеристик биспецифических антител к hK2xCD3

Аффинность выбранных биспецифических антител hK2 × CD3

Аффинность выбранных биспецифических антител hK2xCD3 к hK2 или CD3 человека измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). SPR представляет собой способ изучения силы взаимодействия между двумя партнерами по связыванию без использования меток путем измерения изменения массы при формировании и диссоциации комплекса. Антитела захватывали на чипе датчика, покрытом антителом к Fc, с последующей инъекцией растворимого hK2 (или растворимого рекомбинантного CD3) в различных концентрациях, и определяли время ассоциации и диссоциации. После диссоциации поверхность восстанавливали подходящим раствором для подготовки к следующему взаимодействию. Кинетическую информацию (константы скорости ассоциации и диссоциации) экстрагировали путем подбора сенсограмм к модели связывания Ленгмюра в соотношении 1 : 1. Аффинность связывания (KD) регистрировалась как отношение констант скорости (k диссоциации/k ассоциации). Значения KD выбранных биспецифических антител к hK2/CD3 перечислены в **таблице 40.**

Таблица 40. Значения K_D выбранных биспецифических антител к hK2/CD3 для соответствующих связывающих плеч

Плечо к KLK2	K_D (нМ)
Fab KL2B467	0,09
Fab KL2B494	0,06
KL2B359-LH-scFv	0,63
KL2B413-LH-scFv	16,4
Fab CD3B376	20–40

Fab CD3W245	0,14
CD3W245 LH scFv	20–30
Fab KL2B30	2
Fab KL2B53	0,1
Fab KL2B242	0,14

Термостабильность выбранных биспецифических антител к hK2/CD3

Термостабильность образцов биспецифических антител определяли методом NanoDSF с использованием автоматического прибора Prometeus. Измерения проводили путем загрузки образца в 24-капиллярную матрицу из 384-луночного планшета для образцов. Для каждого образца выполняли повторные измерения. Пользовательский интерфейс Promeeus NanoDSF (вкладка Melting Scan) использовали для настройки экспериментальных параметров анализа. Термическое сканирование образов охватывает диапазон от 20°C до 95°C со скоростью 1,0°C/мин. Технология Dual-UV контролирует флуоресценцию интактного триптофана и тирозина при длинах волн излучения 330 нм и 350 нм, и это соотношение (F350 нм/F330 нм) наносится на график зависимости от температуры для создания кривой разворачивания белка. Для измерения Tm всех молекул при концентрации 0,5 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7,4, применяют NanoDSF. Измеренные значения Tm перечислены в **таблице 41**.

Таблица 41. Значения Tm для плеч связывания KLK2 или CD3 выбранных биспецифических антител к hK2 × CD3.

Молекула	**Tm (°C) с помощью DSF**
KL2B413 (scFv)	67
KL2B359 (scFv)	67
KL2B30 (Fab)	>70
KL2B242 (Fab)	>70
KL2B53 (Fab)	>70
KL2B467 (Fab)	>70
KL2B494 (Fab)	>70
CD3B376 (Fab)	61
CD3W245 LH scFv	66

Потенциал самостоятельного связывания методом AC-SINS (спектроскопия наночастиц с аффинным захватом-самостоятельным взаимодействием [Affinity Capture-Self Interaction Nanoparticle Spectroscopy])

Для измерения склонности Ат-кандидата к самостоятельному взаимодействию использовали скрининг с высокой пропускной способностью. Процент самостоятельных взаимодействий обычно приводит к плохой растворимости Ат и проблемам с производством Ат на последующих стадиях. В этом анализе наночастицы золота (AuNP) покрывали козьим антителом к человеческому IgG (H+L) и затем инкубировали с потенциальными Ат присутствии поликлональных козьих IgG. Любое Ат-кандидат, вступающее в самостоятельное связывание, привлекает AuNP в непосредственную близость, вызывая сдвиг длины волны наночастиц (λ_p), также называемую длиной волны при максимальной поглощении ($\lambda_{макс}$). Величина смещения ($\Delta\lambda max$) для каждого потенциального Ат указывает на прочность его самостоятельного связывания. В данном анализе применяли надлежащие контрольные антитела, которые показали высокий потенциал самоассоциации или не показали его. Все молекулы, исследованные в настоящем анализе, не показали низкий потенциал самостоятельного связывания.

Пример 5. Определение характеристик биспецифических антител к hK2xCD3.

Цитотоксичность биспецифических антител hK2xCD3 in vitro

Потенциал цитотоксичности сгенерированных биспецифических антител измеряли *in vitro* с помощью анализа Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности с применением визуализации с перерывами в реальном времени на платформе Incucyte. Биспецифические антитела исследовали в hK2-положительной клеточной линии VCaP в присутствии выделенных пан-человеческих CD3+ Т-клеток от здоровых доноров при соотношении эффектор : мишень (E : T) 3 : 1. Гибель клеток путем апоптоза контролировали путем измерения флуоресцентного сигнала от красителя, который стабильно экспрессируется целевыми клетками VCaP.

Т-клетки от здоровых доноров совместно инкубировали с клетками VCaP KLK2+. Биспецифические антитела к KLK2xCD3 дозировали от 0 нм до 100 нм в течение 96 часов. Использовали соотношение эффектор/мишень (ET), равное 3 : 1. (A) Клетки-мишени стабильно экспрессировали красный ядерный краситель, что

измерялось с помощью системы визуализации IncuCyte в реальном времени для количественной оценки гибели клеток-мишеней. Общий лизис клеток опухоли был нанесен на график на основании AUC кинетической кривой уничтожения в реальном времени клеток VCaP (**Фиг. 8А**). Зеленый флуоресцентный реагент каспазу 3/7 использовали для измерения сигнала апоптоза при гибели клеток-мишеней. Общая активность реагента каспазы 3/7 была нанесена на график на основании AUC кривой активности каспазы 3/7 в режиме реального времени (**Фиг. 8Б**). Данные показали, что испытанные биспецифические антитела hK2/CD3 способствуют дозозависимому сокращению жизнеспособных клеток VCaP с увеличением времени и, следовательно, вызывают опосредованную Т-клетками гибель опухолевых клеток VCaP. Биспецифические антитела hK2xCD3 были эффективны в опосредовании активации Т-клеток и демонстрируют дозозависимое уничтожение опухолевых клеток KLK2+.

Активация и пролиферация Т-клеток посредством биспецифических молекул к hK2xCD3 in vitro

Биспецифические антитела к hK2xCD3 исследовали на их способность стимулировать активацию и пролиферацию Т-клеток. Т-клетки от здоровых доноров маркировали с помощью CFSE (5 мкм) и совместно культивировали с клетками VCap KLK2 (+). Биспецифические антитела к KLK2xCD3 дозировали от 0 нм до 100 нм в течение 96 часов. Использовали соотношение эффектор/мишень (ET), равное 3 : 1. Через 96 часов совместной инкубации клетки собирали и окрашивали с использованием клеточного красителя CD25. Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением Flowjo. Определяли частоты разведения красителя CTV и маркера активации CD25. Частоту получения CD25-положительных клеток в различных дозах использовали для составления графика in vitro активации Т-клеток (**Фиг. 9А**). Гейт пролиферации определяли с применением группы обработки 0 нм. Частоту получения клеток, входящих в гейт пролиферации, использовали для составления графика in vitro активации Т-клеток (**Фиг. 9Б**). Данные подтверждают дозозависимую активацию и пролиферацию Т-клеток различными биспецифичными антителами к KLK2xCD3.

Высвобождение цитокинов Т-клеток с помощью биспецифических молекул к hK2xCD3 in vitro.

Влияние антител к hK2xCD3 на высвобождение цитокинов Т-клеток измеряли in vitro. Образцы супернатанта собирали из эксперимента по цитотоксичности in vitro, описанного выше. Анализ 13-plex cytokine Luminex проводили для количественного определения концентрации IFN- и TNF-α при разных дозах биспецифических антител к hK2xCD3. На **Фиг. 10А и 10Б** показано функциональное высвобождение цитокинов Т-клетками, активированными с помощью биспецифических антител к KLK2xCD3 дозозависимым образом.

Эффективность биспецифических антител к hK2xCD3 в модели с прижившимся подкожным (п/к) ксенотрансплантатом предстательной железы человека у гуманизированных Т-клетками мышей.

Эффективность in vivo биспецифических антител к KLK2xCD3 оценивали в мышиной модели с п/к ксенотрансплантатом опухоли предстательной железы человека VCaP. Противоопухолевую эффективность молекул к KLK2xCD3 оценивали в прижившихся ксенотрансплантатах VCaP предстательной железы. В качестве подходящего хозяина для прививания опухолей человека и человеческих Т-клеток использовали интактных самцов мышей NSG. Клеточная линия предстательной железы человека VCaP была получена из Американской коллекции клеточных культур (ATCC). Клетки VCaP собирали во время экспоненциального роста и вводили мышам в концентрации 1×10^7 клеток п/к объеме 0,2 мл в правый бок. 20e6 Т-клеток человека вводили интраперитонеально каждому животному. Оценивали 3 уровня доз с 5-кратным возрастанием: 0,2 мг/кг, 1 мг/кг и 5 мг/кг. Биспецифические антитела вводили дважды в неделю и/п. Образец крови из глазницы отбирали через 6 часов после и/п введения первой дозы, а уровни функциональных цитокинов измеряли путем анализа с помощью Luminex. Показатели объема опухоли и массы тела собирали два раза в неделю во всех исследованиях. Дельту процентного ингибирования роста опухоли (ΔTGI) определяли как разность между средней опухолевой нагрузкой опытных и контрольных групп, рассчитанной как %ΔTGI = ([(TVc-TVc0) (TVt- TVt0)/(TVc) TVc0) ×100; где «TVc» представляет собой среднюю опухолевую нагрузку в данной контрольной группе, «TVc0» представляет собой среднюю начальную опухолевую нагрузку в данной контрольной группе, «TVt» представляет собой среднюю опухолевую нагрузку в получавшей лечение группе, а «TVt0» представляет собой

среднюю исходную опухолевую нагрузку в получавшей лечение группе. %TGI был определен как ([TVc-TVt]/TVc) ×100.

Соединение KLK2xCD3 по изобретению демонстрировало дозозависимый противоопухолевой эффект, т. е., при дозе 1 мг/кг демонстрировало незначительное ингибирование роста опухоли, а при 5 мг/кг — противоопухолевый эффект. Оценка цитокинов через 6 часов после введения первой дозы показала, что высвобождение цитокинов активного соединения KLK2xCD3 было выше фонового, что согласуется с эффективностью in vivo.

Пример 6. Получение клеточных линий HLA-G.

Клеточную линию хронического миелогенного лейкоза K562 (ATCC, CCL-243), в которой отсутствует экспрессия всех HLA, включая белки MHC класса I: HLA-A (Uniprot P01892), HLA-B (Uniprot P18464), HLA-C (Uniprot P30508) и HLA-E (Uniprot P13747) (следовательно, подходят для уничтожения на основе NK-клеток) трансдуцировали с применением лентивирусного вектора pCDH для экспрессии HLA-G1 – IRES (сайт внутренней посадки рибосомы) – β-2-микроглобулин (β2M, LPP-CS-Z7412-I0035-02-200, Genecopoeia) или человеческий HLA-G (C42S) - IRES - β2M (LPP-CS-Z7412-I0035-01-200, Genecopoeia) в лентивирусных частицах (Genecopoeia) и культивировали в IMDM, 10% FBS. На первом пересеве проводили селекцию с применением 10 мкг/мл пуромицина (Gibco, A1113803) для обеспечения стабильной экспрессии HLA-G. Клетки делили в соотношении 1:10, когда плотность достигала ~3×10^6 клеток/мл, приблизительно каждые 3–4 суток.

Пример 7. Получение антител к HLA-G.

Антитела к HLA-G получали с применением трансгенных гуманизированных крыс OmniRat®. Крысы OmniRat® содержат химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента V_Hs, все человеческие сегменты D и J_H в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом C_H), а также полностью человеческие локусы IgL (12 Vκs, связанных с Jκ-Cκ, и 16 Vλs, связанных с Jλ-Cλ). (см. например, Osborn, et al. (2013) J Immunol 190(4): 1481-1490). Соответственно, крысы демонстрируют сниженную экспрессию крысиного иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации для создания высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных

антител IgG с полностью человеческими вариабельными областями. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в WO14/093908.

Крыс OmniRat® иммунизировали с применением конструкции, содержащей α-субъединицу либо рекомбинантного человеческого HLA-G1, либо рекомбинантного человеческого HLA-G5, растворимой изоформы HLA-G, содержащей домены α1, α2 и α3, но лишенной трансмембранной области, слитой с субъединицей β2m и гистоном H2A, клетками K562, экспрессирующими HLA-G1, или ДНК, кодирующей внеклеточный домен HLA-G1 с мутацией C42S (таблица 42). В некоторых случаях пептид гистона H2A сливали с антигеном для повышения стабильности. В таблице 42 показаны последовательности антигенов.

Таблица 42. Последовательности антигенов, применяемые для получения антител.

Пептид H2A подчеркнут. Субъединица β2M выделена жирным шрифтом. Метки His, Avi- и Gly-Ser выделены курсивом.

Кампания	ID белка по а.к.	Последовательность	SEQ ID NO:
HYB:420, гибридома, крысы OMT	MHGW8 (B2m-(3(G4S)-HLA-G1-G4S-Avi)	**MIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSF YLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIV KWDRDM**GGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFS AAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSA SPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQ TDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQWMIGCDL GSDGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWT AADTAAQISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVE WLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDY EATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVE LVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCH VQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPI*GGGGSGLNDI FEAQKIEWHE*	371
HYB:420, гибридома, крысы OMT	MHGW2 (H2A-2(G4S)-b2m-3(G4S)-HLA-G5-G4S-His-Avi)	RIIPRHLQLGGGGSGGGGS**IQRTPKIQVYSRHP AENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGER IEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDE YACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM**GGGGSGGG GSGGGGSGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAM GYVDDTQFVRFDSDSASPRMEPRAPWVEQEGP EYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQS	372

Кампания	ID белка по а.к.	Последовательность	SEQ ID NO:
		EASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYD GKDYLALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEAA NVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQR ADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEII LTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKE GDGGIMSVRESRSLSEDL*GGGGSHHHHHHGSG LNDIFEAQKIEWHE*	
HYB:420, гибридома, крысы OMT	$_{FL}$HLA-G1	GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQ FVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEET RNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTL QWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYLAL NEDLRSWTAADTAAQISKRKCEAANVAEQRR AYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTH VTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRD GEDQTQDVELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPS GEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPI MGIVAGLVVLAAVVTGAAVAAVLWRKKSSD	373
HYB:423, гибридома, крысы OMT	pDR000057441(H2A-3(G4S)-b2m-3G4S-HLA-G1-C42S)	Последовательность ДНК, первичная транскрипция: ATGGCTTGGGTGTGGACATTGTTGTTTCTGAT GGCTGCTGCTCAATCTATTCAAGCTAGGATC ATTCCTAGACATCTGCAACTCGGAGGCGGAG GCAGCGGAGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAG GATCTATTCAGAGGACACCTAAGATTCAAGT GTACTCTAGACATCCTGCTGAGAACGGCAAG AGCAACTTTCTGAACTGCTATGTGAGCGGCT TTCATCCTAGCGATATTGAAGTGGATCTGCTG AAAAACGGCGAACGTATTGAAAAAGTGGAA CATAGCGATCTGAGCTTTAGCAAAGATTGGA GCTTTTATCTGCTGTATTATACCGAATTTACC CCTACCGAAAAAGATGAATATGCCTGCAGAG TGAACCATGTGACCCTGAGCCAGCCTAAGAT TGTGAAATGGGATAGAGATATGGGAGGAGG AGGCTCTGGAGGAGGAGGATCTGGAGGCGG AGGCAGCGGCTCTCATAGCATGAGATATTTT AGCGCTGCAGTGAGCCGTCCTGGACGTGGAG AACCTAGGTTTATTGCTATGGGCTATGTGGAT GATACCCAGTTTGTGAGGTTTGATAGCGATA GCGCCTCTCCTAGGATGGAACCTAGAGCTCC CTGGGTGGAACAGGAAGGCCCAGAATATTGG GAAGAAGAAACCAGGAACACCAAAGCACAT GCTCAGACCGATCGTATGAACCTGCAGACCC TGAGAGGCTATTATAACCAGAGCGAAGCATC TAGCCATACCCTGCAGTGGATGATTGGCTGC GATCTGGGCAGCGATGGCAGACTGCTGAGAG	374

Кампания	ID белка по а.к.	Последовательность	SEQ ID NO:
		GCTATGAACAGTATGCATATGATGGCAAAGA TTATCTGGCACTGAACGAAGATCTGAGGAGC TGGACCGCTGCTGATACCGCTGCTCAGATTA GCAAGAGGAAGTGCGAAGCTGCTAACGTGG CTGAACAGAGACGCGCATATCTGGAAGGCAC CTGCGTGGAATGGCTGCATAGGTATCTGGAA AACGGCAAAGAAATGCTGCAGAGAGCTGAT CCTCCTAAAACCCATGTGACCCATCATCCTGT GTTTGATTATGAAGCTACCCTGAGGTGCTGG GCTCTGGGCTTCTATCCTGCTGAGATTATTCT GACCTGGCAGAGAGATGGAGAAGATCAGAC TCAAGATGTCGAGTTGGTCGAGACTAGACCT GCTGGAGATGGCACCTTTCAGAAGTGGGCAG CTGTTGTCGTGCCTAGCGGAGAAGAACAGAG ATATACCTGCCATGTGCAGCATGAAGGCCTG CCTGAACCTCTGATGCTGAGGTGGAAACAGA GCAGCTTGCCTACTATTCCTATTGGAGGAGG AGGATCTCACCATCATCATCATCACTGA	
		Последовательность зрелого белка: QARIIPRHLQLGGGGSGGGGSGGGGS**IQRTPKI QVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVD LLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTE FTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM** GGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFSAAVSRPG RGEPRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSASPRMEPR APWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQ TLRGYYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLR GYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQI SKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLE NGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCW ALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAG DGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPE PLMLRWKQSSLPTIPI*GGGGSHHHHHH*	375
HYB:421, гибридома, крысы OMT		Последовательность ДНК, первичная транскрипция: ATGGCTTGGGTGTGGACATTGTTGTTTCTGAT GGCTGCTGCTCAATCTATTCAAGCTAGGATC ATTCCTAGACATCTGCAACTCGGAGGCGGAG GCAGCGGAGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAG GATCTATTCAGAGGACACCTAAGATTCAAGT GTACTCTAGACATCCTGCTGAGAACGGCAAG AGCAACTTTCTGAACTGCTATGTGAGCGGCT TTCATCCTAGCGATATTGAAGTGGATCTGCTG AAAAACGGCGAACGTATTGAAAAAGTGGAA CATAGCGATCTGAGCTTTAGCAAAGATTGGA	376

Кампания	ID белка по а.к.	Последовательность	SEQ ID NO:
		GCTTTTATCTGCTGTATTATACCGAATTTACC CCTACCGAAAAAGATGAATATGCCTGCAGAG TGAACCATGTGACCCTGAGCCAGCCTAAGAT TGTGAAATGGGATAGAGATATGGGAGGAGG AGGCTCTGGAGGAGGAGGATCTGGAGGCGG AGGCAGCGGCTCTCATAGCATGAGATATTTT AGCGCTGCAGTGAGCCGTCCTGGACGTGGAG AACCTAGGTTTATTGCTATGGGCTATGTGGAT GATACCCAGTTTGTGAGGTTTGATAGCGATA GCGCCTCTCCTAGGATGGAACCTAGAGCTCC CTGGGTGGAACAGGAAGGCCCAGAATATTGG GAAGAAGAAACCAGGAACACCAAAGCACAT GCTCAGACCGATCGTATGAACCTGCAGACCC TGAGAGGCTATTATAACCAGAGCGAAGCATC TAGCCATACCCTGCAGTGGATGATTGGCTGC GATCTGGGCAGCGATGGCAGACTGCTGAGAG GCTATGAACAGTATGCATATGATGGCAAAGA TTATCTGGCACTGAACGAAGATCTGAGGAGC TGGACCGCTGCTGATACCGCTGCTCAGATTA GCAAGAGGAAGTGCGAAGCTGCTAACGTGG CTGAACAGAGACGCGCATATCTGGAAGGCAC CTGCGTGGAATGGCTGCATAGGTATCTGGAA AACGGCAAAGAAATGCTGCAGAGAGCTGAT CCTCCTAAAACCCATGTGACCCATCATCCTGT GTTTGATTATGAAGCTACCCTGAGGTGCTGG GCTCTGGGCTTCTATCCTGCTGAGATTATTCT GACCTGGCAGAGAGATGGAGAAGATCAGAC TCAAGATGTCGAGTTGGTCGAGACTAGACCT GCTGGAGATGGCACCTTTCAGAAGTGGGCAG CTGTTGTCGTGCCTAGCGGAGAAGAACAGAG ATATACCTGCCATGTGCAGCATGAAGGCCTG CCTGAACCTCTGATGCTGAGGTGGAAACAGA GCAGCTTGCCTACTATTCCTATTGGAGGAGG AGGATCTCACCATCATCATCATCACTGA	
		Последовательность зрелого белка: RIIPRHLQLGGGGSGGGGSGGGGS**IQRTPKIQV YSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL KNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFT PTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM**GG GGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFSAAVSRPGRGE PRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSASPRMEPRAPW VEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLR GYYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYE QYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQISKR KCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGK EMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALG	377

Кампания	ID белка по а.к.	Последовательность	SEQ ID NO:
		FYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT FQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLM LRWKQSSLPTIPI*GGGGSHHHHHH*	
HYB:420, гибридома, крысы OMT	pDR000066413 (Mafa-AG-ECD-G4S-6XHis-GS-Avi T)	GSHSMRYFYTAVSRPGRGQPRFIAVGYVDDTQ FVRFDSDAESPRMEPRAPWVEQEGPEYWDRET QNMKTATQTYQANLRTLLRYYNQSEAGSHTF QKMYGCDLGPDGRLLRGYEQFAYDGRDYIILN EDLRSWTAADMAAQNTQRKWEAAGAAEQHR TYLEGECLEWLRRYLENGKETLQRADPPKTNV THHPVSDYEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDG EEQTEDTELVETRPTGDGTFQKWAAVVVPSGE EQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPSSQSTILIGG GGSHHHHHHGSGLNDIFEAQKIEWHE	378
	pDR000047703 (бета-2-микроглобулин яванского макака (b2M))	IQRTPKIQVYSRHPPENGKPNFLNCYVSGFHPS DIEVDLLKNGEKMGKVEHSDLSFSKDWSFYLL YYTEFTPNEKDEYACRVNHVTLSGPRTVKWDR DM	379

В отношении HYB:420 крыс OmniRat иммунизировали два раза в неделю, в общей сложности введя 12 бустерных доз иммунизации, следуя протоколу многократной повторной иммунизации (RIMMS) с применением белков рекомбинантной человеческой HLA-G1, человеческой HLA-G5 и белков Mafa-AG яванского макака (гомолог HLA-G1). Окончательный клеточный бустер выполняли с применением клеточной линии, экспрессирующей hHLA-G1 K562, полученной из клеток K562 (ATCC® CCL-243™). Титры сыворотки определяли с помощью твердофазного ИФА с нанесенным на планшет иммуногеном. Дренирующие лимфатические узлы собирали для слияния лимфоцитов с клетками миеломы FO (ATCC® CRL-1646™) для получения гибридомы.

В отношении **HYB:423** крыс OmniRat иммунизировали пДНК HLA-G человека (pDR000057441 (**таблица 3**); вариант C>S) через большеберцовую мышцу с непосредственной последующей многократной электропорацией in vivo. Крысы получили окончательную бустерную дозу комбинации HLA-G человека и яванского макака по сравнению с экспрессирующими клетками. Дренирующие лимфатические узлы собирали и сливали с клетками миеломы FO для получения гибридомы.

В отношении **HYB:421** крыс OmniRat иммунизировали пДНК HLA-G человека в каждую большеберцовую мышцу с последующей электропорацией in vivo. Оценивали титры, которые находились в диапазоне от 0 до 800, в сутки 25. Крысам давали отдых в течение нескольких месяцев, а затем дополнительно иммунизировали пДНК с последующей окончательной бустерной дозой с клетками K562, экзогенно сверхэкспрессирующими человеческое HLA-G. Нижние дренирующие лимфатические узлы применяли для получения нижестоящих гибридом.

Для выбора клонов антител для последующего скрининга, супернатанты гибридом подвергали скринингу на их способность связываться с клетками, экспрессирующими только человеческое HLA-G, а не с клетками, экзогенно экспрессирующими HLA-A, HLA-B и HLA-C, или клетками K562 дикого типа, которые не экспрессируют антигены MHC I класса клеточной поверхности. Для секвенирования и клонирования v-области отбирали супернатанты, которые демонстрировали > 20-кратное более высокое связывание с K562-HLA-G и 10-кратное более низкое связывание с K562-HLA-A/B/C (по сравнению с изотипическим контролем). Моноклональные антитела были получены как в молчащем формате — без эффекторной функции (IgG4 PAA или IgG1 AAS, где «PAA» означает P228S, L234A, L235A, а «AAS» означает мутацию L234A, L235A, D265S в нумерации EC), так и в активном формате — с нормальной эффекторной функцией (IgG1). Антитела экспрессировали в супернатанте из клеток CHO и выделяли с помощью аффинной хроматографии с белком A. Затем рекомбинантные антитела подвергали повторному скринингу (как описано выше) на селективность в отношении клеток, экспрессирующих HLA-G, а также на их способность связывать рекомбинантный HLA-G (MHGW2). На основе этих анализов была идентифицирована панель из 48 уникальных v-областей, и 8 уникальных v-областей были выбраны для дальнейшего анализа. Две из этих 8 v-областей, полученных из MHGB688 и MHGB694, были оптимизированы по зародышевой линии, что дало MHGB738 и MHGB737, соответственно.

Пример 8. Определение структурных характеристик антител к HLA-G

Вариабельные домены выбранных антител к HLA-G экспрессировали в формате Fab, формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или формате scFv в ориентации VL-линкер-VH.

Вариабельные домены VH, VL и CDR

В **таблице 43** приведены аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к HLA-G. В **таблице 44** показаны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к HLA-G по Кэботу. В **таблице 45** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбранных антител к HLA-G по Кэботу. В **таблице 46** показы HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к HLA-G по Чотиа. В **таблице 47** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител к HLA-G по Чотиа. В **таблице 48** показаны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к HLA-G по IMGT. В **таблице 49** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител к HLA-G по IMGT. В **таблице 50** показаны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к HLA-G по AbM. В **таблице 51** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител к HLA-G по AbM.

Таблица 43. Последовательности вариабельной области выбранных антител к HLA-G.

Антитело	**VH**	**SEQ ID NO:**	**VL**	**SEQ ID NO:**
MHGB665 MHGB732	QVQLQQSGPGLVKPSQTLS LTCAISGDSVSSNSAAWNW IRQSPSRGLEWLGRTYYRSK WYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVY YCAGDRRYGIVGLPFAYWG QGTLVTVSS	380	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLHSSNNK NYLTWFQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCHQYYSTPPTFGQGTK VEIK	381
MHGB668	QVQLQQSGPGLVKPSQTLS LTCAISGDSVSNNSAAWNW IRQSPSRGLEWLGRTYYRSK WYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCARYGSGTLLFDYWGQG TLVTVSS	382	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSKNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTFPYTFGQGT KLEIK	383
MHGB669	QVQLQQSGPGLVRPSQTLS VTCAISGDSVSSNSASWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSE WFNDYAVSVKSRVTINPDT SKNQLSLQLNSVIPEDTAVY YCAREARIGVAGKGFDYW GQGTLVTVSS	384	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLFRSNNK NYLAWFQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPRTFGQGT KVEIK	385
MHGB672	QVQLQQSGPGLVKPSQTLS LTCAISGDSVSSNRAAWNW IRQTPSRGLEWLGRTYYRSE	386	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLFSSNNK NYLAWYQQKPGQPPNLLI	387

Антитело	VH	SEQ ID NO:	VL	SEQ ID NO:
	WYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCARVRAAVPFDYWGQGT LVTVSS		YWASTRESGVPDRFSGSV SGTDFTLTISSLQAEDVAI YYCQQYHSTPWTFGQGT KVEIK	
MHGB687	QLQLQESGPGLVKPSETLSL MCTVSGGSITSSSYYWGWI RQPPGKGLEWIGNIYYSGTT YYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCA AGARDFDSWGQGSLVTVSS	388	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSSNKS YLAWYQQRPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPRMYTFGQ GTKLEIK	389
MHGB688	EVQLLESGPGLVKPSQTLSL TCVISGDSVSSNRAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSK WYNDYAVSVKSRITINSDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVY YCARVRPGIPFDYWGQGTP VTVSS	390	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLFSSNKK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYNSTPWTFGQGT KVEIK	391
MHGB689	QVQLQQSGPGLVKPSQTLS LTCVISGDSVSSNRAAWNW IRQSPSRGLEWLGRTYYRSK WYNDYAVSVKSRITINSDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVY YCARVRPGIPFDYWGQGTT VTVSS	392	DIQMTQSPDSLAVSLGER ATINCESSQSVLFSSNKKN YLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTINRLQAEDVAV YYCQQYNSTPWTFGQGT KVEIK	393
MHGB694	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYAMHWVR QAPGKGLDWVSGISGSGFS TYYVDSVKGRFTISRDNSK HTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKDNLVAGTVFDYWGQ GTLVTVSS	394	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYKASSL ESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQY NSYSLTFGGGTKVDIK	395
MHGB737 (GL-оптимизированный B694)	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYAMHWVR QAPGKGLEWVSGISGSGFST YYVDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDNLVAGTVFDYWGQGT LVTVSS	396	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYKASSL ESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQY NSYSLTFGGGTKVDIK	397
MHGB738 (GL-оптимизированный B688)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLS LTCAISGDSVSSNRAAWNW IRQSPSRGLEWLGRTYYRSK WYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVY	398	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLFSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSV SGTDFTLTISSLQAEDVAV	399

Антитело	**VH**	**SEQ ID NO:**	**VL**	**SEQ ID NO:**
	YCARVRPGIPFDYWGQGTP VTVSS		YYCQQYHSTPWTFGQGT KVEIK	

Таблица 44. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к HLA-G по Кэботу.

	HCDR1 по Кэботу		HCDR2 по Кэботу		HCDR3 по Кэботу	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
MHGB665	SNSAAWN	400	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	401	DRRYGIVGLPFAY	402
MHGB668	NNSAAWN	403	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	401	YGSGTLLFDY	405
MHGB669	SNSASWN	406	RTYYRSEWFNDYAVSVKS	407	EARIGVAGKGFDY	408
MHGB672	SNRAAWN	409	RTYYRSEWYNDYAVSVKS	410	VRAAVPFDY	411
MHGB687	SSSYYWG	412	NIYYSGTTYYNPSLKS	413	GARDFDS	414
MHGB688	SNRAAWN	409	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	401	VRPGIPFDY	415
MHGB689	SNRAAWN	409	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	401	VRPGIPFDY	415
MHGB694	SYAMH	416	GISGSGFSTYYVDSVKG	417	DNLVAGTVFDY	418
MHGB732	SNSAAWN	400	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	401	DRRYGIVGLPFAY	402
MHGB737	SYAMH	416	GISGSGFSTYYVDSVKG	417	DNLVAGTVFDY	418
MHGB738	SNRAAWN	409	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	401	VRPGIPFDY	415

Таблица 45. LCDR1, lCDR2 и LCDR3 выбранных антител к HLA-G по Кэботу.

	LCDR1 по Кэботу		LCDR2 по Кэботу		LCDR3 по Кэботу	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:

MHGB665	KSSQSVLHSSNNKNYLT	419	WASTRES	420	HQYYSTPPT	421
MHGB668	KSSQSVLYSSKNKNYLA	422	WASTRES	420	QQYYSTFPYT	423
MHGB669	KSSQSVLFRSNNKNYLA	424	WASTRES	420	QQYYSTPRT	425
MHGB672	KSSQSVLFSSNNKNYLA	426	WASTRES	420	QQYHSTPWT	427
MHGB687	KSSQSVLYSSSNKSYLA	428	WASTRES	420	QQYYSTPRMYT	429
MHGB688	KSSQSVLFSSNKKNYLA	430	WASTRES	420	QQYNSTPWT	431
MHGB689	ESSQSVLFSSNKKNYLA	432	WASTRES	420	QQYNSTPWT	431
MHGB694	RASQSISSWLA	433	KASSLES	434	QQYNSYSLT	435
MHGB732	KSSQSVLHSSNNKNYLT	419	WASTRES	420	HQYYSTPPT	421
MHGB737	RASQSISSWLA	433	KASSLES	434	QQYNSYSLT	435
MHGB738	KSSQSVLFSSNNKNYLA	426	WASTRES	420	QQYHSTPWT	427

Таблица 46. HCDR1, hCDR2 и HCDR3 выбранных антител к HLA-G по Чотиа.

	HCDR1 по Чотиа		HCDR2 по Чотиа		HCDR3 по Чотиа	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
MHGB665	GDSVSSNSA	436	YYRSKWY	437	DRRYGIVGLPFA	438
MHGB668	GDSVSNNSA	439	YYRSKWY	437	YGSGTLLFD	440
MHGB669	GDSVSSNSA	436	YYRSEWF	441	EARIGVAGKGFD	442
MHGB672	GDSVSSNRA	443	YYRSEWY	444	VRAAVPFD	445
MHGB687	GGSITSSSY	446	YYSGT	447	GARDFD	448
MHGB688	GDSVSSNRA	443	YYRSKWY	437	VRPGIPFD	449
MHGB689	GDSVSSNRA	443	YYRSKWY	437	VRPGIPFD	449
MHGB694	GFTFSSY	450	SGSGFS	451	DNLVAGTVFD	452
MHGB732	GDSVSSNSA	436	YYRSKWY	437	DRRYGIVGLPFA	438
MHGB737	GFTFSSY	450	SGSGFS	451	DNLVAGTVFD	452

MHGB738	GDSVSSNRA	443	YYRSKWY	437	VRPGIPFD	449

Таблица 47. LCDR1, lCDR2 и LCDR3 антител к HLA-G по Чотиа.

	LCDR1 по Чотиа		LCDR2 по Чотиа		LCDR3 по Чотиа	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
MHGB665	SQSVLHSSNNKNY	453	WAS	454	YYSTPP	455
MHGB668	SQSVLYSSKNKNY	456	WAS	454	YYSTFPY	457
MHGB669	SQSVLFRSNNKNY	458	WAS	454	YYSTPR	459
MHGB672	SQSVLFSSNNKNY	460	WAS	454	YHSTPW	461
MHGB687	SQSVLYSSSNKSY	462	WAS	454	YYSTPRMY	728
MHGB688	SQSVLFSSNKKNY	463	WAS	454	YNSTPW	464
MHGB689	SQSVLFSSNKKNY	463	WAS	454	YNSTPW	464
MHGB694	SQSISSW	465	KAS	466	YNSYSL	467
MHGB732	SQSVLHSSNNKNY	453	WAS	454	YYSTPP	455
MHGB737	SQSISSW	465	KAS	466	YNSYSL	467
MHGB738	SQSVLFSSNNKNY	460	WAS	454	YHSTPW	461

Таблица 48. HCDR1, hCDR2 и HCDR3 выбранных антител к HLA-G по IMGT.

	HCDR1 по IMGT		HCDR2 по IMGT		HCDR3 по IMGT	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
MHGB665	GDSVSSNSAA	468	TYYRSKWYN	469	AGDRRYGIVGLPFAY	470
MHGB668	GDSVSNNSAA	471	TYYRSKWYN	469	ARYGSGTLLFDY	472
MHGB669	GDSVSSNSAS	473	TYYRSEWFN	474	AREARIGVAGKGFDY	475
MHGB672	GDSVSSNRAA	476	TYYRSEWYN	477	ARVRAAVPFDY	478
MHGB687	GGSITSSSYY	479	IYYSGTT	480	AAGARDFDS	481
MHGB688	GDSVSSNRAA	476	TYYRSKWYN	469	ARVRPGIPFDY	482

MHGB689	GDSVSSNRAA	476	TYYRSKWYN	469	ARVRPGIPFDY	482
MHGB694	GFTFSSYA	483	ISGSGFST	484	AKDNLVAGTVFDY	485
MHGB732	GDSVSSNSAA	468	TYYRSKWYN	469	AGDRRYGIVGLPFAY	470
MHGB737	GFTFSSYA	483	ISGSGFST	484	AKDNLVAGTVFDY	485
MHGB738	GDSVSSNRAA	476	TYYRSKWYN	469	ARVRPGIPFDY	482

Таблица 49. LCDR1, lCDR2 и LCDR3 антител к HLA-G по IMGT.

	LCDR1 по IMGT		LCDR2 по IMGT		LCDR3 по IMGT	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
MHGB665	QSVLHSSNNKNY	486	WAS	454	HQYYSTPPT	487
MHGB668	QSVLYSSKNKNY	488	WAS	454	QQYYSTFPYT	489
MHGB669	QSVLFRSNNKNY	490	WAS	454	QQYYSTPRT	491
MHGB672	QSVLFSSNNKNY	492	WAS	454	QQYHSTPWT	493
MHGB687	QSVLYSSSNKSY	494	WAS	454	QQYYSTPRMYT	495
MHGB688	QSVLFSSNKKNY	496	WAS	454	QQYNSTPWT	497
MHGB689	QSVLFSSNKKNY	496	WAS	454	QQYNSTPWT	497
MHGB694	QSISSW	498	KAS	466	QQYNSYSLT	499
MHGB732	QSVLHSSNNKNY	486	WAS	454	HQYYSTPPT	487
MHGB737	QSISSW	498	KAS	466	QQYNSYSLT	499
MHGB738	QSVLFSSNNKNY	492	WAS	454	QQYHSTPWT	493

Таблица 50. HCDR1, hCDR2 и HCDR3 выбранных антител к HLA-G по AbM.

	HCDR1 AbM		HCDR2 AbM		HCDR3 AbM	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
MHGB665	GDSVSSNSAAWN	500	RTYYRSKWYND	501	DRRYGIVGLPFAY	502
MHGB668	GDSVSNNSAAWN	503	RTYYRSKWYND	501	YGSGTLLFDY	504
MHGB669	GDSVSSNSASWN	505	RTYYRSEWFND	506	EARIGVAGKGFDY	507
MHGB672	GDSVSSNRAAWN	508	RTYYRSEWYND	509	VRAAVPFDY	510
MHGB687	GGSITSSSYYWG	511	NIYYSGTTY	512	GARDFDS	513
MHGB688	GDSVSSNRAAWN	508	RTYYRSKWYND	501	VRPGIPFDY	514
MHGB689	GDSVSSNRAAWN	508	RTYYRSKWYND	501	VRPGIPFDY	514
MHGB694	GFTFSSYAMH	515	GISGSGFSTY	516	DNLVAGTVFDY	517
MHGB732	GDSVSSNSAAWN	500	RTYYRSKWYND	501	DRRYGIVGLPFAY	502
MHGB737	GFTFSSYAMH	515	GISGSGFSTY	516	DNLVAGTVFDY	517
MHGB738	GDSVSSNRAAWN	508	RTYYRSKWYND	501	VRPGIPFDY	514

Таблица 51. LCDR1, lCDR2 и LCDR3 антител к HLA-G по AbM.

	LCDR1 AbM		LCDR2 AbM		LCDR3 AbM	
Название мАт	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
MHGB665	KSSQSVLHSSNNKNYLT	518	WASTRES	519	HQYYSTPPT	520
MHGB668	KSSQSVLYSSKNKNYLA	521	WASTRES	519	QQYYSTFPYT	522
MHGB669	KSSQSVLFRSNNKNYLA	523	WASTRES	519	QQYYSTPRT	524
MHGB672	KSSQSVLFSSNNKNYLA	525	WASTRES	519	QQYHSTPWT	526

MHGB687	KSSQSVLYSSSNKSYLA	527	WASTRES	519	QQYYSTPRMYT	528
MHGB688	KSSQSVLFSSNKKNYLA	529	WASTRES	519	QQYNSTPWT	530
MHGB689	ESSQSVLFSSNKKNYLA	531	WASTRES	519	QQYNSTPWT	530
MHGB694	RASQSISSWLA	532	KASSLES	533	QQYNSYSLT	534
MHGB732	KSSQSVLHSSNNKNYLT	518	WASTRES	519	HQYYSTPPT	520
MHGB737	RASQSISSWLA	532	KASSLES	533	QQYNSYSLT	534
MHGB738	KSSQSVLFSSNNKNYLA	525	WASTRES	519	QQYHSTPWT	526

Оптимизация зародышевой линии

Последовательности v-области антител анализировали на риск потенциальных посттрансляционных модификаций, на пригодность зародышевой линии и на их способность форматироваться в виде scFv. Два антитела, MHGB694 и MHGB688, были оптимизированы по зародышевой линии. V-область MHGB694 содержала две мутации зародышевой линии (E46D и N77H), и, таким образом, эта v-область была оптимизирована путем обратной мутации этих остатков в последовательность зародышевой линии в этих сайтах для получения вариабельной области MHGB737 путем мутации D46E и H77N в домене VH. V-область MHGB688 была аналогичным образом оптимизирована путем мутации E1Q, L5Q, E6Q и S71P в домене VH и путем мутации K30E, G66V в VL. Было обнаружено, что MHGB688 также содержит мотив «NS» в положениях 92–93 (Кэбот), что представляет риск дезамидирования. Поскольку VL MHGB672 имела идентичные LC-CDR, за исключением того, что она содержала «HS» в положениях 92–93, был мутирован N92H. Эта комбинация изменений дала MHGB738.

Fab-Fc и scFv

HLA-G-специфичные домены VH/VL были сконструированы для экспрессии либо в формате антитела, либо в виде scFv, либо в виде плеча биспецифического (либо в виде Fab-Fc, либо в виде scFv-Fc). Формат антитела и формат биспецифического плеча Fab-Fc включали тяжелую цепь как VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и легкую цепь как VL-CL и экспрессировались как IgG2 или IgG4. Формат scFv-Fc

включал либо ориентацию VH-линкер-VL-Fc, либо ориентацию VL-линкер-VH-Fc. Линкер, используемый в scFv, представлял собой линкер SEQ ID NO: 31, описанный выше. scFv-Fc и Fab-Fc применяли для получения биспецифических антител, как описано в примере 14.

В **таблице 52** показаны аминокислотные последовательности HC выбранных антител к HLA-G. В **таблице 53** показаны аминокислотные последовательности LC выбранных антител к HLA-G. В **таблице 54** суммированы SEQ ID NO ДНК HC и LC выбранных антител к HLA-G. В **таблице 55** показаны аминокислотные последовательности выбранных scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH. В **таблице 56** показаны аминокислотные последовательности выбранных scFv-Fc. В **таблице 57** показаны SEQ ID NO ДНК scFv и scFv-Fc выбранных антител к HLA-G в формате scFv-Fc.

Таблица 52. Аминокислотная последовательность HC (VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3) выбранных антител к -HLA-G в формате мАт.

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ HLA-G	SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
MHGB665 HC	535	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQIS LQLNSVTPEDTAVYYCAGDRRYGIVGLPFAYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
MHGB668 HC	536	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSNNSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQF SLQLNSVTPEDTAVYYCARYGSGTLLFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ HLA-G	SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
MHGB669 HC	537	QVQLQQSGPGLVRPSQTLSVTCAISGDSVSSNSASWNWIRQS PSRGLEWLGRTYYRSEWFNDYAVSVKSRVTINPDTSKNQLS LQLNSVIPEDTAVYYCAREARIGVAGKGFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
MHGB672 HC	538	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQ TPSRGLEWLGRTYYRSEWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQF SLQLNSVTPEDTAVYYCARVRAAVPFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
MHGB687 HC	539	QLQLQESGPGLVKPSETLSLMCTVSGGSITSSSYYWGWIRQP PGKGLEWIGNIYYSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAAGARDFDSWGQGSLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
MHGB688 HC	540	EVQLLESGPGLVKPSQTLSLTCVISGDSVSSNRAAWNWIRQS PSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINSDTSKNQISL QLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTPVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ HLA-G	SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
MHGB689 HC	541	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCVISGDSVSSNRAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINSDTSKNQIS LQLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
MHGB694 HC	542	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLDWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTISRDNSKHTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
MHGB732 HC	543	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQIS LQLNSVTPEDTAVYYCAGDRRYGIVGLPFAYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
MHGB737 HC	544	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ HLA-G	SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
MHGB738 HC	545	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQIS LQLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTPVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Таблица 53. Аминокислотные последовательности LC (VL-CL) выбранных антител к HLA-G в формате мАт (Fab-Fc).

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ HLA-G	SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
MHGB665	546	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNY LTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
MHGB668	547	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSKNKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTFPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
MHGB669	548	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFRSNNKNYL AWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
MHGB672	549	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYL AWYQQKPGQPPNLLIYWASTRESGVPDRFSGSVSGTDF TLTISSLQAEDVAIYYCQQYHSTPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
MHGB687	550	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSSNKSYL AWYQQRPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ HLA-G	SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		TLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRMYTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
MHGB688	551	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNKKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCQQYNSTPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
MHGB689	552	DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSVLFSSNKKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTINRLQAEDVAVYYCQQYNSTPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
MHGB694	553	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPDDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKVDIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
MHGB732	554	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNY LTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
MHGB737	555	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPDDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKVDIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
MHGB738	556	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSVSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCQQYHSTPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 54. SEQ ID NO последовательностей кДНК HC и LC выбранных антител к HLA-G

Антитело	кДНК HC с SEQ ID NO:	кДНК LC с SEQ ID NO:
MHGB665	557	558
MHGB668	559	560
MHGB669	561	562
MHGB672	563	564
MHGB687	565	566
MHGB688	567	568
MHGB689	569	570
MHGB694	571	572
MHGB732	573	574
MHGB737	575	576
MHGB738	577	578

SEQ ID NO: 557

CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGACTGGTGAAGCCCAGCCAGAC
CCTGAGCCTGACCTGCGCTATCAGCGGCGATAGCGTGAGCTCCAACAGCGCCGCC
TGGAACTGGATCAGGCAGAGCCCTAGCAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACC
TACTACAGGAGCAAGTGGTACAACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGAGCAGGATC
ACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGATCAGCCTGCAGCTGAACAGCGTG
ACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGGCGACAGAAGGTACGGCATC
GTGGGCCTGCCTTTCGCCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACCGTGAGCAGCG
CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG
TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG
CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA
CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA
AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG

TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT
ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAA

SEQ ID NO: 558

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCTGGGCGA
GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGCACAGCAGCAACAA
CAAGAACTACCTGACCTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTG
ATCTACTGGGCTAGCACCAGAGAGTCCGGCGTGCCTGACAGGTTCAGCGGAAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTG
GCCGTGTACTACTGCCACCAGTACTACAGCACCCCCCCTACCTTTGGCCAGGGCA
CCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC
ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC
CTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA
GGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 559

CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGGCCTGGTGAAACCCAGCCAGAC
CCTGAGCCTGACCTGCGCCATCAGCGGCGACAGCGTGAGCAACAACAGCGCCGC
CTGGAACTGGATCAGGCAGAGCCCCAGCAGAGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGAC
CTACTACAGGAGCAAGTGGTACAACGACTACGCCGTGAGCGTGAAGAGCAGGAT
CACCATCAACCCCGACACCTCCAAGAACCAGTTCAGCCTGCAGCTGAACAGCGTG
ACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTATGGCAGCGGCACCCTGC
TGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGAGCAGCGCCTCCACCAA
GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT
GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTC
CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC

ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA
CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGA
TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 560

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCTGGGAGA
GAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACAGCAGCAAGAA
CAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCCAAGCTGCT
GATCTACTGGGCCAGCACAAGGGAAAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGAAG
CGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGATGT
GGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCTTCCCCTACACCTTCGGCCAG
GGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA
ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA
CAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT
CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC
AACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 561

CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGGACTGGTGAGACCCAGCCAGAC
CCTGAGCGTGACCTGCGCCATCAGCGGCGACAGCGTGAGCAGCAACAGCGCCAG
CTGGAACTGGATCAGGCAGAGCCCCAGCAGAGGCCTGGAGTGGCTGGGAAGGAC
ATACTACAGGAGCGAGTGGTTCAACGACTACGCCGTGAGCGTGAAGAGCAGGGT
GACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGCTGAGCCTGCAGCTGAACAGCGT

GATCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGGCCAGAATCGGCGT
GGCCGGCAAAGGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCAG
CGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACC
TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
TGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC
TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA
CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCC
CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC
CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA
AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
GGTAAA

SEQ ID NO: 562

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCTGACTCCCTGGCTGTGAGCCTGGGCGA
GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTTCAGGAGCAACAA
CAAGAACTACCTGGCCTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTG
ATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAGAGCGGCGTGCCCGATAGATTTAGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGG
CCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCAGAACCTTCGGCCAGGGCAC
CAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT
CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG
TAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT
CAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC

CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG
GGAGAGTGT

SEQ ID NO: 563

CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCAGCCAGAC
CCTGAGCCTGACATGCGCCATCAGCGGCGACAGCGTGAGCAGCAATAGGGCCGC
CTGGAACTGGATCAGGCAGACCCCTAGCAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGAC
ATACTACAGGAGCGAGTGGTACAACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGAGCAGGAT
CACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGCAGCTGAACAGCGT
GACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGTGAGAGCCGCCGTGCCT
TTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGAGCAGCGCCTCCACCAAG
GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG
CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG
GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCC
TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA
CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC
ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT
GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA
CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 564

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCTGGGCGA
GAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTTTTCCAGCAACAA
CAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCCAACCTGCTG
ATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTAGCGGCAGC
GTGAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTG

GCCATCTACTACTGCCAGCAGTACCACAGCACCCCCTGGACATTCGGCCAGGGCA
CCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC
ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC
CTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA
GGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 565

CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGACTGGTGAAGCCCAGCGAGAC
CCTGAGCCTGATGTGCACCGTGAGCGGCGGCAGCATCACCAGCAGCAGCTACTAC
TGGGGATGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATC
TACTACAGCGGCACCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGAGCAGGGTGACCATC
AGCGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCT
GCCGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCGCCGGAGCCAGAGACTTCGACAGCTGGG
GACAGGGCAGCCTGGTGACCGTGTCCAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT
CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC
CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCC
TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC
CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC
TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGG
GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT
GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA
CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 566

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGAGA
GAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGAGCGTGCTGTACAGCTCCAGCAAC
AAGAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAGGCCCGGACAGCCTCCCAAGCTGCTG
ATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAGAGCGGCGTGCCTGACAGGTTTAGCGGCTCC
GGCTCCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGATGTGG
CCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCAGGATGTACACCTTCGGCCA
GGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC
CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC
AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT
CAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 567

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACC
CTCTCACTCACCTGTGTCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGAGCTGCTTGG
AACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTA
CAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCA
ATTCAGACACATCCAAGAACCAGATCTCCCTGCAGTTGAACTCTGTGACTCCCGAG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGTGAGACCGGGGATCCCATTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC
CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCT
GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT
CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC
TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGAC
CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC
TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC

ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 568

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAG
AGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATTCAGCTCCAACAAAA
AGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCCCCTAAGCTGCTCAT
TTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGG
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAG
TTTATTACTGTCAGCAATATAATAGTACTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA
ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA
GCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT
GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGT

SEQ ID NO: 569

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACC
CTCTCACTCACCTGTGTCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGAGCTGCCTGG
AACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTA
CAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTTTCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCA
ATTCAGACACATCCAAGAACCAGATCTCCCTGCAGTTGAACTCTGTGACTCCCGAG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGTGAGACCGGGGATCCCTTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC
CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCT
GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT
CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC
TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC

CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC
TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 570

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAG
AGGGCCACCATCAACTGCGAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATTCAGCTCCAACAAAA
AGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCCCCTAAGCTGCTCAT
TTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGG
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACCGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAG
TTTATTACTGTCAGCAATATAATAGTACTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA
ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA
GCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT
GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGT

SEQ ID NO: 571

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGCACT
GGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGACTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTA
GTGGCTTTAGCACATACTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGCACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATAATTTAGTGGCTGGTACCGTCTTTGAC
TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAT

CGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCA
GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC
TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT
TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA
TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 572

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTT
AGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCAC
TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGT
ATAATAGTTATTCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATATCAAACGTAC
GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT
ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAG
CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG
CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 573

CAAGTACAACTGCAACAAAGTGGTCCTGGGCTCGTGAAGCCTTCCCAGACTC
TCAGCCTCACATGCGCTATAAGTGGGGATTCTGTTTCCTCAAATTCAGCAGCCTGGA

ATTGGATACGACAGTCTCCATCCCGTGGCCTTGAGTGGCTTGGTAGAACTTATTACC
GATCCAAGTGGTACAATGATTACGCCGTTTCAGTGAAGTCCCGCATTACTATTAATC
CCGACACATCTAAGAATCAAATTTCATTGCAACTGAATAGCGTAACACCCGAAGAT
ACAGCAGTTTATTATTGTGCAGGTGATCGACGCTACGGCATAGTGGGACTTCCTTTC
GCCTATTGGGGCCAAGGGACACTGGTCACTGTGTCATCCGCCTCCACCAAGGGCCC
ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC
CCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTGCTG
GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC
GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC
AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGT
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 574

GACATCGTAATGACACAGTCACCAGATTCATTGGCAGTTAGTCTGGGTGA
AAGGGCAACAATCAACTGCAAGTCTTCTCAGAGTGTACTGCATAGTTCTAACAAT
AAGAACTACCTTACCTGGTTTCAACAGAAACCAGGTCAGCCCCCCAAGTTGCTGA
TTTACTGGGCAAGCACCCGCGAATCCGGCGTTCCCGATCGATTTTCAGGTTCCGG
GAGTGGGACCGACTTTACCTTGACCATCTCTTCCTTGCAGGCCGAAGATGTAGCC
GTCTATTACTGCCATCAGTATTACTCTACTCCCCCCACATTCGGTCAAGGTACAAA
AGTTGAGATAAAACGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCG
ACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTA
CCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAA
CTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCC

TCCACACTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCG
AAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGA
GTGT

SEQ ID NO: 575

GAGGTGCAACTCCTTGAATCAGGCGGAGGACTCGTCCAACCTGGAGGGAG
TCTTAGGCTTAGCTGTGCAGCCAGTGGCTTTACTTTTAGCAGCTATGCAATGCACT
GGGTCAGGCAGGCTCCTGGTAAGGGGCTCGAATGGGTCAGCGGCATATCCGGGT
CAGGTTTCTCTACATATTATGTCGATTCTGTAAAAGGACGATTCACCATATCCAGA
GACAATTCTAAAAATACCTTGTATCTCCAGATGAACAGCCTGAGAGCAGAAGATA
CCGCAGTTTATTACTGTGCAAAGGATAATCTGGTTGCCGGGACAGTTTTTGATTAT
TGGGGGCAAGGCACCCTCGTCACAGTATCCAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
TCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA
GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTG
CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA
TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA
CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTA
GATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 576

GATATTCAGATGACTCAATCACCTTCAACCCTTAGCGCCTCCGTTGGAGAT
CGCGTTACCATTACCTGCCGAGCCTCCCAAAGTATCAGCTCATGGTTGGCATGGT
ATCAACAGAAGCCTGGAAAGGCACCCAAACTTCTGATTTACAAAGCCAGCTCCTT
GGAGTCAGGAGTCCCAAGCCGGTTCAGCGGATCTGGGTCAGGGACAGAATTTAC

CCTGACCATATCTTCCCTTCAGCCCGACGACTTCGCCACTTACTATTGTCAGCAAT
ACAACTCCTATTCCCTGACTTTCGGCGGTGGCACAAAGGTTGACATCAAGCGGAC
AGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCG
GCACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGT
GCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGAC
CGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCC
AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGC
CTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT

SEQ ID NO: 577

CAGGTGCAGCTTCAACAGAGCGGACCTGGTCTGGTTAAGCCTTCCCAAAC
CCTGAGCCTGACTTGTGCTATTTCCGGGGATAGTGTTAGCTCCAATAGGGCAGCA
TGGAACTGGATCAGACAGTCCCCAAGCCGTGGACTTGAGTGGCTTGGACGTACTT
ATTACAGGAGTAAATGGTACAATGATTATGCCGTTTCTGTGAAGAGCCGTATTAC
TATAAACCCAGATACTTCTAAAAATCAAATTTCCCTTCAGCTCAACTCAGTTACAC
CAGAGGATACTGCAGTCTATTATTGCGCAAGAGTTCGACCTGGCATTCCCTTCGA
TTATTGGGGGCAGGGGACACCCGTTACTGTGTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCC
TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA
CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA
CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG
TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGA
ACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC
TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGT
CTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 578

GATATTGTTATGACACAGTCCCCAGATTCATTGGCAGTAAGCCTCGGTGAA
CGGGCTACTATTAACTGTAAGTCTTCCCAGAGTGTATTGTTCTCTTCAAATAACAA
AAACTACCTGGCATGGTATCAGCAAAAGCCTGGTCAACCCCCTAAACTTCTCATA
TACTGGGCATCCACTCGGGAGAGCGGTGTGCCAGACCGTTTCTCAGGGAGTGTGT
CAGGTACAGATTTTACACTCACAATTTCCAGCCTCCAAGCCGAAGACGTTGCAGT
ATATTATTGCCAACAATATCACTCTACACCTTGGACATTTGGTCAAGGTACTAAA
GTCGAAATCAAACGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGA
CGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTAC
CCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAAC
TCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCT
CCACACTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCG
AAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGA
GTGT

Таблица 55. Аминокислотные последовательности scFv антител HLA-G в формате VH-линкер-VL (HL) или в формате VL-линкер-VH (LH).

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
MHGB665-HL	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAGDRRYGIVGLPFAYWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSL AVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIK	579
MHGB665-LH	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNYL TWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAI SGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYN DYAVSVKSRITINPDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAG DRRYGIVGLPFAYWGQGTLVTVSS	580
MHGB668-HL	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSNNSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYGSGTLLFDYWGQGT LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSLAVS LGERATINCKSSQSVLYSSKNKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY	581

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
	YCQQYYSTFPYTFGQGTKLEIK	
MHGB668-LH	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSKNKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTFPYTFGQGTKLEIKGGS EGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTC AISGDSVSNNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWY NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC ARYGSGTLLFDYWGQGTLVTVSS	582
MHGB669-HL	QVQLQQSGPGLVRPSQTLSVTCAISGDSVSSNSASWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSEWFNDYAVSVKSRVTINPDTS KNQLSLQLNSVIPEDTAVYYCAREARIGVAGKGFDYWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSL AVSLGERATINCKSSQSVLFRSNNKNYLAWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIK	583
MHGB669-LH	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFRSNNKNYL AWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVRPSQTLSVTCAI SGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSEWFND YAVSVKSRVTINPDTSKNQLSLQLNSVIPEDTAVYYCAR EARIGVAGKGFDYWGQGTLVTVSS	584
MHGB672-HL	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWI RQTPSRGLEWLGRTYYRSEWYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARVRAAVPFDYWGQGT LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSLAVS LGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLAWYQQKPGQPPNLL IYWASTRESGVPDRFSGSVSGTDFTLTISSLQAEDVAIYY CQQYHSTPWTFGQGTKVEIK	585
MHGB672-LH	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYL AWYQQKPGQPPNLLIYWASTRESGVPDRFSGSVSGTDFT LTISSLQAEDVAIYYCQQYHSTPWTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAI SGDSVSSNRAAWNWIRQTPSRGLEWLGRTYYRSEWYN DYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCA RVRAAVPFDYWGQGTLVTVSS	586
MHGB687-HL	QLQLQESGPGLVKPSETLSLMCTVSGGSITSSSYYWGWI RQPPGKGLEWIGNIYYSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCAAGARDFDSWGQGSLVTVS SGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSSNKSYLAWYQQRPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRMYTFGQGTKLEIK	587

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
MHGB687-LH	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSSNKSYLA WYQQRPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRMYTFGQGTKLEIKGGS EGKSSGSGSESKSTGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLMCT VSGGSITSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGNIYYSGTTYYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAAGA RDFDSWGQGSLVTVSS	588
MHGB688-HL	EVQLLESGPGLVKPSQTLSLTCVISGDSVSSNRAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINSDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTPV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSLAVSLG ERATINCKSSQSVLFSSNKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYNSTPWTFGQGTKVEIK	589
MHGB688-LH	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNKKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYNSTPWTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSEVQLLESGPGLVKPSQTLSLTCVI SGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYN DYAVSVKSRITINSDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAR VRPGIPFDYWGQGTPVTVSS	590
MHGB689-HL	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCVISGDSVSSNRAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINSDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTTV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPDSLAVSLG ERATINCESSQSVLFSSNKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVAVYYC QQYNSTPWTFGQGTKVEIK	591
MHGB689-LH	DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSVLFSSNKKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TINRLQAEDVAVYYCQQYNSTPWTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCVI SGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYN DYAVSVKSRITINSDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAR VRPGIPFDYWGQGTTVTVSS	592
MHGB694-HL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVR QAPGKGLDWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTISRDNSKH TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVFDYWGQGT LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSTLSAS VGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNS YSLTFGGGTKVDIK	593
MHGB694-LH	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQK PGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP	594

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
	DDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKVDIKGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMHWVRQAPGKGLDWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTI SRDNSKHTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVF DYWGQGTLVTVSS	
MHGB732-HL	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAGDRRYGIVGLPFAYWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSL AVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIK	595
MHGB732-LH	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNYL TWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAI SGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYN DYAVSVKSRITINPDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAG DRRYGIVGLPFAYWGQGTLVTVSS	596
MHGB737-HL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVR QAPGKGLEWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVFDYWGQGT LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSTLSAS VGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNS YSLTFGGGTKVDIK	597
MHGB737-LH	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQK PGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP DDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKVDIKGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMHWVRQAPGKGLEWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVF DYWGQGTLVTVSS	598
MHGB738-HL	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTPV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSLAVSLG ERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSVSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYHSTPWTFGQGTKVEIK	599
MHGB738-LH	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSVSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYHSTPWTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAI	600

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
	SGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYN DYAVSVKSRITINPDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAR VRPGIPFDYWGQGTPVTVSS	

Таблица 56. Аминокислотные последовательности scFv-Fcs.

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
MHGB665-HL-Fc	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAGDRRYGIVGLPFAYWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSL AVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	601
MHGB665-LH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNYL TWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAI SGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYN DYAVSVKSRITINPDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAG DRRYGIVGLPFAYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	602
MHGB668-HL-Fc	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSNNSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYGSGTLLFDYWGQGT LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSLAVS LGERATINCKSSQSVLYSSKNKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYYSTFPYTFGQGTKLEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV	603

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
	YVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
MHGB668-LH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSKNKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTFPYTFGQGTKLEIKGGS EGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTC AISGDSVSNNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWY NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC ARYGSGTLLFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	604
MHGB669-HL-Fc	QVQLQQSGPGLVRPSQTLSVTCAISGDSVSSNSASWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSEWFNDYAVSVKSRVTINPDTS KNQLSLQLNSVIPEDTAVYYCAREARIGVAGKGFDYWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSL AVSLGERATINCKSSQSVLFRSNNKNYLAWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	605
MHGB669-LH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFRSNNKNYL AWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVRPSQTLSVTCAI SGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSEWFND YAVSVKSRVTINPDTSKNQLSLQLNSVIPEDTAVYYCAR EARIGVAGKGFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	606
MHGB672-HL-Fc	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWI RQTPSRGLEWLGRTYYRSEWYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARVRAAVPFDYWGQGT	607

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
	LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSLAVS LGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLAWYQQKPGQPPNLL IYWASTRESGVPDRFSGSVSGTDFTLTISSLQAEDVAIYY CQQYHSTPWTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY VLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
MHGB672-LH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYL AWYQQKPGQPPNLLIYWASTRESGVPDRFSGSVSGTDFT LTISSLQAEDVAIYYCQQYHSTPWTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAI SGDSVSSNRAAWNWIRQTPSRGLEWLGRTYYRSEWYN DYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCA RVRAAVPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	608
MHGB687-HL-Fc	QLQLQESGPGLVKPSETLSLMCTVSGGSITSSSYYWGWI RQPPGKGLEWIGNIYYSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCAAGARDFDSWGQGSLVTVS SGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSSNKSYLAWYQQRPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRMYTFGQGTKLEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLP PSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	609
MHGB687-LH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSSNKSYLA WYQQRPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRMYTFGQGTKLEIKGGS EGKSSGSGSESKSTGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLMCT VSGGSITSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGNIYYSGTTYYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAAGA RDFDSWGQGSLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL	610

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
	NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPP SREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	
MHGB688-HL-Fc	EVQLLESGPGLVKPSQTLSLTCVISGDSVSSNRAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINSDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTPV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSLAVSLG ERATINCKSSQSVLFSSNKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYNSTPWTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	611
MHGB688-LH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNKKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYNSTPWTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSEVQLLESGPGLVKPSQTLSLTCVI SGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYN DYAVSVKSRITINSDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAR VRPGIPFDYWGQGTPVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY VLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	612
MHGB689-HL-Fc	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCVISGDSVSSNRAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINSDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTTV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPDSLAVSLG ERATINCESSQSVLFSSNKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVAVYYC QQYNSTPWTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	613
MHGB689-LH-Fc	DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSVLFSSNKKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL	614

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
	TINRLQAEDVAVYYCQQYNSTPWTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCVI SGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYN DYAVSVKSRITINSDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAR VRPGIPFDYWGQGTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY VLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
MHGB694-HL-Fc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVR QAPGKGLDWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTISRDNSKH TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVFDYWGQGT LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSTLSAS VGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNS YSLTFGGGTKVDIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREE MTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	615
MHGB694-LH-Fc	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQK PGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP DDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKVDIKGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMHWVRQAPGKGLDWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTI SRDNSKHTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVF DYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREE MTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	616
MHGB732-HL-Fc	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAGDRRYGIVGLPFAYWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSL AVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP	617

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
	EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
MHGB732-LH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNYL TWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAI SGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYN DYAVSVKSRITINPDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAG DRRYGIVGLPFAYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	618
MHGB737-HL-Fc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVR QAPGKGLEWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVFDYWGQGT LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSTLSAS VGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNS YSLTFGGGTKVDIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREE MTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	619
MHGB737-LH-Fc	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQK PGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP DDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKVDIKGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMHWVRQAPGKGLEWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVF DYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREE MTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	620
MHGB738-HL-	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWI	621

Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
Fc	RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTS KNQISLQLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTPV TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPDSLAVSLG ERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSVSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYHSTPWTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
MHGB738-LH-Fc	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSVSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYHSTPWTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAI SGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYN DYAVSVKSRITINPDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAR VRPGIPFDYWGQGTPVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY VLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	622

Таблица 57. Последовательности кДНК антител HLA-G scFv и scFv-Fcs.

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
MHGB665-HL	623	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGACTGGTGAAGCCCA GCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCTATCAGCGGCGATAGCGT GAGCTCCAACAGCGCCGCCTGGAACTGGATCAGGCAGAGCCCT AGCAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACCTACTACAGGAGCA AGTGGTACAACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGAGCAGGATCAC CATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGATCAGCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCG GCGACAGAAGGTACGGCATCGTGGGCCTGCCTTTCGCCTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGG GAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGG AAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTG AGCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGA

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		GCGTGCTGCACAGCAGCAACAACAAGAACTACCTGACCTGGTT CCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGG GCTAGCACCAGAGAGTCCGGCGTGCCTGACAGGTTCAGCGGAA GCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCA GGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACTACAGC ACCCCCCCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
MHGB665-LH	624	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCT GGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTG CTGCACAGCAGCAACAACAAGAACTACCTGACCTGGTTCCAGC AGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTAGC ACCAGAGAGTCCGGCGTGCCTGACAGGTTCAGCGGAAGCGGCA GCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGA GGACGTGGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACTACAGCACCCCCC CTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGGATC TGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACC GGCGGAAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGACTGG TGAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCTATCAGCGG CGATAGCGTGAGCTCCAACAGCGCCGCCTGGAACTGGATCAGG CAGAGCCCTAGCAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACCTACT ACAGGAGCAAGTGGTACAACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGAG CAGGATCACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGATCAGC CTGCAGCTGAACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCGGCGACAGAAGGTACGGCATCGTGGGCCTGCCTTTC GCCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
MHGB668-HL	625	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGGCCTGGTGAAACCCA GCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCCATCAGCGGCGACAGCGT GAGCAACAACAGCGCCGCCTGGAACTGGATCAGGCAGAGCCCC AGCAGAGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACCTACTACAGGAGCA AGTGGTACAACGACTACGCCGTGAGCGTGAAGAGCAGGATCAC CATCAACCCCGACACCTCCAAGAACCAGTTCAGCCTGCAGCTGA ACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG GTATGGCAGCGGCACCCTGCTGTTCGACTACTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTGACAGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCA GCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACAT CGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCTGGGA GAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGT ACAGCAGCAAGAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAA ACCCGGCCAGCCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACA AGGGAAAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGAAGCGGCAGCG GCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGA TGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCTTCCCCT ACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
MHG	626	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCT

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
B668-LH		GGGAGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTG CTGTACAGCAGCAAGAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGC AGAAACCCGGCCAGCCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAG CACAAGGGAAAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGAAGCGGC AGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCG AGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCTTC CCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGCG GATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTC CACCGGCGGAAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGGC CTGGTGAAACCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCCATCA GCGGCGACAGCGTGAGCAACAACAGCGCCGCCTGGAACTGGAT CAGGCAGAGCCCCAGCAGAGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACC TACTACAGGAGCAAGTGGTACAACGACTACGCCGTGAGCGTGA AGAGCAGGATCACCATCAACCCCGACACCTCCAAGAACCAGTT CAGCCTGCAGCTGAACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCGCCAGGTATGGCAGCGGCACCCTGCTGTTCGACTA CTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGAGCAGC
MHGB669-HL	627	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGGACTGGTGAGACCCA GCCAGACCCTGAGCGTGACCTGCGCCATCAGCGGCGACAGCGT GAGCAGCAACAGCGCCAGCTGGAACTGGATCAGGCAGAGCCCC AGCAGAGGCCTGGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGAGCG AGTGGTTCAACGACTACGCCGTGAGCGTGAAGAGCAGGGTGAC CATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGCTGAGCCTGCAGCTG AACAGCGTGATCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCA GAGAGGCCAGAATCGGCGTGGCCGGCAAAGGCTTCGACTACTG GGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCAGCGGCGGATCTGAG GGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG GAAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCTGACTCCCTGGCTGTG AGCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGA GCGTGCTGTTCAGGAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTTC CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGGG CCAGCACCAGAGAGAGCGGCGTGCCCGATAGATTTAGCGGCAG CGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGG CCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACC CCCAGAACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
MHGB669-LH	628	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCTGACTCCCTGGCTGTGAGCCT GGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTG CTGTTCAGGAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTTCCAGC AGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAG CACCAGAGAGAGCGGCGTGCCCGATAGATTTAGCGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGA GGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCA GAACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGGATC TGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACC

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		GGCGGAAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGGACTGG TGAGACCCAGCCAGACCCTGAGCGTGACCTGCGCCATCAGCGG CGACAGCGTGAGCAGCAACAGCGCCAGCTGGAACTGGATCAGG CAGAGCCCCAGCAGAGGCCTGGAGTGGCTGGGAAGGACATACT ACAGGAGCGAGTGGTTCAACGACTACGCCGTGAGCGTGAAGAG CAGGGTGACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGCTGAGC CTGCAGCTGAACAGCGTGATCCCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCAGAGAGGCCAGAATCGGCGTGGCCGGCAAAGGCTT CGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCAGC
MHGB672-HL	629	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCA GCCAGACCCTGAGCCTGACATGCGCCATCAGCGGCGACAGCGT GAGCAGCAATAGGGCCGCCTGGAACTGGATCAGGCAGACCCCT AGCAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACATACTACAGGAGCG AGTGGTACAACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGAGCAGGATCAC CATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCA GAGTGAGAGCCGCCGTGCCTTTCGACTACTGGGGCCAGGGCAC CCTGGTGACAGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGC GGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCG TGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCTGGGCGA GAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTTT TCCAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAAC CCGGCCAGCCCCCCAACCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGA GAAAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTAGCGGCAGCGTGAGCGGCA CCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGT GGCCATCTACTACTGCCAGCAGTACCACAGCACCCCCTGGACAT TCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
MHGB672-LH	630	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCT GGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTG CTGTTTTCCAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCA GAAACCCGGCCAGCCCCCCAACCTGCTGATCTACTGGGCCAGC ACCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTAGCGGCAGCGTGA GCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGA GGACGTGGCCATCTACTACTGCCAGCAGTACCACAGCACCCCCT GGACATTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGGATC TGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACC GGCGGAAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCTGGCCTGG TGAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACATGCGCCATCAGCGG CGACAGCGTGAGCAGCAATAGGGCCGCCTGGAACTGGATCAGG CAGACCCCTAGCAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACATACT ACAGGAGCGAGTGGTACAACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGAG CAGGATCACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGC CTGCAGCTGAACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCAGAGTGAGAGCCGCCGTGCCTTTCGACTACTGGGGC

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		CAGGGCACCCTGGTGACAGTGAGCAGC
MHGB687-HL	631	CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGACTGGTGAAGCCCA GCGAGACCCTGAGCCTGATGTGCACCGTGAGCGGCGGCAGCAT CACCAGCAGCAGCTACTACTGGGGATGGATCAGACAGCCCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACTACAGCGGCA CCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAG CGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGC GTGACAGCTGCCGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCGCCGGAGC CAGAGACTTCGACAGCTGGGGACAGGGCAGCCTGGTGACCGTG TCCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCG AAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCGTGATGACCCAGAG CCCTGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGAGAGAGAGCCACCATC AACTGCAAGTCCTCCCAGAGCGTGCTGTACAGCTCCAGCAACA AGAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAGGCCCGGACAGCCTCC CAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAGAGCGGCGTG CCTGACAGGTTTAGCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTTACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTAC TGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCAGGATGTACACCTTCGGCCA GGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
MHGB687-LH	632	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGAGCCT GGGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGAGCGTG CTGTACAGCTCCAGCAACAAGAGCTACCTGGCCTGGTACCAGC AGAGGCCCGGACAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAG CACCAGAGAGAGCGGCGTGCCTGACAGGTTTAGCGGCTCCGGC TCCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGA GGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCA GGATGTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGG CGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAG TCCACCGGCGGAAGCCAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTG GACTGGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAGCCTGATGTGCACCGT GAGCGGCGGCAGCATCACCAGCAGCAGCTACTACTGGGGATGG ATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACA TCTACTACAGCGGCACCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGAGC AGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCC TGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCTGCCGACACCGCCGTGTACTA CTGTGCCGCCGGAGCCAGAGACTTCGACAGCTGGGGACAGGGC AGCCTGGTGACCGTGTCCAGC
MHGB688-HL	633	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCT CGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGTCATCTCCGGGGACAGTGTC TCTAGCAACAGAGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATC GAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAG TGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCAT CAATTCAGACACATCCAAGAACCAGATCTCCCTGCAGTTGAACT

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		CTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGTG AGACCGGGGATCCCATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCGG TCACCGTCTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCC GGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCGTGATGA CCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC ACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATTCAGCTCCAA CAAAAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAG CCCCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGG GGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCA CTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTAT TACTGTCAGCAATATAATAGTACTCCGTGGACGTTCGGCCAAGG GACCAAGGTGGAGATCAAA
MHGB688-LH	634	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCT GGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTT TTATTCAGCTCCAACAAAAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCA GAAACCAGGACAGCCCCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTA CCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAG ATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAATAGTACTCCGTGG ACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGCGGATCTG AGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGG CGGAAGCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCAGGTCCAGGACTGGTG AAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGTCATCTCCGGGGA CAGTGTCTCTAGCAACAGAGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGT CCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAG GTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAA TAACCATCAATTCAGACACATCCAAGAACCAGATCTCCCTGCAG TTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC AAGAGTGAGACCGGGGATCCCATTTGACTACTGGGGCCAGGGA ACCCCGGTCACCGTCTCCTCA
MHGB689-HL	635	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCT CGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGTCATCTCCGGGGACAGTGTC TCTAGCAACAGAGCTGCCTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATC GAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAG TGGTATAATGATTATGCAGTTTCTGTGAAAAGTCGAATAACCAT CAATTCAGACACATCCAAGAACCAGATCTCCCTGCAGTTGAACT CTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGTG AGACCGGGGATCCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCACGG TCACCGTCTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCC GGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGA CCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC ACCATCAACTGCGAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATTCAGCTCCAA CAAAAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAG CCCCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGG

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		GGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCA CTCTCACCATCAACCGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTAT TACTGTCAGCAATATAATAGTACTCCGTGGACGTTCGGCCAAGG GACCAAGGTGGAGATCAAA
MHG B689 -LH	636	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCT GGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCGAGTCCAGCCAGAGTGTT TTATTCAGCTCCAACAAAAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCA GAAACCAGGACAGCCCCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTA CCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACCGCCTGCAGGCTGAAGA TGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAATAGTACTCCGTGGA CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGCGGATCTGA GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGC GGAAGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGA AGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGTCATCTCCGGGGAC AGTGTCTCTAGCAACAGAGCTGCCTGGAACTGGATCAGGCAGTC CCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGG TCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTTTCTGTGAAAAGTCGAAT AACCATCAATTCAGACACATCCAAGAACCAGATCTCCCTGCAGT TGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCA AGAGTGAGACCGGGGATCCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAA CCACGGTCACCGTCTCCTCA
MHG B694 -HL	637	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT AGCAGCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGG GGCTGGACTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTAGTGGCTTTAGCACA TACTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGCACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATAATTTAGT GGCTGGTACCGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA CCGTCTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGG CAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACC CAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCT GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCG GCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAG TTATTCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATATCAAA
MHG B694 -LH	638	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATT AGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTC

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACT GCCAACAGTATAATAGTTATTCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGATATCAAAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCT CCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTGCAGCT GTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGC CATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGACTGG GTCTCAGGTATTAGTGGTAGTGGCTTTAGCACATACTATGTAGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGC ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATAATTTAGTGGCTGGTACCG TCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
MHGB732-HL	639	CAAGTACAACTGCAACAAAGTGGTCCTGGGCTCGTGAAGCCTTC CCAGACTCTCAGCCTCACATGCGCTATAAGTGGGGATTCTGTTT CCTCAAATTCAGCAGCCTGGAATTGGATACGACAGTCTCCATCC CGTGGCCTTGAGTGGCTTGGTAGAACTTATTACCGATCCAAGTG GTACAATGATTACGCCGTTTCAGTGAAGTCCCGCATTACTATTA ATCCCGACACATCTAAGAATCAAATTTCATTGCAACTGAATAGC GTAACACCCGAAGATACAGCAGTTTATTATTGTGCAGGTGATCG ACGCTACGGCATAGTGGGACTTCCTTTCGCCTATTGGGGCCAAG GGACACTGGTCACTGTGTCATCCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCC AGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACA TCGTAATGACACAGTCACCAGATTCATTGGCAGTTAGTCTGGGT GAAAGGGCAACAATCAACTGCAAGTCTTCTCAGAGTGTACTGC ATAGTTCTAACAATAAGAACTACCTTACCTGGTTTCAACAGAAA CCAGGTCAGCCCCCCAAGTTGCTGATTTACTGGGCAAGCACCCG CGAATCCGGCGTTCCCGATCGATTTTCAGGTTCCGGGAGTGGGA CCGACTTTACCTTGACCATCTCTTCCTTGCAGGCCGAAGATGTA GCCGTCTATTACTGCCATCAGTATTACTCTACTCCCCCCACATTC GGTCAAGGTACAAAAGTTGAGATAAAA
MHGB732-LH	640	GACATCGTAATGACACAGTCACCAGATTCATTGGCAGTTAGTCT GGGTGAAAGGGCAACAATCAACTGCAAGTCTTCTCAGAGTGTA CTGCATAGTTCTAACAATAAGAACTACCTTACCTGGTTTCAACA GAAACCAGGTCAGCCCCCCAAGTTGCTGATTTACTGGGCAAGC ACCCGCGAATCCGGCGTTCCCGATCGATTTTCAGGTTCCGGGAG TGGGACCGACTTTACCTTGACCATCTCTTCCTTGCAGGCCGAAG ATGTAGCCGTCTATTACTGCCATCAGTATTACTCTACTCCCCCCA CATTCGGTCAAGGTACAAAAGTTGAGATAAAAGGCGGATCTGA GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGC GGAAGCCAAGTACAACTGCAACAAAGTGGTCCTGGGCTCGTGA AGCCTTCCCAGACTCTCAGCCTCACATGCGCTATAAGTGGGGAT TCTGTTTCCTCAAATTCAGCAGCCTGGAATTGGATACGACAGTC TCCATCCCGTGGCCTTGAGTGGCTTGGTAGAACTTATTACCGAT

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		CCAAGTGGTACAATGATTACGCCGTTTCAGTGAAGTCCCGCATT ACTATTAATCCCGACACATCTAAGAATCAAATTTCATTGCAACT GAATAGCGTAACACCCGAAGATACAGCAGTTTATTATTGTGCAG GTGATCGACGCTACGGCATAGTGGGACTTCCTTTCGCCTATTGG GGCCAAGGGACACTGGTCACTGTGTCATCC
MHGB737-HL	641	GAGGTGCAACTCCTTGAATCAGGCGGAGGACTCGTCCAACCTG GAGGGAGTCTTAGGCTTAGCTGTGCAGCCAGTGGCTTTACTTTT AGCAGCTATGCAATGCACTGGGTCAGGCAGGCTCCTGGTAAGG GGCTCGAATGGGTCAGCGGCATATCCGGGTCAGGTTTCTCTACA TATTATGTCGATTCTGTAAAAGGACGATTCACCATATCCAGAGA CAATTCTAAAAATACCTTGTATCTCCAGATGAACAGCCTGAGAG CAGAAGATACCGCAGTTTATTACTGTGCAAAGGATAATCTGGTT GCCGGGACAGTTTTTGATTATTGGGGGCAAGGCACCCTCGTCAC AGTATCCAGTGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGC AGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGATATTCAGATGACTC AATCACCTTCAACCCTTAGCGCCTCCGTTGGAGATCGCGTTACC ATTACCTGCCGAGCCTCCCAAAGTATCAGCTCATGGTTGGCATG GTATCAACAGAAGCCTGGAAAGGCACCCAAACTTCTGATTTACA AAGCCAGCTCCTTGGAGTCAGGAGTCCCAAGCCGGTTCAGCGG ATCTGGGTCAGGGACAGAATTTACCCTGACCATATCTTCCCTTC AGCCCGACGACTTCGCCACTTACTATTGTCAGCAATACAACTCC TATTCCCTGACTTTCGGCGGTGGCACAAAGGTTGACATCAAG
MHGB737-LH	642	GATATTCAGATGACTCAATCACCTTCAACCCTTAGCGCCTCCGT TGGAGATCGCGTTACCATTACCTGCCGAGCCTCCCAAAGTATCA GCTCATGGTTGGCATGGTATCAACAGAAGCCTGGAAAGGCACC CAAACTTCTGATTTACAAAGCCAGCTCCTTGGAGTCAGGAGTCC CAAGCCGGTTCAGCGGATCTGGGTCAGGGACAGAATTTACCCTG ACCATATCTTCCCTTCAGCCCGACGACTTCGCCACTTACTATTGT CAGCAATACAACTCCTATTCCCTGACTTTCGGCGGTGGCACAAA GGTTGACATCAAGGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCC GGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTGCAACTCC TTGAATCAGGCGGAGGACTCGTCCAACCTGGAGGGAGTCTTAG GCTTAGCTGTGCAGCCAGTGGCTTTACTTTTAGCAGCTATGCAA TGCACTGGGTCAGGCAGGCTCCTGGTAAGGGGCTCGAATGGGT CAGCGGCATATCCGGGTCAGGTTTCTCTACATATTATGTCGATT CTGTAAAAGGACGATTCACCATATCCAGAGACAATTCTAAAAAT ACCTTGTATCTCCAGATGAACAGCCTGAGAGCAGAAGATACCG CAGTTTATTACTGTGCAAAGGATAATCTGGTTGCCGGGACAGTT TTTGATTATTGGGGGCAAGGCACCCTCGTCACAGTATCCAGT
MHGB738-HL	643	CAGGTGCAGCTTCAACAGAGCGGACCTGGTCTGGTTAAGCCTTC CCAAACCCTGAGCCTGACTTGTGCTATTTCCGGGGATAGTGTTA GCTCCAATAGGGCAGCATGGAACTGGATCAGACAGTCCCCAAG CCGTGGACTTGAGTGGCTTGGACGTACTTATTACAGGAGTAAAT

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		GGTACAATGATTATGCCGTTTCTGTGAAGAGCCGTATTACTATA AACCCAGATACTTCTAAAAATCAAATTTCCCTTCAGCTCAACTC AGTTACACCAGAGGATACTGCAGTCTATTATTGCGCAAGAGTTC GACCTGGCATTCCCTTCGATTATTGGGGGCAGGGGACACCCGTT ACTGTGTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCG GCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGATATTGTTATGAC ACAGTCCCCAGATTCATTGGCAGTAAGCCTCGGTGAACGGGCTA CTATTAACTGTAAGTCTTCCCAGAGTGTATTGTTCTCTTCAAATA ACAAAAACTACCTGGCATGGTATCAGCAAAAGCCTGGTCAACC CCCTAAACTTCTCATATACTGGGCATCCACTCGGGAGAGCGGTG TGCCAGACCGTTTCTCAGGGAGTGTGTCAGGTACAGATTTTACA CTCACAATTTCCAGCCTCCAAGCCGAAGACGTTGCAGTATATTA TTGCCAACAATATCACTCTACACCTTGGACATTTGGTCAAGGTA CTAAAGTCGAAATCAAA
MHGB738-LH	644	GATATTGTTATGACACAGTCCCCAGATTCATTGGCAGTAAGCCT CGGTGAACGGGCTACTATTAACTGTAAGTCTTCCCAGAGTGTAT TGTTCTCTTCAAATAACAAAAACTACCTGGCATGGTATCAGCAA AAGCCTGGTCAACCCCCTAAACTTCTCATATACTGGGCATCCAC TCGGGAGAGCGGTGTGCCAGACCGTTTCTCAGGGAGTGTGTCAG GTACAGATTTTACACTCACAATTTCCAGCCTCCAAGCCGAAGAC GTTGCAGTATATTATTGCCAACAATATCACTCTACACCTTGGAC ATTTGGTCAAGGTACTAAAGTCGAAATCAAAGGCGGATCTGAG GGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG GAAGCCAGGTGCAGCTTCAACAGAGCGGACCTGGTCTGGTTAA GCCTTCCCAAACCCTGAGCCTGACTTGTGCTATTTCCGGGGATA GTGTTAGCTCCAATAGGGCAGCATGGAACTGGATCAGACAGTC CCCAAGCCGTGGACTTGAGTGGCTTGGACGTACTTATTACAGGA GTAAATGGTACAATGATTATGCCGTTTCTGTGAAGAGCCGTATT ACTATAAACCCAGATACTTCTAAAAATCAAATTTCCCTTCAGCT CAACTCAGTTACACCAGAGGATACTGCAGTCTATTATTGCGCAA GAGTTCGACCTGGCATTCCCTTCGATTATTGGGGGCAGGGGACA CCCGTTACTGTGTCCTCA
MHGB665-HL-Fc	645	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGACTGGTGAAGCCCA GCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCTATCAGCGGCGATAGCGT GAGCTCCAACAGCGCCGCCTGGAACTGGATCAGGCAGAGCCCT AGCAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACCTACTACAGGAGCA AGTGGTACAACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGAGCAGGATCAC CATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGATCAGCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCG GCGACAGAAGGTACGGCATCGTGGGCCTGCCTTTCGCCTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGG GAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGG AAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTG AGCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGA

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		GCGTGCTGCACAGCAGCAACAACAAGAACTACCTGACCTGGTT CCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGG GCTAGCACCAGAGAGTCCGGCGTGCCTGACAGGTTCAGCGGAA GCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCA GGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACTACAGC ACCCCCCCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGG AGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACTTGTCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA
MHGB665-LH-Fc	646	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCT GGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTG CTGCACAGCAGCAACAACAAGAACTACCTGACCTGGTTCCAGC AGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTAGC ACCAGAGAGTCCGGCGTGCCTGACAGGTTCAGCGGAAGCGGCA GCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGA GGACGTGGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACTACAGCACCCCCC CTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGGATC TGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACC GGCGGAAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGACTGG TGAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCTATCAGCGG CGATAGCGTGAGCTCCAACAGCGCCGCCTGGAACTGGATCAGG CAGAGCCCTAGCAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACCTACT ACAGGAGCAAGTGGTACAACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGAG CAGGATCACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGATCAGC CTGCAGCTGAACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCGGCGACAGAAGGTACGGCATCGTGGGCCTGCCTTTC GCCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACCGTGAGCAGCgagccca aatctagcgacaaaactcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtctt cctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtg agcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgca

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		ccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcga gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccggg aggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgt ggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacg gctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgct ccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB668-HL-Fc	647	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGGCCTGGTGAAACCCA GCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCCATCAGCGGCGACAGCGT GAGCAACAACAGCGCCGCCTGGAACTGGATCAGGCAGAGCCCC AGCAGAGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACCTACTACAGGAGCA AGTGGTACAACGACTACGCCGTGAGCGTGAAGAGCAGGATCAC CATCAACCCCGACACCTCCAAGAACCAGTTCAGCCTGCAGCTGA ACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG GTATGGCAGCGGCACCCTGCTGTTCGACTACTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTGACAGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCA GCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACAT CGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCTGGGA GAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGT ACAGCAGCAAGAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAA ACCCGGCCAGCCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACA AGGGAAAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGAAGCGGCAGCG GCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGA TGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCTTCCCCT ACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGgagcccaaatcta gcgacaaaactcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctctt ccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgt gagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac aaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccagg actggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaa ccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgccccatcccgggaggag atgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt gggagagcaatgggcagccggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctcct tcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg atgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB668-LH-Fc	648	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCT GGGAGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTG CTGTACAGCAGCAAGAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGC AGAAACCCGGCCAGCCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAG CACAAGGGAAAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGAAGCGGC AGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCG AGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCTTC CCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGCG GATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTC CACCGGCGGAAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGGC

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		CTGGTGAAACCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCCATCA GCGGCGACAGCGTGAGCAACAACAGCGCCGCCTGGAACTGGAT CAGGCAGAGCCCCAGCAGAGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACC TACTACAGGAGCAAGTGGTACAACGACTACGCCGTGAGCGTGA AGAGCAGGATCACCATCAACCCCGACACCTCCAAGAACCAGTT CAGCCTGCAGCTGAACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCGCCAGGTATGGCAGCGGCACCCTGCTGTTCGACTA CTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGAGCAGCgagcccaaatctagc gacaaaactcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcc ccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtga gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaa agccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggact ggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacc atctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagat gaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgg gagagcaatgggcagccggagaacaactacctcaccctggcctcccgtgctggactccgacggctccttct tcctctacagcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatg catgaggctctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB669-HL-Fc	649	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGGACTGGTGAGACCCA GCCAGACCCTGAGCGTGACCTGCGCCATCAGCGGCGACAGCGT GAGCAGCAACAGCGCCAGCTGGAACTGGATCAGGCAGAGCCCC AGCAGAGGCCTGGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGAGCG AGTGGTTCAACGACTACGCCGTGAGCGTGAAGAGCAGGGTGAC CATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGCTGAGCCTGCAGCTG AACAGCGTGATCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCA GAGAGGCCAGAATCGGCGTGGCCGGCAAAGGCTTCGACTACTG GGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCAGCGGCGGATCTGAG GGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG GAAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCTGACTCCCTGGCTGTG AGCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGA GCGTGCTGTTCAGGAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTTC CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGGG CCAGCACCAGAGAGAGCGGCGTGCCCGATAGATTTAGCGGCAG CGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGG CCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACC CCCAGAACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGgagccc aaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtct tcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtg agcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgca ccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcga gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccggg aggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgt ggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacg

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		gctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagaggggaacgtcttctcatgct ccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB669-LH-Fc	650	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCTGACTCCCTGGCTGTGAGCCT GGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTG CTGTTCAGGAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTTCCAGC AGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAG CACCAGAGAGAGCGGCGTGCCCGATAGATTTAGCGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGA GGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCA GAACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGGATC TGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACC GGCGGAAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGGACTGG TGAGACCCAGCCAGACCCTGAGCGTGACCTGCGCCATCAGCGG CGACAGCGTGAGCAGCAACAGCGCCAGCTGGAACTGGATCAGG CAGAGCCCCAGCAGAGGCCTGGAGTGGCTGGGAAGGACATACT ACAGGAGCGAGTGGTTCAACGACTACGCCGTGAGCGTGAAGAG CAGGGTGACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGCTGAGC CTGCAGCTGAACAGCGTGATCCCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCAGAGAGGCCAGAATCGGCGTGGCCGGCAAAGGCTT CGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCAGCgagcc caaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagt cttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtgg tgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatg ccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatc gagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgccccatcccg ggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccg acggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagaggggaacgtcttctca tgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB672-HL-Fc	651	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCA GCCAGACCCTGAGCCTGACATGCGCCATCAGCGGCGACAGCGT GAGCAGCAATAGGGCCGCCTGGAACTGGATCAGGCAGACCCCT AGCAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACATACTACAGGAGCG AGTGGTACAACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGAGCAGGATCAC CATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCA GAGTGAGAGCCGCCGTGCCTTTCGACTACTGGGGCCAGGGCAC CCTGGTGACAGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGC GGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCG TGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCTGGGCGA GAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTTT TCCAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAAC CCGGCCAGCCCCCCAACCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGA

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		GAAAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTAGCGGCAGCGTGAGCGGCA CCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGT GGCCATCTACTACTGCCAGCAGTACCACAGCACCCCCTGGACAT TCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGgagcccaaatctagcgacaaaa ctcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaa cccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaa gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgg gaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaat ggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaa gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagatgaccaaga accaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa tgggcagccggagaacaactacctcaccctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctaca gcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc tctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB672-LH-Fc	652	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCTGTGAGCCT GGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTG CTGTTTTCCAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCA GAAACCCGGCCAGCCCCCCAACCTGCTGATCTACTGGGCCAGC ACCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTAGCGGCAGCGTGA GCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGA GGACGTGGCCATCTACTACTGCCAGCAGTACCACAGCACCCCCT GGACATTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGGATC TGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACC GGCGGAAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCTGGCCTGG TGAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACATGCGCCATCAGCGG CGACAGCGTGAGCAGCAATAGGGCCGCCTGGAACTGGATCAGG CAGACCCCTAGCAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGACATACT ACAGGAGCGAGTGGTACAACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGAG CAGGATCACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGC CTGCAGCTGAACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCAGAGTGAGAGCCGCCGTGCCTTTCGACTACTGGGGC CAGGGCACCCTGGTGACAGTGAGCAGCgagcccaaatctagcgacaaaactca cacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaaccc aaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcggga ggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatgg caaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagc caaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaac caggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg ggcagccggagaacaactacctcaccctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagc aagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctc tgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB687	653	CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGACTGGTGAAGCCCA GCGAGACCCTGAGCCTGATGTGCACCGTGAGCGGCGGCAGCAT

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
-HL-Fc		CACCAGCAGCAGCTACTACTGGGGATGGATCAGACAGCCCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACTACAGCGGCA CCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAG CGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGC GTGACAGCTGCCGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCGCCGGAGC CAGAGACTTCGACAGCTGGGGACAGGGCAGCCTGGTGACCGTG TCCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCG AAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCGTGATGACCCAGAG CCCTGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGAGAGAGAGCCACCATC AACTGCAAGTCCTCCCAGAGCGTGCTGTACAGCTCCAGCAACA AGAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAGGCCCGGACAGCCTCC CAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAGAGCGGCGTG CCTGACAGGTTTAGCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTTACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTAC TGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCAGGATGTACACCTTCGGCCA GGGCACCAAGCTGGAGATCAAGgagcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtc caccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggaca ccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggt caagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagt acaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagt acaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg cagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcag cctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcc ggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctca ccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaa ccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB687-LH-Fc	654	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGAGCCT GGGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGAGCGTG CTGTACAGCTCCAGCAACAAGAGCTACCTGGCCTGGTACCAGC AGAGGCCCGGACAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAG CACCAGAGAGAGCGGCGTGCCTGACAGGTTTAGCGGCTCCGGC TCCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGA GGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCA GGATGTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGG CGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAG TCCACCGGCGGAAGCCAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTG GACTGGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAGCCTGATGTGCACCGT GAGCGGCGGCAGCATCACCAGCAGCAGCTACTACTGGGGATGG ATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACA TCTACTACAGCGGCACCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGAGC AGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCC TGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCTGCCGACACCGCCGTGTACTA CTGTGCCGCCGGAGCCAGAGACTTCGACAGCTGGGGACAGGGC AGCCTGGTGACCGTGTCCAGCgagcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccac

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		cgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccc tcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaa gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaca acagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaca agtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcct gctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgga gaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgt ggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac tacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB688-HL-Fc	655	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCT CGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGTCATCTCCGGGGACAGTGTC TCTAGCAACAGAGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATC GAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAG TGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCAT CAATTCAGACACATCCAAGAACCAGATCTCCCTGCAGTTGAACT CTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGTG AGACCGGGGATCCCATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCGG TCACCGTCTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCC GGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCGTGATGA CCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC ACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATTCAGCTCCAA CAAAAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAG CCCCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGG GGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCA CTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTAT TACTGTCAGCAATATAATAGTACTCCGTGGACGTTCGGCCAAGG GACCAAGGTGGAGATCAAAgagcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccg tgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaag ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaa cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaa gtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc cccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctg ctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggag aacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtg gacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccact acacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB688-LH-Fc	656	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCT GGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTT TTATTCAGCTCCAACAAAAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCA GAAACCAGGACAGCCCCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTA CCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAG

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		ATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAATAGTACTCCGTGG ACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGCGGATCTG AGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGG CGGAAGCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCAGGTCCAGGACTGGTG AAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGTCATCTCCGGGGA CAGTGTCTCTAGCAACAGAGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGT CCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAG GTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAA TAACCATCAATTCAGACACATCCAAGAACCAGATCTCCCTGCAG TTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC AAGAGTGAGACCGGGGATCCCATTTGACTACTGGGGCCAGGGA ACCCCGGTCACCGTCTCCTCAgagcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccac cgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccc tcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaa gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaca acagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaca agtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcct gctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgga gaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgt ggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac tacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB689-HL-Fc	657	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCT CGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGTCATCTCCGGGGACAGTGTC TCTAGCAACAGAGCTGCCTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATC GAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAG TGGTATAATGATTATGCAGTTTCTGTGAAAAGTCGAATAACCAT CAATTCAGACACATCCAAGAACCAGATCTCCCTGCAGTTGAACT CTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGTG AGACCGGGGATCCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCACGG TCACCGTCTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCC GGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGA CCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC ACCATCAACTGCGAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATTCAGCTCCAA CAAAAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAG CCCCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGG GGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCA CTCTCACCATCAACCGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTAT TACTGTCAGCAATATAATAGTACTCCGTGGACGTTCGGCCAAGG GACCAAGGTGGAGATCAAAgagcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccg tgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaag ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaa cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaa

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		gtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc cccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctg ctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggag aacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtg gacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccact acacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHG B689 -LH-Fc	658	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCT GGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCGAGTCCAGCCAGAGTGTT TTATTCAGCTCCAACAAAAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCA GAAACCAGGACAGCCCCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTA CCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACCGCCTGCAGGCTGAAGA TGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAATAGTACTCCGTGGA CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGCGGATCTGA GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGC GGAAGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGA AGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGTCATCTCCGGGGAC AGTGTCTCTAGCAACAGAGCTGCCTGGAACTGGATCAGGCAGTC CCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGG TCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTTTCTGTGAAAAGTCGAAT AACCATCAATTCAGACACATCCAAGAACCAGATCTCCCTGCAGT TGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCA AGAGTGAGACCGGGGATCCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAA CCACGGTCACCGTCTCCTCAgagcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccg tgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaag ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaa cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaa gtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc cccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctg ctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggag aacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtg gacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccact acacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHG B694 -HL-Fc	659	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT AGCAGCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGG GGCTGGACTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTAGTGGCTTTAGCACA TACTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGCACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATAATTTAGT GGCTGGTACCGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA CCGTCTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGG CAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACC

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		CAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCT GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCG GCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAG TTATTCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATATCAAAg agcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgt cagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtg gtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcat aatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgt cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccc catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgccccatc ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacat cgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctggact ccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtctt ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa a
MHGB694-LH-Fc	660	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATT AGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACT GCCAACAGTATAATAGTTATTCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGATATCAAAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCT CCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTGCAGCT GTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGC CATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGACTGG GTCTCAGGTATTAGTGGTAGTGGCTTTAGCACATACTATGTAGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGC ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATAATTTAGTGGCTGGTACCG TCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA gagcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaacc gtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgt ggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc ataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacc gtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcc cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgccccc atcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcga catcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctgg actccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgt

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		cttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB732-HL-Fc	661	CAAGTACAACTGCAACAAAGTGGTCCTGGGCTCGTGAAGCCTTCCCAGACTCTCAGCCTCACATGCGCTATAAGTGGGGATTCTGTTTCCTCAAATTCAGCAGCCTGGAATTGGATACGACAGTCTCCATCCCGTGGCCTTGAGTGGCTTGGTAGAACTTATTACCGATCCAAGTGGTACAATGATTACGCCGTTTCAGTGAAGTCCCGCATTACTATTAATCCCGACACATCTAAGAATCAAATTTCATTGCAACTGAATAGCGTAACACCCGAAGATACAGCAGTTTATTATTGTGCAGGTGATCGACGCTACGGCATAGTGGGACTTCCTTTCGCCTATTGGGGCCAAGGGACACTGGTCACTGTGTCATCCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCGTAATGACACAGTCACCAGATTCATTGGCAGTTAGTCTGGGTGAAAGGGCAACAATCAACTGCAAGTCTTCTCAGAGTGTACTGCATAGTTCTAACAATAAGAACTACCTTACCTGGTTTCAACAGAAACCAGGTCAGCCCCCCAAGTTGCTGATTTACTGGGCAAGCACCCGCGAATCCGGCGTTCCCGATCGATTTTCAGGTTCCGGGAGTGGGACCGACTTTACCTTGACCATCTCTTCCTTGCAGGCCGAAGATGTAGCCGTCTATTACTGCCATCAGTATTACTCTACTCCCCCCACATTCGGTCAAGGTACAAAAGTTGAGATAAAAgagcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggcagccggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB732-LH-Fc	662	GACATCGTAATGACACAGTCACCAGATTCATTGGCAGTTAGTCTGGGTGAAAGGGCAACAATCAACTGCAAGTCTTCTCAGAGTGTACTGCATAGTTCTAACAATAAGAACTACCTTACCTGGTTTCAACAGAAACCAGGTCAGCCCCCCAAGTTGCTGATTTACTGGGCAAGCACCCGCGAATCCGGCGTTCCCGATCGATTTTCAGGTTCCGGGAGTGGGACCGACTTTACCTTGACCATCTCTTCCTTGCAGGCCGAAGATGTAGCCGTCTATTACTGCCATCAGTATTACTCTACTCCCCCCACATTCGGTCAAGGTACAAAAGTTGAGATAAAAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCCAAGTACAACTGCAACAAAGTGGTCCTGGGCTCGTGAAGCCTTCCCAGACTCTCAGCCTCACATGCGCTATAAGTGGGGATTCTGTTTCCTCAAATTCAGCAGCCTGGAATTGGATACGACAGTCTCCATCCCGTGGCCTTGAGTGGCTTGGTAGAACTTATTACCGATCCAAGTGGTACAATGATTACGCCGTTTCAGTGAAGTCCCGCATT

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		ACTATTAATCCCGACACATCTAAGAATCAAATTTCATTGCAACT GAATAGCGTAACACCCGAAGATACAGCAGTTTATTATTGTGCAG GTGATCGACGCTACGGCATAGTGGGACTTCCTTTCGCCTATTGG GGCCAAGGGACACTGGTCACTGTGTCATCCgagcccaaatctagcgacaaaa ctcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaa cccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaa gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgg gaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaat ggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaa gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgccccatcccgggaggagatgaccaaga accaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa tgggcagccggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctaca gcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc tctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB737-HL-Fc	663	GAGGTGCAACTCCTTGAATCAGGCGGAGGACTCGTCCAACCTG GAGGGAGTCTTAGGCTTAGCTGTGCAGCCAGTGGCTTTACTTTT AGCAGCTATGCAATGCACTGGGTCAGGCAGGCTCCTGGTAAGG GGCTCGAATGGGTCAGCGGCATATCCGGGTCAGGTTTCTCTACA TATTATGTCGATTCTGTAAAAGGACGATTCACCATATCCAGAGA CAATTCTAAAAATACCTTGTATCTCCAGATGAACAGCCTGAGAG CAGAAGATACCGCAGTTTATTACTGTGCAAAGGATAATCTGGTT GCCGGGACAGTTTTTGATTATTGGGGGCAAGGCACCCTCGTCAC AGTATCCAGTGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGC AGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGATATTCAGATGACTC AATCACCTTCAACCCTTAGCGCCTCCGTTGGAGATCGCGTTACC ATTACCTGCCGAGCCTCCCAAAGTATCAGCTCATGGTTGGCATG GTATCAACAGAAGCCTGGAAAGGCACCCAAACTTCTGATTTACA AAGCCAGCTCCTTGGAGTCAGGAGTCCCAAGCCGGTTCAGCGG ATCTGGGTCAGGGACAGAATTTACCCTGACCATATCTTCCCTTC AGCCCGACGACTTCGCCACTTACTATTGTCAGCAATACAACTCC TATTCCCTGACTTTCGGCGGTGGCACAAAGGTTGACATCAAGgag cccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtca gtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggt ggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataa tgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagccccat cgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgccccatccc gggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcg ccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactcc gacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctc atgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB737-LH-	664	GATATTCAGATGACTCAATCACCTTCAACCCTTAGCGCCTCCGT TGGAGATCGCGTTACCATTACCTGCCGAGCCTCCCAAAGTATCA GCTCATGGTTGGCATGGTATCAACAGAAGCCTGGAAAGGCACC

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
Fc		CAAACTTCTGATTTACAAAGCCAGCTCCTTGGAGTCAGGAGTCC CAAGCCGGTTCAGCGGATCTGGGTCAGGGACAGAATTTACCCTG ACCATATCTTCCCTTCAGCCCGACGACTTCGCCACTTACTATTGT CAGCAATACAACTCCTATTCCCTGACTTTCGGCGGTGGCACAAA GGTTGACATCAAGGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCC GGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTGCAACTCC TTGAATCAGGCGGAGGACTCGTCCAACCTGGAGGGAGTCTTAG GCTTAGCTGTGCAGCCAGTGGCTTTACTTTTAGCAGCTATGCAA TGCACTGGGTCAGGCAGGCTCCTGGTAAGGGGCTCGAATGGGT CAGCGGCATATCCGGGTCAGGTTTCTCTACATATTATGTCGATT CTGTAAAAGGACGATTCACCATATCCAGAGACAATTCTAAAAAT ACCTTGTATCTCCAGATGAACAGCCTGAGAGCAGAAGATACCG CAGTTTATTACTGTGCAAAGGATAATCTGGTTGCCGGGACAGTT TTTGATTATTGGGGGCAAGGCACCCTCGTCACAGTATCCAGTgag cccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtca gtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggt ggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataa tgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaagccctcccagccccat cgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgcccccatccc gggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcg ccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacctcacctggcctcccgtgctggactcc gacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagtccagatggcagcaggggaacgtcttctc atgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB738-HL-Fc	665	CAGGTGCAGCTTCAACAGAGCGGACCTGGTCTGGTTAAGCCTTC CCAAACCCTGAGCCTGACTTGTGCTATTTCCGGGGATAGTGTTA GCTCCAATAGGGCAGCATGGAACTGGATCAGACAGTCCCCAAG CCGTGGACTTGAGTGGCTTGGACGTACTTATTACAGGAGTAAAT GGTACAATGATTATGCCGTTTCTGTGAAGAGCCGTATTACTATA AACCCAGATACTTCTAAAAATCAAATTTCCCTTCAGCTCAACTC AGTTACACCAGAGGATACTGCAGTCTATTATTGCGCAAGAGTTC GACCTGGCATTCCCTTCGATTATTGGGGGCAGGGGACACCCGTT ACTGTGTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCG GCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGATATTGTTATGAC ACAGTCCCCAGATTCATTGGCAGTAAGCCTCGGTGAACGGGCTA CTATTAACTGTAAGTCTTCCCAGAGTGTATTGTTCTCTTCAAATA ACAAAAACTACCTGGCATGGTATCAGCAAAAGCCTGGTCAACC CCCTAAACTTCTCATATACTGGGCATCCACTCGGGAGAGCGGTG TGCCAGACCGTTTCTCAGGGAGTGTGTCAGGTACAGATTTTACA CTCACAATTTCCAGCCTCCAAGCCGAAGACGTTGCAGTATATTA TTGCCAACAATATCACTCTACACCTTGGACATTTGGTCAAGGTA CTAAAGTCGAAATCAAAgagcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccgtgcc cagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaa

scFv или scFv-Fc	кДНК, SEQ ID NO:	кДНК
		ctggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagc acgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgca aggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccga gaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgc ctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa ctacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaa gtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg cagaagtctctctccctgtctccgggaaaa
MHGB738-LH-Fc	666	GATATTGTTATGACACAGTCCCCAGATTCATTGGCAGTAAGCCT CGGTGAACGGGCTACTATTAACTGTAAGTCTTCCCAGAGTGTAT TGTTCTCTTCAAATAACAAAAACTACCTGGCATGGTATCAGCAA AAGCCTGGTCAACCCCCTAAACTTCTCATATACTGGGCATCCAC TCGGGAGAGCGGTGTGCCAGACCGTTTCTCAGGGAGTGTGTCAG GTACAGATTTTACACTCACAATTTCCAGCCTCCAAGCCGAAGAC GTTGCAGTATATTATTGCCAACAATATCACTCTACACCTTGGAC ATTTGGTCAAGGTACTAAAGTCGAAATCAAAGGCGGATCTGAG GGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCG GAAGCCAGGTGCAGCTTCAACAGAGCGGACCTGGTCTGGTTAA GCCTTCCCAAACCCTGAGCCTGACTTGTGCTATTTCCGGGGATA GTGTTAGCTCCAATAGGGCAGCATGGAACTGGATCAGACAGTC CCCAAGCCGTGGACTTGAGTGGCTTGGACGTACTTATTACAGGA GTAAATGGTACAATGATTATGCCGTTTCTGTGAAGAGCCGTATT ACTATAAACCCAGATACTTCTAAAAATCAAATTTCCCTTCAGCT CAACTCAGTTACACCAGAGGATACTGCAGTCTATTATTGCGCAA GAGTTCGACCTGGCATTCCCTTCGATTATTGGGGGCAGGGGACA CCCGTTACTGTGTCCTCAgagcccaaatctagcgacaaaactcacacttgtccaccgtgc ccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttca actggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacag cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc aaggtgtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg agaaccacaggtgtacgtgctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtg cctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaca actacctcacctggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggaca agtccagatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacac gcagaagtctctctccctgtctccgggaaaa

Пример 9. Определение биофизических характеристик антител к HLA-G

Термостабильность антител к HLA-G

Исходные и оптимизированные по зародышевой линии v-области подвергали скринингу на термостабильность в формате scFv. Вкратце, v-области клонировали в

формате scFv и экспрессировали в E. coli. Супернатанты культур оценивали с помощью ИФА на их способность связывать рекомбинантный HLA-G. Образцы супернатантов также подвергали тепловому шоку при 55, 60 или 65 °C, и связывание образцов, подвергшихся тепловому шоку, сравнивали со связыванием ненагретых образцов. Этот анализ обеспечил оценку термостабильности v-областей при форматировании в виде scFv. На основе этого анализа MHGB737 и MHGB738, версии MHGB694 и MHGB688, соответственно, оптимизированные для зародышевой линии, были предпочтительными.

На **Фиг. 12** и в **таблице 58** показана способность v-областей связывать рекомбинантный HLA-G после термообработки при форматировании в виде scFv. V-области экспрессировали в виде scFv в супернатанте E. coli и анализировали на их способность связывать рекомбинантный HLA-G с помощью ИФА. Образцы испытывали при комнатной температуре или после термообработки в течение 10 мин при 55, 60 или 65 °C. B23 представлял собой изотипический контроль.

Таблица 58. Анализ связывания антигена после термообработки v-областями, отформатированными в виде scFv.

Исходное антитело scFv	**Сигнал связывания при комнатной температуре**	**% сохраненного связывания**		
		55 °C	**60 °C**	**65 °C**
MHGB665	15215600	103	122	11
MHGB668	Нет связывания			
MHGB669	Нет связывания			
MHGB672	Нет связывания			
MHGB687	Нет связывания			
MHGB688	Нет связывания			
MHGB689	3073733	2	3	4
MHGB694	3073733	85	9	4
MHGB737 (GL-оптимизированный B694)	2747333	84	80	48
MHGB738 (GL-оптимизированный	5758400	14	2	1

B688)				

Специфичность связывания и аффинность

V-области в формате мАт IgG1 тестировали на их способность специфически связываться с клетками, экспрессирующими HLA-G, но не другие молекулы MHC класса I (**таблица 59**). Вкратце, $1,5\times10^7$ клеток промывали 2 раза 1 × PBS, ресуспендировали в 7 мл 1 × PBS и инкубировали в течение 10 мин. После инкубации добавляли 8 мл эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), клетки промывали центрифугированием при 300 × g в течение 5 минут и ресуспендировали при 1×10^6 клеток/мл в DMEM с добавлением 10% FBS. Затем клетки промывали центрифугированием при 300 × g в течение 5 минут и ресуспендировали в буфере для окрашивания, дополненном козлиным A647 Fc с антителом человека (Jackson, кат. № 109-606-098) и инкубировали в течение 30 мин при 4 °C. После инкубации добавляли 150 мкл буфера для окрашивания и клетки промывали центрифугированием при 300 × g в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в 200 мкл рабочего буфера (буфер для окрашивания с добавлением 1 мм EDTA, 0,1% (об./об.) плюроновой кислоты) и промывали центрифугированием при 300 × g в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в 30 мл рабочего буфера и анализировали на связывание антител с помощью проточной цитометрии.

Таблица 59. Клеточная селективность антител к HLA-G. Сигнал флуоресценции Geomean говорит о максимальном значении связывания.

Антитело	**HLA-G**	**HLA-A**	**HLA-B**	**HLA-C**
MHGB665 GeoMean	631628	9956	10436	11586
MHGB668 GeoMean	590753	4574	6323	4941
MHGB669 GeoMean	616340	8142	8312	10950
MHGB672 GeoMean	522292	158	4263	2447
MHGB687 GeoMean	527964	28765	22936	35939
MHGB688 GeoMean	481619	2860	6290	2226
MHGB689 GeoMean	536504	2541	5787	266

MHGB694 GeoMean	472613	2874	4853	3974

Затем v-области испытывали на их способность связывать рекомбинантный HLA-G в виде мАт с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR). SPR представляет собой способ изучения силы взаимодействия между двумя партнерами по связыванию без использования меток путем измерения изменения массы при формировании и диссоциации комплекса. Вкратце, антитела были иммобилизованы на сенсорном чипе, который был связан с козлиным Fc с антителом человека. Растворимый внеклеточный домен HLA-G1 (MHGW8) пропускали через иммобилизованное антитело и контролировали реакции ассоциации/диссоциации. Кинетическую информацию (константы скорости ассоциации и диссоциации) экстрагировали путем подбора сенсограмм к модели связывания Ленгмюра в соотношении 1 : 1. Аффинность связывания (K_D) регистрировалась как отношение констант скорости ($k_{диссоциации}/k_{ассоциации}$). Аффинности антител (Kd) варьировались от ~ 77 пМ до 2,6 нм и показаны в **таблице 60**.

Таблица 60. Измерения аффинности на основе SPR вариабельных областей, связывающихся с HLA-G (MHGW8).

Антитело	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (M)
MHGB665 / MHGB732	5.18E+05	4.00E-05	7.71E-11
MHGB669	3.15E+05	4.53E-04	1,44E-09
MHGB672	3.25E+06	1.79E-03	5.50E-10
MHGB687	1.89E+05	1.53E-04	8.09E-10
MHGB688	6.58E+05	2.63E-04	4.00E-10
MHGB694	2.08E+06	2.40E-03	1.15E-09
MHGB737	1.996E+5	3.103E-4	2.555E-9
MHGB738	2.03E+10	2.83E+00	1.39E-10

Пример 10. Блокирование лиганда

HLA-G сверхэкспрессируется на определенных типах опухолей и, таким образом, может служить маркером опухолевых клеток. Кроме того, HLA-G связывается с лигандами ILT2 и ILT4, которые экспрессируются на иммунных эффекторных клетках, таких как Nk-клетки[4,5]. Взаимодействие между HLA-G и ILT2/ILT4 приводит к

ингибированию активности NK-клеток. Таким образом, предположили, что антитела, которые связываются с HLA-G на конкурентной основе с ILT2/4, будут предотвращать ингибирующее взаимодействие между опухолевыми клетками и NK-клетками и приводить к усилению NK-опосредованного уничтожения опухолевых клеток. Для проверки этой гипотезы сначала проверили, могут ли антитела блокировать взаимодействие между HLA-G и ILT2/4, применяя анализ конкурентного связывания. Связывание между комплексом HLA-G-декстрамер и клетками HEK293T, экзогенно экспрессирующими рецепторы ILT2 или ILT4, приводит к флуоресцентному сигналу. Добавление мАт, которое конкурирует за взаимодействие между HLA-G-декстрамером и клетками ILT-2/4, приводит к уменьшению сигнала флуоресценции. Инверсия ингибирования сигнала флуоресценции была связана с ингибированием мАт, блокирующим лиганд (**таблица 60**). Вкратце, рекомбинантный биотинилированный HLA-G1 (MHGW8) связывали со стрептавидином APC-декстрамером (Immudex, кат. № DX01-APC) до конечного соотношения приблизительно 4 белка HLA-G1 на молекулу декстрамера. Комплекс декстрамер-HLA-G смешивали с клетками HEK293T, экзогенно экспрессирующими ILT-2, или клетками, экзогенно экспрессирующими ILT-4, и инкубировали в течение 30 мин при 4 °C. Антитела к HLA-G добавляли в каждой концентрации и инкубировали комплексом декстрамер-HLA-G в течение 30 мин при C. Добавляли клетки (25 000 клеток) и инкубировали в течение 30 мин при 4 °C. После инкубации смесь клеток и комплекс декстрамер-HLA-G промывали центрифугированием и ресуспендировали в 30 мкл подвижного буфера (Thermo BD кат. № 554657). Ресуспендированную смесь анализировали на флуоресцентный сигнал с помощью проточной цитометрии с применением Intellicyt® iQue Screener Plus. Гейтинг проводили сначала на синглетных клетках, затем на живых клетках с применением красителя Blue Dead Cell Sytox™(ThermoFisher), затем на GFP для клеток, экспрессирующих ILT-2/4, затем на APC для связанного комплекса декстрамер-HLA-G. Все антитела, кроме MHGB737, могли ингибировать взаимодействие HLA-G с ILT4, и все антитела, кроме MHGB737 и MHGB687, могли ингибировать взаимодействие с ILT2 (**таблица 61**). Это свидетельствует о том, что антитела, обнаруженные в ходе этой кампании, могут как нацеливаться на опухоли, так и ослаблять иммунное ингибирование опухолевыми клетками.

Таблица 61. Лигандблокирующие свойства антител

Антитело	**ILT2 EC50 (нМ)**	**ILT4 EC50 (нМ)**
MHGB665	1616,9	1742,7
MHGB669	1700,7	1588,5
MHGB672	2119,2	1612,8
MHGB687	Н/П	1864,0
MHGB688	1722,8	1420,8
MHGB694	644,5	200,1
MHGB732	1,8	2,0
MHGB737	Н/П	Н/П
MHGB738	1,6	1,6

Пример 11. Сопоставление эпитопов

Затем авторы изобретения задались вопросом, связано ли это ингибирование связывания лиганда с прямой конкуренцией с ILT2/4 за один и тот же сайт связывания на HLA-G. Чтобы проверить эту гипотезу, использовали ЖХ-МС на основе водородно-дейтериевого обмена (описано в примере 9) для идентификации эпитопов на HLA-G для ILT-2, ILT-4, MHGB732 или MHGB738 (**Фиг. 13**). Связывание как MHGB732, так и Ат MHGB738 сильно защищает один и тот же пептид в домене α3 (аминокислотные остатки 191–198 зрелого белка, последовательность HHPVFDYE (**SEQ ID NO: 667**)), что приводит к среднему изменению уровней дейтерирования > 30%. Этот пептид также был защищен при наличии ILT2 и в меньшей степени при наличии ILT4. Как MHGB732, так и MHGB738 антитела также значительно защищали (среднее изменение уровней дейтерирования 10–30%) второй эпитоп, состоящий из остатков 249–251 зрелого белка, последовательности VPS. Эпитопы были сопоставлены с кристаллической структурой HLA-G (PDB ID 1YDP)[6], которая показала, что эпитоп для Ат MHGB732 и MHGB738 и для ILT2/4 находится в проксимальной к мембране области домена α3.

Пример 12. Влияние на цитотоксичность на основе NK-клеток

Затем авторы изобретения задались вопросом, может ли ингибирование взаимодействия с HLA-G с помощью ILT-2/4 опосредовать противоопухолевую активность посредством цитотоксичности на основе NK-клеток. Чтобы решить эту

проблему, клонировали каждую вариабельную область либо на IgG1, либо на молчащую константную область IgG4-PAA, в которой отсутствует эффекторная функция. Затем испытали способность каждого антитела опосредовать цитотоксичность клеток K562-HLA-G, опосредованную NK-клетками, которые либо экспрессируют Fc-рецепторы (NK-92), либо не содержат Fc-рецепторов (NKL). Вкратце, клетки K562, сверхэкспрессирующие клетки HLA-G, метили сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE), который служил красителем для пролиферации клеток. Антитела разводили в 96-луночном планшете в соответствии с разведениями на **Фиг. 14А–19Б**. Клетки K562-HLA-G добавляли в каждую лунку с антителом и инкубировали в течение 1 ч при 4 °C. NKL-клетки добавляли в количестве приблизительно 100 000 клеток на лунку, и смесь инкубировали в присутствии IL2 и NKp46 (для активации NKL-клеток) в течение ночи (NKL-клетки) или 4 ч (клетки NK-92) при 4 °C. Клетки промывали центрифугированием и ресуспендировали в буфере с красителем для выявления живых/мертвых клеток. Смесь ресуспендировали в 130 мкл буфера для окрашивания и анализировали методом проточной цитометрии с применением цитометра FACS Fortessa. Считалось, что антитела, которые могут опосредовать цитотоксичность в отсутствие рецепторов NK, опосредуют это взаимодействие посредством блокирования взаимодействия иммунных контрольных точек между HLA-G и ILT-2/4 (**Фиг. 14А–19Б**). Было обнаружено, что все антитела, которые могут блокировать ILT2 (все антитела, кроме MHGB687), могут усиливать опосредованную клетками NKL цитотоксичность в отношении клеток K562-HLA-G в 24-ч анализе (**Фиг. 14А, 15А, 16А, 17А, 18А, 19А**), тогда как только антитела на основе IgG1 могут усиливать опосредованную Fc-рецептором цитотоксичность. Это свидетельствует о том, что блокирование лиганда может служить важным противоопухолевым механизмом даже в отсутствие эффекторной функции, опосредованной Fc-рецептором.

Пример 13. Эффекторные функции мАт

Была испытана способность антител дополнительно опосредовать гибель опухолевых клеток за счет антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в отношении клеточной линии хориокарциномы JEG-3 (ATCC HTB-36), которая эндогенно экспрессирует HLA-G (**Фиг. 20**). Антитела добавляли к клеткам JEG-3, меченным красителем BATDA (Perkin Elmer, кат. № C136-100), которые могут однонаправленно проникать в клетки. При лизисе клеток краситель высвобождается в

раствор, содержащий европий, который вступает в реакцию с красителем с образованием флуоресцентного хелата, сигнал флуоресценции которого можно измерить. PBMC, культивированные в течение ночи, добавляли в соотношении E:T 50:1 к клеткам JEG-3 в количестве 5000 клеток/лунку, и смесь инкубировали в течение 4 ч при 37 °C. Смесь клеток добавляли в соотношении 1:10 к раствору европия, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и контролировали флуоресценцию при 610 нм для определения сигнала. Сигнал флуоресценции, соответствующий 100% гибели, определяли, используя лунку, содержащую меченные BADTA клетки-мишени, смешанные с детергентом Triton-X 100.

Поскольку антитела к HLA-G могут демонстрировать ADCC in vitro, авторы изобретения задались вопросом, можно ли усилить эту активность. Несколько исследований показали, что антитела, содержащие менее 10 % концевого фукозилированного Fc, проявляют усиленную эффекторную функцию благодаря более высокой аффинности связывания с Fc-рецепторами[7]. Таким образом, были получены MHGB732 и MHGB738 в хозяине CHO с низким содержанием фукозы для получения антитела с <10% терминальной фукозы (MHGB738.CLF) (**таблица 62**, **Фиг. 21А–Г**). В качестве отрицательного контроля была получена версия MHGB738 с Fc-областью, которая не могла связывать Fc-рецепторы, и этот белок назвали MHGB745.

Антитела с нормальной фукозой и антитела с низким содержанием фукозы испытывали на их способность индуцировать ADCC на основе NK-клеток либо в отношении клеток JEG-3 (Фиг. 21А), либо в отношении клеток RERF-LC-Ad-1 (линия клеток аденокарциномы легких человека, JCRB1020) (**Фиг. 21Б**). Антитела с низким содержанием фукозы были получены путем экспрессии конструкций, кодирующих тяжелую цепь и легкую цепь, в клетках CHO, которые естественным образом экспрессируют фермент фукозилтрансферазу на низких уровнях, что приводит к продуцированию антител, содержащих менее 10% коровой фукозы. Отношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням показано на графике. Анализ проводили так же, как анализ ADCC, описанный выше. Как MHGB745, так и изотипический контроль не индуцировали ADCC в анализе. Два антитела IgG1, MHGB732 и MHGB738, могли индуцировать ADCC, в то время как те же антитела, имеющие Fc-области с низким содержанием фукозы, демонстрировали ~ 10-кратное повышение активности ADCC. Это показало, что усиление ADCC может быть достигнуто за счет применения антител с низким содержанием фукозы.

Затем была испытана способность антител опосредовать комплементзависимую цитотоксичность (CDC) (**Фиг. 21В и 21Г**). Вкратце, анализы проводили в 10% FBS, содержащем DMEM (JEG-3) или RPMI (RERF-LC-Ad-1). К клеткам-мишеням добавляли антитела и инкубировали в течение 30 минут при 37 °C. После инкубации 15–20% (исходная концентрация) кроличьего комплемента (Cedarlane, кат. № CL3441-S) и инактивированный нагревом комплемент добавляли в лунки соответственно в объеме 25 мкл/лунку. Смесь инкубировали в течение 4–12 часов при 37 °C. Лизис клеток-мишеней определяли добавлением 100 мкл CellTitre-Glo (Promega, кат. № G9242) с последующей инкубацией в течение 10 минут при комнатной температуре. Люминесценцию контролировали с помощью микропланшетного фотометра Tecan SPARK®. Два антитела IgG1, MHGB732 и MHGB738, не опосредовали CDC. Поскольку антитела IgG1 не могли опосредовать CDC, были клонированы v-области в Fc IgG1, содержащие мутации K248E, T437R (RE), которые, как было показано, специфически усиливают активность CDC[8]. Эти Ат, имеющие идентичные v-области, что и их аналоги IgG1, могут опосредовать активность CDC. Авторы изобретения задались вопросом, повлияет ли вариант Fc RE на усиление активности ADCC в Ат с низким содержанием фукозы и повлияет ли Fc с низким содержанием фукозы на активность CDC вариантов Fc RE. Ат RE, полученные в хозяине с низким содержанием фукозы (имеющие <10% фукозилированного Fc), MHGB752 и MHGB758, имели идентичную активность ADCC, что и антитела IgG1 с низким содержанием фукозы MHGB732 и MHGB738 (**Фиг. 21А и 21Б**). Аналогично, Ат RE, полученные в организме-хозяине с низким содержанием фукозы, имели идентичную активность CDC, что и Ат RE, продуцируемые в организме-хозяине с нормальным содержанием фукозы (**Фиг. 21В и 21Г**).

Таблица 62. Описание вариантов MHGB738, имеющих модифицированные константные области.

Название белка	Описание
MHGB732	IgG1
MHGB738	IgG1
MHGB745	L234A, L235A, D265S
MHGB752	IgG1, K248E, T437R (RE)
MHGB758	IgG1, K248E, T437R (RE)

MHGB732.CLF	IgG1, низкая фукоза
MHGB738.CLF	IgG1, низкая фукоза
MHGB758.CLF	IgG1, k248E, T437R (RE), низкая фукоза
MHGB758.CLF	IgG1, k248E, T437R (RE), низкая фукоза

Пример 14. Получение биспецифических антител HLA-G × CD3

Области VH/VL антител к HLA-G, полученные в примерах 7–13, и области VH/VL антител к CD3 из примера 1 конструировали в биспецифический формат и экспрессировали как IgG1.

Конструирование scFv-Fcs CD3 и Fab CD3 для получения биспецифического HLA-G × CD3.

CD3-специфические scFv, scFv-Fc и Fab-Fc были получены, как описано в примере 3. Кроме того, CD3-специфические scFv, scFv-Fc и Fab-Fc были получены с применением областей VH/VL из CD3B450, описанного в US 20200048349, и CD3B219, полученных из антитела SP34-2 (BD Biosciences 551916). В качестве отрицательного контроля применяли Null-scFv-Fc и B23B62-Fab-Fc.

CD3B450-LH-scFv-Fc (SEQ ID NO: 684):

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPGKAPKVMIYEVS
KRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLG
GSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWI
RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAV
YYCARGYSSSFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

CD3B219-LH-scFv-Fc (SEQ ID NO: 685):

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTN
KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGG
SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA
PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY

CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Null-scFv-Fc (SEQ ID NO: 686):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGCAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKGGGSGG
SGGCPPCGGSGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL
EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGI
YGELDFWGCGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Тяжелая цепь плеча Fab-Fc B23B62 (SEQ ID NO: 687):

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARLYGFTYGFAY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Легкая цепь плеча Fab-Fc B23B62 (SEQ ID NO: 688):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQPPKLLIY
AASNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Тяжелая цепь плеча Fab-Fc CD3B219 (SEQ ID NO: 689):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI
RSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS
YVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK

VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG

Легкая цепь плеча Fab-Fc CD3B219 (SEQ ID NO: 690):

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG
TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTV
LGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Конструирование Fab-Fc HLA-G для получения биспецифического HLA-G/CD3

Специфические области VH и VL HLA-G конструировали в формате VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и VL-CL, соответственно. Полипептид **SEQ ID NO: 326**, содержащий молчащие мутации L234A/L235A/D265S Fc и мутации CH3 T350 V/T366L/K392L/T394W, сконструированные для активации селективной гетеродимеризации для получения HLA-G-специфичной последовательности VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3.

Полипептиды SEQ ID NO: 363 или 364 применяли для получения HLA-G-специфичной VL-CL.

Аминокислотные последовательности HC и LC Fab-Fc HLA-G показаны в **таблицах 63 и 64** соответственно. SEQ ID No кДНК цепей HC и LC Fab-Fc HLA-G перечислены в **таблице 65**.

В таблице 63 показаны аминокислотные последовательности тяжелых цепей (HC) Fab-Fc антитела к HLA-G.

Тяжелая цепь Fab-Fc	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
MHGB732-Fab-Fc HC	668	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQIS LQLNSVTPEDTAVYYCAGDRRYGIVGLPFAYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDG

		VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQV SLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
MHGB738-Fab-Fc HC	669	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQIS LQLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTPVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
MHGB712-Fab-Fc HC	670	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQIS LQLNSVTPEDTAVYYCARVRPGIPFDYWGQGTPVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

В таблице 64 показаны аминокислотные последовательности легких цепей (LC) Fab-Fc антитела к HLA-G.

Легкая цепь Fab-Fc	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
MHGB732-Fab-Fc LC	671	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNYLTWF QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
MHGB738-Fab-Fc LC	672	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSVSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQYHSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
MHGB712-	673	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLAW

Fab-Fc LC		YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSVSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQYHSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

В таблице 65 показаны последовательности кДНК легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) Fab-Fc антитела HLA-G.

Fab-Fc	SEQ ID NO:	последовательность кДНК
MHGB732-Fab-Fc HC	674	CAAGTACAACTGCAACAAAGTGGTCCTGGGCTCGTGAAG CCTTCCCAGACTCTCAGCCTCACATGCGCTATAAGTGGGG ATTCTGTTTCCTCAAATTCAGCAGCCTGGAATTGGATACG ACAGTCTCCATCCCGTGGCCTTGAGTGGCTTGGTAGAACT TATTACCGATCCAAGTGGTACAATGATTACGCCGTTTCAG TGAAGTCCCGCATTACTATTAATCCCGACACATCTAAGAA TCAAATTTCATTGCAACTGAATAGCGTAACACCCGAAGAT ACAGCAGTTTATTATTGTGCAGGTGATCGACGCTACGGCA TAGTGGGACTTCCTTTCGCCTATTGGGGCCAAGGGACACT GGTCACTGTGTCATCCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC TTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGC ACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTC TAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGT
MHGB732-	675	GACATCGTAATGACACAGTCACCAGATTCATTGGCAGTTA

Fab-Fc	SEQ ID NO:	последовательность кДНК
Fab-Fc LC		GTCTGGGTGAAAGGGCAACAATCAACTGCAAGTCTTCTC AGAGTGTACTGCATAGTTCTAACAATAAGAACTACCTTAC CTGGTTTCAACAGAAACCAGGTCAGCCCCCCAAGTTGCTG ATTTACTGGGCAAGCACCCGCGAATCCGGCGTTCCCGATC GATTTTCAGGTTCCGGGAGTGGGACCGACTTTACCTTGAC CATCTCTTCCTTGCAGGCCGAAGATGTAGCCGTCTATTAC TGCCATCAGTATTACTCTACTCCCCCCACATTCGGTCAAG GTACAAAAGTTGAGATAAAACGGACAGTGGCCGCTCCTT CCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTC CGGCACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTAC CCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCC CTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAG GACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGA CCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACG CCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGAC CAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT
MHGB738-Fab-Fc HC	676	CAGGTGCAGCTTCAACAGAGCGGACCTGGTCTGGTTAAG CCTTCCCAAACCCTGAGCCTGACTTGTGCTATTTCCGGGG ATAGTGTTAGCTCCAATAGGGCAGCATGGAACTGGATCA GACAGTCCCCAAGCCGTGGACTTGAGTGGCTTGGACGTA CTTATTACAGGAGTAAATGGTACAATGATTATGCCGTTTC TGTGAAGAGCCGTATTACTATAAACCCAGATACTTCTAAA AATCAAATTTCCCTTCAGCTCAACTCAGTTACACCAGAGG ATACTGCAGTCTATTATTGCGCAAGAGTTCGACCTGGCAT TCCCTTCGATTATTGGGGGCAGGGGACACCCGTTACTGTG TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAG CAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTG CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT

Fab-Fc	SEQ ID NO:	последовательность кДНК
		ACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGT
MHGB738-Fab-Fc LC	677	GATATTGTTATGACACAGTCCCCAGATTCATTGGCAGTAA GCCTCGGTGAACGGGCTACTATTAACTGTAAGTCTTCCCA GAGTGTATTGTTCTCTTCAAATAACAAAAACTACCTGGCA TGGTATCAGCAAAAGCCTGGTCAACCCCCTAAACTTCTCA TATACTGGGCATCCACTCGGGAGAGCGGTGTGCCAGACC GTTTCTCAGGGAGTGTGTCAGGTACAGATTTTACACTCAC AATTTCCAGCCTCCAAGCCGAAGACGTTGCAGTATATTAT TGCCAACAATATCACTCTACACCTTGGACATTTGGTCAAG GTACTAAAGTCGAAATCAAACGGACAGTGGCCGCTCCTT CCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTC CGGCACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTAC CCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCC CTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAG GACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGA CCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACG CCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGAC CAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT
MHGB712-Fab-Fc HC	678	CAGGTGCAGCTTCAACAGAGCGGACCTGGTCTGGTTAAG CCTTCCCAAACCCTGAGCCTGACTTGTGCTATTTCCGGGG ATAGTGTTAGCTCCAATAGGGCAGCATGGAACTGGATCA GACAGTCCCCAAGCCGTGGACTTGAGTGGCTTGGACGTA CTTATTACAGGAGTAAATGGTACAATGATTATGCCGTTTC TGTGAAGAGCCGTATTACTATAAACCCAGATACTTCTAAA AATCAAATTTCCCTTCAGCTCAACTCAGTTACACCAGAGG ATACTGCAGTCTATTATTGCGCAAGAGTTCGACCTGGCAT TCCCTTCGATTATTGGGGGCAGGGGACACCCGTTACTGTG TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAG CAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC

Fab-Fc	SEQ ID NO:	последовательность кДНК
		TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTG CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGT
MHGB712-Fab-Fc LC	679	GATATTGTTATGACACAGTCCCCAGATTCATTGGCAGTAA GCCTCGGTGAACGGGCTACTATTAACTGTAAGTCTTCCCA GAGTGTATTGTTCTCTTCAAATAACAAAAACTACCTGGCA TGGTATCAGCAAAAGCCTGGTCAACCCCCTAAACTTCTCA TATACTGGGCATCCACTCGGGAGAGCGGTGTGCCAGACC GTTTCTCAGGGAGTGTGTCAGGTACAGATTTTACACTCAC AATTTCCAGCCTCCAAGCCGAAGACGTTGCAGTATATTAT TGCCAACAATATCACTCTACACCTTGGACATTTGGTCAAG GTACTAAAGTCGAAATCAAACGGACAGTGGCCGCTCCTT CCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTC CGGCACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTAC CCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCC CTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAG GACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGA CCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACG CCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGAC CAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT

Конструирование scFv-Fc HLA-G для получения биспецифического HLA-G/CD3

Области VH/VL HLA-G, конструированные как scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH с применением линкера SEQ ID NO: 31 (**таблица 2**), как описано в примере 2, дополнительно сконструировали в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3, содержащем молчащую мутацию Fc (L234A/L235A/D265S) и мутации T350 V/T366L/K392L/T394W, конструированные для активации селективной гетеродимеризации, и экспрессировали как IgG1. Полипептид **SEQ ID NO: 321** применяли в качестве шарнирной области-CH2-CH3 константного домена.

Аминокислотные последовательности молекул антитела к HLA-G в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3 (scFv-Fc) показаны в **таблице 66**.

Последовательности кДНК молекул антитела к HLA-G в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3 (scFv -Fc) приведены в **таблице 67**.

Таблица 66. Аминокислотные последовательности биспецифических плеч scFv-Fc антитела к HLA-G.

scFv-Fc	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
MHGB732-LH-scFv-Fc	680	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLHSSNNKNYLTWF QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCHQYYSTPPTFGQGTKVEIKGGSEGKSSGSGSE SKSTGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAA WNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPD TSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAGDRRYGIVGLPFAYWGQ GTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
MHGB737-LH-scFv-Fc	681	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYNSYSLTFGGGTKVDIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEWVSGISGSGFSTYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDNLVAGTVFDYWGQGTLVTVSSEP KSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Таблица 67. Последовательности кДНК биспецифических плеч scFv-Fc антитела к HLA-G.

scFv-Fc	SEQ ID NO:	последовательность кДНК
MHGB732-scFv-LH-Fc	682	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACAGCCTGGCTGTGT CTCTGGGCGAGAGAGCTACCATCAACTGCAAGTCCAGCC AGTCCGTGCTGCACTCCTCCAACAACAAGAACTACCTGAC CTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTG ATCTACTGGGCCTCCACCCGCGAGTCTGGTGTGCCCGATA GATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGAC

scFv-Fc	SEQ ID NO:	последовательность кДНК
		AATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTAC TGCCACCAGTACTACAGCACCCCTCCTACCTTTGGCCAGG GCACCAAGGTGGAAATCAAGGGCGGATCTGAGGGAAAGT CCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAA GCCAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCTGGACTGGTCAA GCCCTCTCAGACCCTGTCTCTGACCTGTGCCATCTCCGGC GACTCCGTGTCCTCTAATTCTGCCGCCTGGAACTGGATCC GGCAGTCTCCTAGTAGAGGCCTGGAATGGCTGGGCAGAA CCTACTACCGGTCCAAGTGGTACAACGACTACGCCGTGTC CGTGAAGTCCCGGATCACCATCAATCCCGACACCTCCAAG AACCAGATCTCCCTGCAGCTCAACAGCGTGACCCCTGAG GATACCGCCGTGTACTACTGTGCCGGCGATCGGAGATATG GCATCGTGGGCCTGCCTTTTGCTTACTGGGGACAGGGCAC ACTGGTCACCGTTTCTTCTGAGCCCAAATCTAGCGACAAA ACTCACACTTGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAG GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCCCAT CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCTCAC CTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGA
MHGB737-LH-scFv-Fc	683	gatattcagatgacccaatcccccagtacccttagtgctagtgtgggagaccgagtgaccattac ctgcagagcatcccaatccataagctcctggctcgcctggtatcagcaaaagccaggcaaggc acctaagctgcttatttacaaagcatcctcattggagtccggcgtaccctcacgtttctctggctca ggctccgggacagagtttacattgaccatctctagccttcagccagatgactttgctacatactatt gtcaacaatataacagctactctctgaccttcgggggtgggaccaaagtggatattaaaggcgg ctccgagggcaagagcagcggcagcggcagcgagagcaagagcaccggcggcagcgaa gtccaacttcttgagagtggtggtggcctcgtccagccaggaggttctctccggctctcatgtgct gcaagtggctttactttcagctcttacgccatgcactgggtgcgacaggctcccgggaagggtct tgagtgggtgtctggtataagtggttcaggcttttcaacctactatgtcgattccgtcaagggccg gtttacaatttcaagggacaattctaagaatacactgtatctccaaatgaatagtctcagagccga agataccgccgtttactactgcgccaaagataatcttgtggctgggactgtcttcgactattgggg tcagggtacattggtaaccgtaagtagtgagcccaaatctagcgacaaaactcacacatgtcca ccgtgcccagcacctgaagcagcaggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaag gacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaa gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag

scFv-Fc	SEQ ID NO:	последовательность кДНК
		ccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacca ggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccca tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacgtgctgccc ccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgctgtgcctggtcaaaggcttctat cccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacctcacct ggcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagtct agatggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactaca cgcagaagagcctctccctgtctccgggt

Биспецифические HLA-G × CD3

Области VH/VL антител к CD3 CD3B376, CD3B450, CD3B219 и CD3W246, сконструированные в виде Fab-Fc, и области VH/VL антител к HLA-G MHGB738, MHGB732 и MHGB737, сконструированные в виде scFv-Fcs в ориентациях как HL, так и LH, как описано выше, экспрессировали с получением биспецифических антител, что дало биспецифические антитела HLA-G/CD3 с плечом связывания HLA-G в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3 и плечом связывания CD3 в формате: тяжелая цепь: VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и легкая цепь: VL-CL (**таблица 68**). Плечо B23B62-Fab-Fc применяли в качестве изотипического контроля для CD3-специфического плеча.

Альтернативно, области VH/VL антител к CD3 CD3W246, CD3B450 и CD3B219, сконструированные в виде scFv-Fcs в ориентациях HL и/или LH (см. **таблицу 68**), и области VH/VL антител к HLA-G MHGB738, MHGB732 и MHGB737, сконструированные в виде Fab, как описано выше, экспрессировали с получением биспецифических антител, что дало биспецифические антитела HLA-G/CD3 с плечом связывания HLA-G в формате тяжелой цепи VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и легкой цепи VL-CL и плечом связывания CD3 в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3. Линкер, применяемый для получения антител к scFv, представляет собой линкер **SEQ ID NO: 31** (**таблица 68**).

Мутации T350 V_L351Y_F405A_Y407 V CH3 были сконструированы в одну тяжелую цепь, а мутации T350 V_T366L_K392L_T394W CH3 были сконструированы в другую тяжелую цепь, как описано выше. Кроме того, оба связывающих плеча HK2 и CD3 были сконструированы таким образом, чтобы содержать молчащие мутации L234A_L235A_D265S Fc-эффектора, как описано выше.

Сконструированные цепи экспрессировали, а полученные биспецифические конструкции очищали с применением стандартных способов. Характеристики

биспецифических конструкций определяли по их связыванию с HLA-G и CD3, их цитотоксичности *in vitro*, ответу иммунной контрольной точки и эффективности *in vivo*, как описано в **примерах 15–17**.

Таблица 68. Биспецифические HLA-G × CD3.

Название биспецифического соединения	**Плечо к CD3**	**Плечо CD3 SEQ ID NO:**	**Плечо HLA-G**	**Плечо HLA-G SEQ ID NO:**
HC3B239	null-scFv-Fc	686	MHGB738-Fab-Fc	HC: 669 LC: 672
HC3B238	CD3W246-HL-scFv-Fc	79	MHGB738-Fab-Fc	HC: 669 LC: 672
HC3B237	CD3W246-LH-scFv-Fc	80	MHGB738-Fab-Fc	HC: 669 LC: 672
HC3B236	CD3B450-LH-scFv-Fc	684	MHGB738-Fab-Fc	HC: 669 LC: 672
HC3B235	CD3B219-LH-scFv-Fc	685	MHGB738-Fab-Fc	HC: 669 LC: 672
HC3B234	null-scFv-Fc	686	MHGB732-Fab-Fc	HC: 668 LC: 671
HC3B233	CD3W246-HL-scFv-Fc	79	MHGB732-Fab-Fc	HC: 668 LC: 671
HC3B232	CD3W246-LH-scFv-Fc	80	MHGB732-Fab-Fc	HC: 668 LC: 671
HC3B231	CD3B450-LH-scFv-Fc	684	MHGB732-Fab-Fc	HC: 668 LC: 671
HC3B230	CD3B219-LH-scFv-Fc	685	MHGB732-Fab-Fc	HC: 668 LC: 671
HC3B128	B23B62-Fab-Fc	HC: 687 LC: 688	MHGB732-LH-scFv	680
HC3B125	CD3B376-Fab-Fc	HC: 349 LC: 350	MHGB732-LH-scFv-Fc	680
HC3B258	CD3B376-Fab-Fc	HC: 349 LC: 350	MHGB732-LH-scFv-Fc	680
HC3B124	CD3B219-Fab-Fc	HC: 689 LC: 690	MHGB732-scFv-Fc	680

HC3B123	CD3W246-Fab-Fc	HC: 85 LC: 90	MHGB732-LH-scFv-Fc	680
HC3B225	B23B62-Fab	HC: 687 LC: 688	MHGB737-scFv-Fc	681
HC3B216	CD3B376-Fab-Fc	HC: 349 LC: 350	MHGB737-scFv-Fc	681
HC3B214	CD3W246-Fab-Fc	HC: 85 LC: 90	MHGB737-scFv-Fc	681

Пример 15. Форматирования BsAb и испытания in vitro

Перенаправление Т-клеток к опухолевым клеткам показало значительные перспективы в клинике, и авторы изобретения задались вопросом, будет ли биспецифическое антитело (BsAb), нацеленное на HLA-G и субъединицу CD3 комплекса Т-клеточного рецептора, проявлять цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих HLA-G. Ведущие v-области были отформатированы как BsAb с серией плеч перенаправления связывания CD3 (**таблица 69**). Вкратце, клетки-мишени (NCI-H2009-b2m) в количестве 50 000 клеток на лунку инкубировали с антителами в концентрациях, начиная с 10 нм, и серийно по пол-логарифма на лунку. Добавляли очищенные первичные Т-клетки в соотношении 3:1 и смесь инкубировали в течение 72 ч при 37 °C. Окрашивающий раствор готовили с добавлением красителя LIVE/DEAD для ближнего ИК-диапазона (окрашивание мертвых клеток, L34976, Invitrogen) при 1 мкл на 10^6 клеток и бриллиантового фиолетового антитела CD25 (Biolegend, кат. № 302630) при 5 мкл на 10^6 клеток в буфере для окрашивания FACS BD. Смеси клеток диссоциировали с помощью аккутазы перед дополнительным анализом с помощью проточной цитометрии. Клетки гейтировали по FSC-A по сравнению с SSC-A и CFSE (BL-1) по сравнению с SSC-A, а нежизнеспособные опухолевые клетки идентифицировали по общей популяции опухолевых клеток-мишеней для CFSE (BL-1) по сравнению с гейтированием живых/мертвых клеток в ближней ИК-области (RL2-H). Данные анализировали с применением расширенных показателей ForeCyt (Sartorius) для расчета цитотоксичности опухоли. Все BsAb продемонстрировали способность усиливать цитотоксичность, опосредованную Т-клетками, когда связывающая HLA-G v-область была соединена с плечом связывания CD3 со значениями EC50, которые

коррелировали с аффинностями связывания как плеча, нацеливающего на HLA-G, так и плеча, нацеливающего на CD3 (**таблица 69**).

Таблица 69. Конструкции BsAb и цитотоксичность

Название BsAb	**Плечо к CD3**	**Плечо HLA-G**	**Цитотоксичность, EC50 (M)**
HC3B239	null-scFv-Fc	MHGB738-Fab-Fc	Н/П
HC3B238	CD3W246-HL-scFv-Fc	MHGB738-Fab-Fc	1.72542E-11
HC3B237	CD3W246-LH-scFv-Fc	MHGB738-Fab-Fc	1.32773E-10
HC3B236	CD3B450-LH-scFv-Fc	MHGB738-Fab-Fc	4.53748E-09
HC3B235	CD3B219-LH-scFv-Fc	MHGB738-Fab-Fc	8.37E-11
HC3B234	null-scFv-Fc	MHGB732-Fab-Fc	Н/П
HC3B233	CD3W246-HL-scFv-Fc	MHGB732-Fab-Fc	Н/П
HC3B232	CD3W246-LH-scFv-Fc	MHGB732-Fab-Fc	6.77438E-12
HC3B231	CD3B450-LH-scFv-Fc	MHGB732-Fab-Fc	1.26465E-10
HC3B230	CD3B219-LH-scFv-Fc	MHGB732-Fab-Fc	9.91577E-12
HC3B128	B23B62-Fab	MHGB732-LH-scFv	Нет данных
HC3B125	CD3B376-Fab-Fc	MHGB732-LH-scFv-Fc	5.65197E-11
HC3B258	CD3B376-Fab-Fc	MHGB732-LH-scFv-Fc	Связывание такое же, как у HC3B125
HC3B124	CD3B219-Fab-Fc	MHGB732-scFv-Fc	3.849E-12
HC3B123	CD3W246-Fab-Fc	MHGB732-LH-scFv-Fc	3.24183E-12
HC3B225	B23B62-Fab	MHGB737-scFv-Fc	Нет данных
HC3B216	CD3B376-Fab-Fc	MHGB737-scFv-Fc	1.8984E-09
HC3B214	CD3W246-Fab-Fc	MHGB737-scFv-Fc	1.37611E-10

BsAb были дополнительно испытаны на их способность опосредовать активацию Т-клеток и цитотоксичность на основе Т-клеток в отношении дополнительных клеточных линий: Hup-T3 и RERF-LC-Ad-1 (**Фиг. 22А–22Г**). На

Фиг. 22А-22Г показана цитотоксичность, опосредованная HC3B125, в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих HLA-G.

Два BsAb, HC3B125 и HC3B258, отличались только наличием (HC3B258) или отсутствием (HC3B125) кодона для экспрессии С-концевого лизина, K447, в тяжелой цепи. Поскольку С-концевой лизин тяжелой цепи антител обычно подвергается протеолитическому процессингу, два антитела демонстрировали идентичные масс-спектры (**таблица 70**). Кроме того, они демонстрировали идентичные биофизические свойства, такие как термостабильность и аффинность связывания как с Т-клетками, так и с клетками K562-HLA-G. Кроме того, HC3B258 проявлял такие же свойства цитотоксичности, как и HC3B125 (**Фиг. 23**).

Таблица 70. Сравнение биофизических свойств HC3B125 и HC3B258.

Молекула	Порядок Масса (Да)	Kd (пМ)	Tonset	Tm1	Tm2	Таггр	Связывание с Т-клетками (EC50, М)	Связывание с клетками K562-HLA-G (EC50, М)
HC3B258	128 772,4	13 ± 1, 2	55,0 °C	63,0 °C	81,1 °C	63,9 °C	6.0E-08	1.1E-08
HC3B125	128 772,5	11 ± 0, 5	55,3 °C	63,6 °C	81,3 °C	65,3 °C	6.0E-08	1.2E-08

Пример 16. Наблюдение за ответом иммунной контрольной точки

Наблюдали, что мАт к HLA-G, механизм цитотоксичности которых характеризуется эффекторной функцией (например, ADCC) и BsAb CD3 × HLA-G, могут индуцировать гибель всех типов клеток, экспрессирующих HLA-G. Опухоли часто ускользают от иммунного контроля за счет активизации определенных модуляторов иммунных контрольных точек, которые могут ингибировать иммунные клетки, такие как PD-L1 или CTLA-4[9]. Таким образом, авторы изобретения задались вопросом, может ли нацеливание на раковые клетки цитотоксичности, опосредованной Т-клетками, с помощью BsAb CD3 × HLA-G преодолеть экспрессию модуляторов иммунных контрольных точек на опухолевых клетках. Измерили, экспрессируют ли опухолевые клетки, экспрессирующие HLA-G, лиганды иммунных контрольных точек (**таблица 71**). Вкратце, клетки культивировали, как в примере 11, а затем окрашивали

коммерчески доступными антителами, нацеленными на рецепторы, указанные в **таблице 71**. Флуоресценцию измеряли с применением проточной цитометрии для определения относительных уровней экспрессии каждого рецептора. Интересно, что по нашим наблюдениям, клетки RERF-LC-Ad1 экспрессировали PD-L1 на уровнях, значительно более высоких, чем другие клетки-мишени, и что BsAb CD3 × HLA-G все еще могли опосредовать основанную на Т-клетках цитотоксичность в отношении клеток RERF-LC-Ad1 (**Фиг. 22А–22Г**). Наблюдали, что Ат по изобретению, которые нацелены на домен α3 HLA-G на опухолевых клетках для цитотоксичности, основанной на Т-клетках, могут преодолевать экспрессию лиганда иммунной контрольной точки на опухолевых клетках.

Таблица 71. Комплексный анализ экспрессии антигена иммунных контрольных точек на опухолевых клетках, экспрессирующих HLA-G

Название лиганда/название клеточной линии	Кратность сигнала по сравнению с отрицательным контролем				
	RERF-LCAd1	**JEG-3**	**HUP-T3**	**BICR6**	**HCC1806**
PD-L1(CD274, B7-H1)	43	7	9		
PD-L2(CD273, B7-DC)	2	1	2		
Нектин-1 (CD111, PVRL1)	2	1	1		
Рецептор полиовируса (CD155)	18	1	23		
HVEM (CD270, TNFRSF14)	3	1	1		
B7H3(CD276)	21	9	1		
Галектин-9	1	2	3		
B7-1 (CD80, CD28L)	1	1	1		
MICA/B	6		2		11
ULBP1	1		1		1
ULBP2/5/6	2		2		10
ULBP3	3		2		6
ULBP4	2		1		1
NKG2D-Fc	1		1		1
NKp46-Fc	1		1		1
NKp44-Fc	1		1		1

NKp30-Fc	1		1		1
CD46	1	5	9	12	
CD55	141	73	21	15	
CD59	78	15	291	120	
Цитотоксичность на основе Т-клеток *in vitro*	Да	Нет	Да	Да	
Фон ADCC *in vitro*	нормально	нормально	нормально	нормально	нормально
CDC *in vitro*	Нет	частично	не исследован	не исследован	не исследован

Пример 17. Эффективность *in vivo*

В то время как корреляция между экспрессией HLA-G у пациентов и неблагоприятным прогнозом была установлена для большинства типов рака, непосредственная роль HLA-G в ускользании опухоли *in vivo* до сих пор не продемонстрирована. Мышиные гомологи HLA-G, а также ILT-2 отсутствуют, поэтому для исследования роли HLA-G необходимы модели ксенотрансплантатов и гуманизированные мыши.

Ат и BsAb испытывали на их способность опосредовать противоопухолевую эффективность *in vivo* в серии исследований на мышах. Исследование, показанное на (**Фиг. 24А–24Б, таблице 72**), состояло из эксперимента по эффективности с моделью опухоли поджелудочной железы PAXF 1657 (Charles River Discovery Research Services Germany GmbH), имплантированной подкожно гуманизированным самкам мышей (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} Tg(CMV-IL3, CSF2, KITLG) из лаборатории Джексона. Мыши, которым были привиты гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) CD34^{+}, полученные из пуповинной крови человека, от трех разных доноров (№ 2595, № 2597 и № 5867), были проверены дистрибьютором животных на достаточную степень привития ГСК (> 25% человеческих клеток CD45^{+}) через 10–11 недель после привития. Опухоли PAXF 1657 имплантировали через 18 суток после поступления, а степень привития повторно проверяли за 2 суток до рандомизации. Эксперимент включал восемь групп по 10 или 11 мышей с одной опухолью PAXF 1657 у каждой. Абсолютные объемы опухоли (ATV) определяли с помощью двухмерного измерения цифровым штангенциркулем (S_Cal EVO Bluetooth, Швейцария) в сутки рандомизации, а затем два раза в неделю. Объемы опухолей рассчитывали по формуле: объем опухоли

= (l × w²) × 0,5, где l = наибольший диаметр, а w = ширина (перпендикулярный диаметр) опухоли (в мм). При объемах опухолей от 46,7 мм³ до 117,7 мм³ мышей распределяли по восьми группам, стремясь к сопоставимым средним и медианным объемам опухолей в группе, одновременно обеспечивая максимально возможное равномерное распределение среди групп мышей, гуманизированных с помощью HSC от трех доноров. Каждое антитело оценивали при двух или трех уровнях дозы и вводили в сутки 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 (внутривенно, 2 раза в неделю). Противоопухолевую эффективность всех групп оценивали с применением контрольной группы, получавшей носитель, в качестве эталона. Ингибирование роста опухоли (TGI) определяли в конце периода лечения путем сравнения изменений объемов опухолей в испытуемых группах по отношению к изменениям в контрольной группе и выражали как дельта-значение TGI (обозначается в тексте как TGI) в процентах. TGI рассчитывали с применением абсолютных объемов опухоли по следующей формуле: Дельта TGI_x [%] = (1 − Среднее (T_x -T_0) / Среднее (C_x - C_0)) × 100, где T_0 и C_0 представляют собой абсолютные объемы опухоли в испытуемой и контрольной группе в начале лечения (т. е. в сутки рандомизации), а T_x и C_x — соответствующие абсолютные объемы опухоли в конце периода лечения. Это были сутки 25 данного исследования. Эксперимент был прекращен на сутки 27. HC3B125 значительно ингибировал рост модели опухоли PAXF 1657 у мышей hNSG-SGM3. Ингибирование роста опухоли по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель, было статистически значимым для всех трех оцениваемых уровней доз (критерий Крускала-Уоллиса в сочетании с апостериорным тестом Данна, таблица 50). Опухоли полностью регрессировали у 6/11 животных в группах, получавших 0,002 мг, у 8/11 животных, получавших 0,006 мг, и у 9/11 животных, получавших 0,02 мг HC3B125. В конце эксперимента было 6/7/6 выживших без опухолей в группах, получавших 0,002 мг/0,006 мг/0,02 мг HC3B125, соответственно.

Рост опухоли не ингибировался HC3B128 ни при одном из испытанных уровней доз. Хотя при более высоких дозах HC3B128 наблюдалось небольшое уменьшение среднего объема опухоли в группе по сравнению с контрольной группой, различия не были статистически значимыми (таблица 71).

Таблица 72. Статистика эффективности модели PDX поджелудочной железы

ИД	Лечение [1]	Уровень	График	Спосо	Дельт	Регрессии[3]	Td	Tq

группы		дозы [мг/сутки]	[сутки]	б	а TGI [%] (сутки)[2]	ЧО	ПО	TFS	[сутки]	[сутки]
Модель опухоли PAXF 1657 – Exp. S317h										
1	Контрольный носитель	0,1 мл/доз у	0,3,7,10,14,17,21,24	в/в	н/п	0	0	0	7,2	12,6
2	HC3B128.004	0,02	0,3,7,10,14,17,21,24	в/в	8,4 (25)	0	0	0	8,9	13,5
3	HC3B128.004	0,2	0,3,7,10,14,17,21,24	в/в	16,2 (25)	0	0	0	9,7	15,3
4	HC3B125	0,002	0,3,7,10,14,17,21,24	в/в	98,5 (25)	2	6	6	н.д.	н.д.
5	HC3B125	0,006	0,3,7,10,14,17,21,24	в/в	104,4 (25)	3	8	7	н.д.	н.д.
6	HC3B125	0,02	0,3,7,10,14,17,21,24	в/в	97,9 (25)	1	9	6	н.д.	н.д.

н/п = неприменимо; н.д. = не достигнуто (т. е. групповое среднее значение RTV всегда < 200%/400%)

Носитель для антител: PBS

[2]Дельта-значения TGI в каждой группе рассчитывали в первые сутки измерения после последнего лечения 2QW (сутки 25) в соответствии с формулой, приведенной в разделе об ингибировании роста опухоли; дополнительные значения TGI, T/C и регрессии опухоли см. в приложении 1.

[3]Частичную (PR) и полную регрессию (CR) определяли в соответствии с разделом о регрессии опухоли. TFS: выживший без опухоли; Td, время удвоения опухоли; tq, время учетверения опухоли.

Лечение HC3B125 также может приводить к ингибированию роста опухоли в модели ксенотрансплантата (CDX), полученного из клеточной линии HuP-T3 (**Фиг. 25, таблица 73**). Исследование состояло из эксперимента по эффективности с моделью опухоли поджелудочной железы HuP-T3 (Sigma-Aldrich), имплантированной подкожно (10e6 клеток/мышь в 50% Cultrex (R&D Systems)) мышам, гуманизированным Т-клетками NSG (Jackson Laboratories). Эксперимент включал шесть групп по 10 мышей с одной опухолью HuP-T3 в каждой. В сутки 7 при объемах опухоли от 75 мм^3 до 150 мм^3 мышей рандомизировали на шесть групп, стремясь получить сопоставимые средний и

медианный объемы опухоли в группе. Мышам внутрибрюшинно прививали Т-клетки (20e6 клеток/мышь, 0,2 мл/животное; донор Т-клеток ALLCELLS 6093) после рандомизации в те же сутки, в которые проходила рандомизация. Антитело HC3B125 оценивали при пяти уровнях доз. Противоопухолевую эффективность всех групп оценивали с применением группы, получавшей NullxCD3, в качестве эталона. Лечение начинали через 1 сутки после привития Т-клеток и осуществляли в сутки 8, 11, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42, 48 (внутрибрюшинно, 2 раза в неделю). Ингибирование роста опухоли определяли в конце периода лечения путем сравнения изменений средних объемов опухоли в испытуемых группах по сравнению с изменениями в контрольной группе, получавшей NullxCD3, и выражали в виде дельта-значения TGI (обозначается в тексте как TGI) в процентах. Сутки 42 после имплантации опухоли считали последними сутками для расчетов TGI. Эксперимент был прекращен на сутки 46. HC3B125 значительно ингибировал рост модели опухоли HuPT3 у мышей hNSG. Ингибирование роста опухоли по сравнению с контрольной группой, получавшей NullxCD3, было статистически значимым для всех пяти оцениваемых уровней доз (**таблица 73**).

Таблица 73. Статистика эффективности модели HuP-T3

Группа	**Конструкция**	**Доза/животное**	**%ΔTGI (сутки 42)**	**Отсутствие CR (сутки 42)**
1	**CD3xNull**	—		
2	**HC3B125**	**0,05 мг/кг**	112% ***p < 0,0001	
3	**HC3B125**	**0,1 мг/кг**	118% ***p < 0,0001	1/9 CR
4	**HC3B125**	**0,3 мг/кг**	130% ***p < 0,0001	1/10 CR
5	**HC3B125**	**1 мг/кг**	129% ***p < 0,0001	
6	**HC3B125**	**5 мг/кг**	118% ***p < 0,0001	3/10 CR

Справочная литература

1 Lee, N. *et al.* The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* **3**, 591-600, doi:10.1016/1074-7613(95)90130-2 (1995).

2 Juch, H. *et al.* A novel sandwich ELISA for alpha1 domain based detection of soluble HLA-G heavy chains. *J Immunol Methods* **307**, 96-106, doi:10.1016/j.jim.2005.09.016 (2005).

3 Morales, P. J., Pace, J. L., Platt, J. S., Langat, D. K. & Hunt, J. S. Synthesis of beta(2)-microglobulin-free, disulphide-linked HLA-G5 homodimers in human placental villous cytotrophoblast cells. *Immunology* **122**, 179-188, doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02623.x (2007).

4 Carosella, E. D., Favier, B., Rouas-Freiss, N., Moreau, P. & Lemaoult, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* **111**, 4862-4870, doi:10.1182/blood-2007-12-127662 (2008).

5 Carosella, E. D., Rouas-Freiss, N., Tronik-Le Roux, D., Moreau, P. & LeMaoult, J. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol* **127**, 33-144, doi:10.1016/bs.ai.2015.04.001 (2015).

6 Clements, C. S. *et al.* Crystal structure of HLA-G: a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3360-3365, doi:10.1073/pnas.0409676102 (2005).

7 Shields, R. L. *et al.* Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcgamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* **277**, 26733-26740, doi:10.1074/jbc.M202069200 (2002).

8 Zhang, D. *et al.* Functional optimization of agonistic antibodies to OX40 receptor with novel Fc mutations to promote antibody multimerization. *MAbs* **9**, 1129-1142, doi:10.1080/19420862.2017.1358838 (2017).

9 Wilky, B. A. Immune checkpoint inhibitors: The linchpins of modern immunotherapy. *Immunol Rev* **290**, 6-23, doi:10.1111/imr.12766 (2019).

Пример 18. Создание биспецифического DLL3 × CD3

Области VH/VL антител к дельта-подобному лиганду 3 (DLL3), полученные с применением трансгенных мышей (Ablexis®), и области VH/VL антител к CD3 из примера 1 конструировали в биспецифическом формате и экспрессировали как IgG1.

Кроме того, применяли области VH/VL CD3-специфических антител CD3B376 и CD3B450, описанных в US20200048349.

Разработанные молекулы тяжелой цепи синтезировали в g-блоки (IDT; Коралвилл, штат Айова, США), содержащие 15 перекрывающихся п.о. на 5'- и 3'-концах, для безлигазного клонирования с применением способа InFusion (ClonTech). Все конструкты легкой цепи вставляли в вектор pLonza, содержащий сайты рестрикции BswiI и HindIII для лигирования внутри рамки в константный домен каппа человека. Сигнальные пептиды IgH мышей кодировали, чтобы обеспечить эффективную секрецию моноклональных антител в супернатант клеточной культуры. Все g-блоки разводили в стерильной воде и инкубировали при 50 ^{0}C в течение 10 минут согласно протоколу производителя. Вектор pLonza (Lonza; Базель, Швейцария) линеаризовали с использованием EcoRI и HindIII с последующей гель-экстракцией и очисткой. Применяли массовое соотношение 2:1 линеаризованного вектора к вставке с последующим тепловым импульсом при 50 ^{0}C в течение 15 минут. Инфузионные реакции трансформировали в компетентные клетки Stellar (ClonTech) и полученные колонии масштабировали для мини-приготовления. Все конструкты проверяли на предмет последовательностей и масштабировали с использованием наборов Endotoxin free maxi preparation kits (Qiagen; Хильден, Германия).

Конструирование scFv CD3 и DLL3 для получения биспецифических CD3 × CD3

Области VH/VL CD3 конструировали как scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH с применением линкера SEQ ID NO:31 (таблица 2). Молекулы scFvVH-линкер-VL или VL-линкер-VH, связывающие CD3, дополнительно сконструировали в формат scFv-шарнирная область-CH2-CH3, содержащий молчащую мутацию Fc (L234A/L235A/D265S) и мутации димеризации, обеспечивающие гетеродимеризацию тяжелых цепей DLL3 и CD3.

Области DLL3 VH/VL конструировали как scFv в ориентации VL-линкер-VH с применением того же линкера, что и для получения scFv CD3, описанного выше для SEQ ID NO:31 (таблица 2). Молекулы VL-линкер-VH scFv, связывающие DLL3, были дополнительно сконструированы в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3, содержащем молчащую мутацию Fc (L234A/L235A/D265S). Мутации, предназначенные для стимулирования селективной гетеродимеризации домена Fc, также были сконструированы в домене Fc.

Конструирование Fab CD3 и DLL3 для получения биспецифического DLL3/CD3

Специфические области VH и VL CD3 и DLL3 конструировали в форматах VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и VL-CL, соответственно, и экспрессировали в виде IgG1. Молчащая мутация Fc L234A/L235A/D265S была введена в область Fc. Мутации, предназначенные для стимулирования селективной гетеродимеризации домена Fc, также были сконструированы в домене Fc.

Экспрессия биспецифических антител к DLL3 × CD3

Биспецифические антитела экспрессировали в клетках ExpiCHO-S™ путем переходной трансфекции с очищенной плазмидной ДНК в соответствии с рекомендациями производителя. Другими словами, клетки ExpiCHO-S™ поддерживали в суспензии в экспрессионной среде ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific, кат. № A29100) в инкубаторе с функцией обритального встряхивания при 37 °C, 8% CO_2 и 125 об/мин. Клетки пересевали и разводили перед трансфекцией до концентрации $6{,}0 \times 10^6$ клеток на мл, поддерживая жизнеспособность клеток на уровне 99,0% или выше. Временные трансфекции проводили с применением набора для трансфекции ExpiFectamine™ CHO (ThermoFisher Scientific, кат. № A29131). На каждый мл разведенных клеток, подлежащих трансфекции, применяли 0,5 мкг каждого биспецифического антитела, кодирующего ДНК в соотношении HC1:LC1:HC2 = 1:2:2, и 0,5 мкг ДНК pAdVAntage (Promega, № по каталогу E1711) и разводили средой комплексообразования SFM OptiPRO™. На каждый литр клеток 2,56 мл реагента CHO ExpiFectamine™ разводили 8 мл OptiPRO™. Разведенную ДНК и трансфекционный реагент объединяли на одну минуту, позволяя сформироваться комплексу ДНК/липид, а затем добавляли к клеткам. После инкубации в течение ночи к клеткам добавляли питательную среду ExpiCHO™ и энхансеры ExpiFectamine™ CHO в соответствии со стандартным протоколом производителя. Клетки инкубировали при орбитальном встряхивании (125 об/мин) при 37 °C в течение семи суток перед сбором культурального бульона. Супернатант культуры временно трансфицированных клеток ExpiCHO-S™ очищали центрифугированием (30 мин, 3000 об/мин) с последующей фильтрацией (мембрана PES 0,2 мкм, Корнинг; г. Корнинг, штат Нью-Йорк, США).

Очистка биспецифического DLL3 × CD3

Отфильтрованный супернатант клеточной культуры загружали в предварительно уравновешенную (1xDPBS, pH 7,2) колонку с белком A HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare) с применением хроматографической системы Avant 150 AKTA. После загрузки колонку промывали 5 объемами колонки 1xDPBS, pH 7,2. Белок элюировали 8 объемами колонки 0,1 M ацетата натрия (Na), pH 3,5. Фракции белка полностью нейтрализовали добавлением 2,5 M трис-HCl, pH 7,2 до 15% (об./об.) от конечного объема, и фильтровали через шприц (0,2 мкм). Нейтрализованный белковый раствор загружали в предварительно упакованную аффинную матрицу IgG-CH1 CaptureSelect™ объемом 2 × 5 мл (Thermo Fisher Scientific). Колонку промывали 10 объемами колонки 1xDPBS, pH 7,2. Белок элюировали 10 объемами колонки 0,1 M ацетата натрия (Na), pH 3,5. Фракции белка полностью нейтрализовали добавлением 2,5 M трис-HCl, pH 7,2 до 15% (об./об.) от конечного объема. Основные пиковые фракции объединяли, подвергали диализу в 1xDPBS, pH 7,2, в общей сложности 3 диализа, и фильтровали (0,2 мкм).

В **Таблицах 74–77** представлены данные о последовательности выбранных биспецифических антител DLL3/CD3.

Таблица 74. SEQ ID NO аминокислот HC и LC биспецифических антител к DLL3/CD3

Название биспецифического соединения	Плечо к DLL3			Плечо к CD3		
	Название	HC1 или scFv-Fc SEQ ID NO:	LC1 SEQ ID NO:	Название	HC2 или scFv-Fc SEQ ID NO:	LC2 SEQ ID NO:
DL3B582	DL3B279-Fab-Fc	692	693	CD3W245-LH-scFv-Fc	78	
DL3B583	DL3B279-Fab-Fc	692	693	CD3W245-HL-scFv-Fc	77	
DL3B585	DL3B279-LH-scFv-Fc	694		CD3B376-Fab-Fc	349	350
DL3B587	DL3B279-LH-scFv-Fc	694		CD3W245-Fab-Fc	85	88
D3C3B80	DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-	695		CD3B376-K477-Fab-Fc	696	350

	scFv-Fc (ZW)					
D3C3BB3	DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFv-Fc (KIH)	697		CD3B376-Fab-Fc	349	350

Таблица 75. Аминокислотные последовательности выбранных биспецифических антител

Белки	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
DL3B279-Fab HC1 (VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3)	692	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTFTNYY IHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKLQGR MTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYFCARQGP FIGDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
DL3B279-Fab LC1 (VL-CL)	693	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAW FQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFAQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DL3B279-LH-scFv	694	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAW FQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFAQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGNTFTNYYIHWVRQAPGQGL EWMGIINPSGGSTSYAQKLQGRMTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYFCARQGPFIGDAFDIWGQG TMVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
DL3B279-VL-	695	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAW

Белки	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFv-Fc (ZW)		FQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGQTFTNYYIHWVRQAPGQGL EWMGIINPSGGSTSYAQKLQGRMTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYFCARQGPFIGDAFDIWGQG TTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
CD3W245-LH-scFv-Fc	78	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHW YQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVK PGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLE WVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDL QMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTV SSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
CD3W245-HL-scFv-Fc	77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNM NWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRF TFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWG PFDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIH WYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKL EIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
CD3W245-Fab-Fc HC2	85	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNM NWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRF TFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWG PFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG

Белки	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
		GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
CD3W245-Fab-Fc LC2	88	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHW YQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
CD3B376-Fab-Fc HC2	349	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNA AWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSV KSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCAR GYSSSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFAL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
CD3B376-Fab-Fc LC2	350	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
CD3B376-Fab-Fc K477 HC2	696	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNA AWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSV KSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCAR GYSSSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP

Белки	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
		EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFAL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
CD3B376-Fab-K477 LC2	350	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFv-Fc (KIH)	697	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAW FQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGQTFTNYYIHWVRQAPGQGL EWMGIINPSGGSTSYAQKLQGRMTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYFCARQGPFIGDAFDIWGQG TTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
CD3B376-Fab-Fc HC2	727	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNA AWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSV KSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCAR GYSSSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK

Таблица 76. CDR SEQ ID NO по Кэботу биспецифических антител к DLL3/CD3

Биспецифическое антитело	Исходное (плечо к DLL3/плечо к CD3)	HCDR1 (SEQ ID No)	HCDR2 (SEQ ID No)	HCDR3 (SEQ ID No)	LCDR1 (SEQ ID No)	LCDR2 (SEQ ID No)	LCDR3 (SEQ ID No)
DL3B582	DL3B279-Fab	NYYIH (699)	IINPSGGSTSYAQKLQG (700)	QGPFIGDAFDI (701)	RASQGISNYLA (702)	AASSLQS (703)	QQYNSYPYT (704)
	CD3W245LH-scFv	RYNMN (6)	SISTSSNYIYYADSVKG (7)	GWGPFDY (8)	RARQSIGTAIH (9)	YASESIS (10)	QQSGSWPYT (11)
DL3B583	Fab DL3B279	NYYIH (699)	IINPSGGSTSYAQKLQG (700)	QGPFIGDAFDI (701)	RASQGISNYLA (702)	AASSLQS (703)	QQYNSYPYT (704)
	CD3W245-HL-scFv-Fc	RYNMN (6)	SISTSSNYIYYADSVKG (7)	GWGPFDY (8)	RARQSIGTAIH (9)	YASESIS (10)	QQSGSWPYT (11)
DL3B585	DL3B279-LH-scFv	NYYIH (699)	IINPSGGSTSYAQKLQG (700)	QGPFIGDAFDI (701)	RASQGISNYLA (702)	AASSLQS (703)	QQYNSYPYT (704)
	CD3B376-Fab	NNNAAWS 340	RTYYRSKWLYDYAYSYKS 341	GYSSSFDY 342	TGTSSNIGTYKFVS 343	EVSKRPS 344	VSYAGSGTLL 345
DL3B587	DL3B279-scFv	NYYIH (699)	IINPSGGSTSYAQKLQG (700)	QGPFIGDAFDI (701)	RASQGISNYLA (702)	AASSLQS (703)	QQYNSYPYT (704)
	CD3W245-Fab	RYNMN (6)	SISTSSNYIYYADSVKG (7)	GWGPFDY (8)	RARQSIGTAIH (9)	YASESIS (10)	QQSGSWPYT (11)
D3C3B80	DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105	NYYIH (699)	IINPSGGSTSYAQKLQG (700)	QGPFIGDAFDI (701)	RASQGISNYLA (702)	AASSLQS (703)	QQYNSYPYT (704)

	T-LH-scFv (ZWB)						
	CD3B376-K477-Fab	NNNAAWS 340	RTYYRSKWLYDYAYSYKS 341	GYSSSFDY 342	TGTSSNIGTYKFVS 343	EVSKRPS 344	VSYAGSGTLL 345
D3C3BB3	DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFv (KIH)	NYYIH (699)	IINPSGGSTSYAQKLQG (700)	QGPFIGDAFDI (701)	RASQGISNYLA (702)	AASSLQS (703)	QQYNSYPYT (704)
	CD3B376-Fab (KIH)	NNNAAWS 340	RTYYRSKWLYDYAYSYKS 341	GYSSSFDY 342	TGTSSNIGTYKFVS 343	EVSKRPS 344	VSYAGSGTLL 345

Таблица 77. HC и LC ДНК SEQ ID NO биспецифических антител к DLL3/CD3

Название биспецифического соединения	Плечо к DLL3			Плечо к CD3		
	Название	HC1 или scFv-Fc SEQ ID NO:	LC1 SEQ ID NO:	Название	HC2 или scFv-Fc SEQ ID NO:	LC2 SEQ ID NO:
DL3B582	DL3B279-Fab-Fc	705	706	CD3W245-LH-scFv-Fc	710	
DL3B583	DL3B279-Fab-Fc	705	706	CD3W245-HL-scFv-Fc	711	
DL3B585	DL3B279-LH-scFv-Fc	707		CD3B376-Fab-Fc	351	352
DL3B587	DL3B279-LH-scFv-Fc	707		CD3W245-Fab-Fc	712	713
D3C3B80	DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFv (ZWB)	708		CD3B376-K477-Fab-Fc	351	352
D3C3BB3	DL3B279-scFv-Fc (KIH)	709		CD3B376-Fab-Fc (KIH)	714	715

>SEQ ID NO:705 (кДНК DL3B279-Fab-Fc HC1 в DL3B582 и DL3B583)

CAGGTTCAGTTGGTCCAGAGTGGTGCCGAAGTAAAGAAGCCCGGAGCATC
CGTAAAGGTGTCCTGTAAAGCCAGTGGCAATACTTTCACTAACTATTACATCCAT
TGGGTCCGACAAGCCCCCGGACAAGGATTGGAGTGGATGGGTATTATCAACCCCT
CCGGTGGGTCTACTTCTTACGCTCAAAAACTCCAGGGCCGAATGACAATGACACG
CGACACCTCAACTTCAACCGTTTACATGGAGCTTAGCAGTCTTCGATCTGAGGAC
ACTGCTGTTTACTTTTGCGCTAGGCAGGGGCCTTTCATAGGAGACGCTTTTGACAT
CTGGGGGCAAGGAACAATGGTCACTGTCAGTTCCGCCTCCACCAAGGGCCCATCG
GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG
AGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGC
AGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA
ACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCT
AGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

>SEQ ID NO:706 (кДНК DL3B279-Fab-Fc LC1 в DL3B582 и DL3B583)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCTTTAAGCGCTAGCGTGGGCGA
TCGTGTGACCATCACTTGTCGTGCCAGCCAAGGTATCAGCAACTATTTAGCTTGGT
TCCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCTCCCAAGTCTTTAATCTATGCCGCTAGCTCTTT
ACAGAGCGGAGTGCCCAGCAAGTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGAACCGACTTCAC
TTTAACCATCAGCTCTCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG
TACAACAGCTACCCCTACACCTTCGCCCAAGGTACCAAGCTGGAGATCAAGCGTA
CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT

GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

>SEQ ID NO:707 (кДНК LH scFv-Fc DL3B279 в DL3B585 и DL3B587)

GATATTCAGATGACACAGTCTCCATCCAGCTTGTCAGCAAGCGTGGGTGAT
AGGGTTACCATCACTTGTCGCGCAAGTCAAGGAATTAGTAACTATTTGGCATGGT
TTCAGCAGAAACCCGGTAAGGCTCCAAAATCACTCATATATGCAGCATCCTCCCT
CCAGTCTGGTGTTCCAAGTAAGTTTTCCGGGAGCGGTTCCGGCACCGATTTCACTC
TCACAATCTCTAGCCTTCAACCCGAGGACTTCGCTACCTATTATTGCCAACAGTAT
AATAGCTACCCATACACTTTTGCTCAAGGGACCAAACTCGAGATCAAAGGCGGCT
CCGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGCGGCAGC
CAGGTTCAGTTGGTCCAGAGTGGTGCCGAAGTAAAGAAGCCCGGAGCATCCGTA
AAGGTGTCCTGTAAAGCCAGTGGCAATACTTTCACTAACTATTACATCCATTGGG
TCCGACAAGCCCCCGGACAAGGATTGGAGTGGATGGGTATTATCAACCCCTCCGG
TGGGTCTACTTCTTACGCTCAAAAACTCCAGGGCCGAATGACAATGACACGCGAC
ACCTCAACTTCAACCGTTTACATGGAGCTTAGCAGTCTTCGATCTGAGGACACTG
CTGTTTACTTTTGCGCTAGGCAGGGGCCTTTCATAGGAGACGCTTTTGACATCTGG
GGGCAAGGAACAATGGTCACTGTCAGTTCCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACT
CACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA
CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC
GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTG
CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGT

>SEQ ID NO:708 (кДНК Fc-варианта scFv LH DL3B279)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCCGCCTCTGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGGCATCTCCAACTACCTGGCCTGGT
TCCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATCTACGCTGCTTCCAGTCT
GCAGTCTGGCGTGCCCTCTAAGTTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCC
TGACAATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTA
CAACAGCTACCCCTACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGCGG
CTCCGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGCGGCA
GCCAGGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGT
GAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGACAGACCTTCACCAACTACTACATCCACTGG
GTCCGACAGGCCCCTGGACAAGGATTGGAGTGGATGGGCATCATCAACCCTTCCG
GCGGCTCTACCTCTTACGCCCAGAAACTGCAGGGCAGAATGACCATGACCAGAG
ACACCTCCACCAGCACCGTGTACATGGAACTGTCCAGCCTGAGATCCGAGGATAC
CGCCGTGTACTTCTGTGCCAGACAGGGACCTTTTATCGGCGACGCCTTCGACATCT
GGGGCCAGGGAACAACAGTGACCGTGTCCTCTGAGCCCAAATCTAGCGACAAAA
CTCACACTTGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACG
TGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCTCT
CTCCCTGTCTCCGGGAAAA

>SEQ ID NO:709 (кДНК КІН варианта scFv-Fc DL3B279)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCCGCCTCTGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGGCATCTCCAACTACCTGGCCTGGT
TCCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATCTACGCTGCTTCCAGTCT
GCAGTCTGGCGTGCCCTCTAAGTTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCC
TGACAATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTA
CAACAGCTACCCCTACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGCGG

CTCCGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGCGGCA
GCCAGGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGT
GAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGACAGACCTTCACCAACTACTACATCCACTGG
GTCCGACAGGCCCCTGGACAAGGATTGGAGTGGATGGGCATCATCAACCCTTCCG
GCGGCTCTACCTCTTACGCCCAGAAACTGCAGGGCAGAATGACCATGACCAGAG
ACACCTCCACCAGCACCGTGTACATGGAACTGTCCAGCCTGAGATCCGAGGATAC
CGCCGTGTACTTCTGTGCCAGACAGGGACCTTTTATCGGCGACGCCTTCGACATCT
GGGGCCAGGGAACAACAGTGACCGTGTCCTCTGAGCCCAAATCTAGCGACAAAA
CTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA
CCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGTAAA

>SEQ ID NO:710 (кДНК scFv-Fc LH CD3W245)

GACATACAAATGACACAATCACCCTCTTCTCTTTCTGCAAGCGTTGGCGAC
CGTGTCACTATCACTTGTCGAGCCCGCCAGTCCATAGGTACTGCCATTCACTGGTA
TCAACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAACTCCTGATTAAGTATGCCAGCGAGAG
CATTTCCGGCGTACCTTCAAGATTTTCCGGCTCCGGTAGTGGGACAGATTTCACTC
TCACTATATCTAGCCTCCAACCAGAAGATTTCGCCACTTACTACTGTCAACAATCA
GGTTCATGGCCTTACACTTTCGGCCAGGGGACAAAATTGGAGATCAAGGGCGGCT
CCGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGCGGCAGC
GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAG
TAATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGAC
AACGCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACG

GCTATTTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA
AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG
TGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCC
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCA
AGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
GGT

>SEQ ID NO:711 (кДНК scFv-Fc HL CD3W245)

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAG
TAATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGACA
ACGCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC
TATTTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
GGTCACCGTCTCCTCAGGCGGCTCCGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAG
AGCAAGAGCACCGGCGGCAGCGACATACAAATGACACAATCACCCTCTTCTCTTTC
TGCAAGCGTTGGCGACCGTGTCACTATCACTTGTCGAGCCCGCCAGTCCATAGGTAC
TGCCATTCACTGGTATCAACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAACTCCTGATTAAGT
ATGCCAGCGAGAGCATTTCCGGCGTACCTTCAAGATTTTCCGGCTCCGGTAGTGGG
ACAGATTTCACTCTCACTATATCTAGCCTCCAACCAGAAGATTTCGCCACTTACTAC
TGTCAACAATCAGGTTCATGGCCTTACACTTTCGGCCAGGGGACAAAATTGGAGAT
CAAGGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTG
AAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC

GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC
GACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCA
GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

>SEQ ID NO:712 (кДНК HC2 Fab-Fc CD3W245)

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAG
TAGTAATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGA
GACAACGCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTATTTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG
GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG
CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA
GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACC
GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC
AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
GGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

>SEQ ID NO:713 (кДНК LC2 Fab-Fc CD3W245)

GACATACAAATGACACAATCACCCTCTTCTCTTTCTGCAAGCGTTGGCGAC
CGTGTCACTATCACTTGTCGAGCCCGCCAGTCCATAGGTACTGCCATTCACTGGTA
TCAACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAACTCCTGATTAAGTATGCCAGCGAGAG
CATTTCCGGCGTACCTTCAAGATTTTCCGGCTCCGGTAGTGGGACAGATTTCACTC
TCACTATATCTAGCCTCCAACCAGAAGATTTCGCCACTTACTACTGTCAACAATCA
GGTTCATGGCCTTACACTTTCGGCCAGGGGACAAAATTGGAGATCAAGCGGACA
GTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGG
CACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTG
CAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACC
GAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCCA
AGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCC
TGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT

>SEQ ID NO:714 (кДНК KIH HC2 Fab-Fc CD3B376)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCTAGACTCGTGCGGCCTTCCCAGACC
CTGTCTCTGACCTGTGCCATCTCCGGCGACTCCGTGTTCAACAACAACGCCGCCTG
GTCCTGGATCCGGCAGTCTCCATCTCGCGGTCTGGAGTGGCTCGGTCGCACCTAC
TACCGCTCTAAATGGCTGTACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGTCCCGGATCACCG
TGAACCCTGACACCTCCCGGAACCAGTTCACCCTGCAGCTGAACTCCGTGACCCC
TGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGCCAGAGGCTACTCCTCCTCCTTCGACTATT
GGGGCCAAGGCACCCTCGTGACCGTGTCCTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGT
CTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA
CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCG
CCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCGAAC
AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC

CAGGTCAGCCTGTCCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
ATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CGGTTCACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA

>SEQ ID NO:715 (кДНК KIH LC Fab-Fc CD3B376)

CAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGCTCTCCCGGCCAGTCC
ATCACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCCAACATCGGCACCTACAAGTTCGTGT
CCTGGTATCAGCAGCACCCCGACAAGGCCCCCAAAGTGCTGCTGTACGAGGTGTC
CAAGCGGCCCTCTGGCGTGTCCTCCAGATTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACC
GCCTCCCTGACCATCAGCGGACTGCAGGCTGAGGACCAGGCCGACTACCACTGTG
TGTCCTACGCTGGCTCTGGCACCCTGCTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGT
GCTGGGTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAG
GAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGG
GAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG
AGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATC
TGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCA
CGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

Пример 19. Характеризация биспецифических антител к DLL3 × CD3

Влияние эпитопа DLL3 на цитотоксичность, опосредованную биспецифическим DLL3 × CD3

Чтобы определить влияние эпитопа DLL3 на опосредованную биспецифическим DLL3 × CD3 гибель клеток-мишеней DLL^3+, выполняли перенаправление Т-клеток с применением человеческих пан-Т-клеток в качестве эффекторов и клеток SHP-77 в качестве мишеней в соотношении 3:1 в течение 72 часов. Равный объем (100 мкл) 2X испытуемого образца в ½ логарифмических разведениях от 20 нм (окончательное, начиная с 10 нм) добавляли к 50 000 меченным CSFE клеткам SHP-77, смешанным со 150 000 пан-Т-клетками, в конечном объеме 200 мкл RPMI, 10% FBS в течение 72 ч при 37 °C. Через 72 часа планшеты промывали 1x PBS, инкубировали в течение 20 минут с красителем L/D в ближней ИК-области и BV421-меченым антителом к CD25 в буфере для окрашивания. Клетки дважды промывали буфером для окрашивания, ресуспендировали в 25 мкл аккутазы в течение 10 минут и затем добавляли 25 мкл

буфера QSol. Планшеты считывали на приборе IQue plus, клетки гейтировали на CSFE-положительных популяциях (опухолевые клетки) и CSFE-отрицательных клетках (Т-клетки), и обе популяции впоследствии гейтировали при окрашивании живых/мертвых клеток. Живые Т-клетки дополнительно подвергали гейтированию при окрашивании CD25. Рассчитанными выходными данными были % уничтожения опухоли, % активации Т-клеток CD25 и жизнеспособность Т-клеток. Окрашенный в рубиново-красный контроль (имитация 100% мертвых) и только Т-клетки/только SHP-77 применяли для выделения ядер, содержащих клетки, из мусора, а затем отдельных клеточных популяций. Данные анализировали в приборе GeneData Screenr с применением аппроксимации кривой с 4 параметрами. В приведенных ниже таблицах показан максимальный процент лизиса клеток SHP-77, наблюдаемый в конце 72 часов для каждого связующего DLL3 в паре с различными плечами CD3. Результаты показывают, что % уничтожения опухоли зависит от связывающего эпитопа на DLL3, чем дальше он находится от мембраны, тем меньше лизис клеток (**таблицы 78–80**). % уничтожения опухоли улучшался по мере того, как эпитопы, связывающие DLL3, становились более проксимальными к мембране. Эта тенденция относительно постоянна, когда связующие DLL3 сочетаются с 3 различными CD3.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили интересную тенденцию, когда максимальное уничтожение в каждом домене увеличивается по мере того, как связывающий домен в DLL3 перемещается к С-концу в первичной последовательности или более проксимально к опухолевой мембране. В частности, максимальная эффективность уничтожения улучшается от EGF2 к EGF6 и достигает наибольшего процента, когда испытуемое антитело связывается с доменом EGF-6 или ближе к С-концу.

Таблица 78. % лизиса SHP-77 в сутки 3 после кокультивирования с пан-Т-клетками человека и биспецифическими антителами к DLL3 × CD3W245 при соотношении ET 3:1 (CD3:клетки-мишени).

Название	Описание образца	Плечо к DLL3	Эпитоп	% макс. гибели
CD3B1706	CD3W245-Fab-RF; DL3B279-scFv	DL3B279-scFv	EGF6	89,7
CD3B1506	CD3W245-Fab-RF; DL3B463-scFv	DL3B463-scFv	EGF3/EGF4	94,5

CD3B1346	CD3W245-Fab-RF; DL3B419-scFv	DL3B419-scFv	EGF2/EGF3	85,2
CD3B1586	CD3W245-Fab-RF; DL3B470-scFv	DL3B470-scFv	DSL	55,5

Таблица 79. % лизиса SHP-77 в сутки 3 после кокультивирования с пан-Т-клетками человека и биспецифическими антителами к DLL3 × CD3B376 при соотношении ET 3:1 (CD3:клетки-мишени).

Название	Описание образца	Плечо к DLL3	Эпитоп	% макс. гибели
CD3B1738	CD3B376-Fab-RF; DL3B279-scFv	DL3B279-scFv	EGF6	74,3
CD3B1538	CD3B376-Fab-RF;DL3B463-scFv	DL3B463-scFv	EGF3/EGF4	25,9
CD3B1378	CD3B376-Fab-RF; DL3B419-scFv	DL3B419-scFv	EGF2/EGF3	49,1
CD3B1618	CD3B376-Fab-RF; DL3B470-scFv	DL3B470-scFv	DSL	3,4

Таблица 80. % лизиса SHP-77 в сутки 3 после кокультивирования с пан-Т-клетками человека и биспецифическими антителами к DLL3 × CD3B219 при соотношении ET 3:1 (CD3:клетки-мишени).

Название	Описание образца	Плечо к DLL3	Эпитоп	% макс. гибели
CD3B1737	CD3B219-Fab-RF; DL3B279-scFv	DL3B279-scFv	EGF6	86,4
CD3B1377	CD3B219-Fab-RF; DL3B419-scFv	DL3B419-scFv	EGF2/EGF3	73,1
CD3B1617	CD3B219-Fab-RF; DL3B470-scFv	DL3B470-scFv	DSL	21,9

Аффинность связывания биспецифических антител к DLL3 × CD3 с DLL3

Аффинность связывания антител к DLL3xCD3 с рекомбинантным человеческим DLL3 определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением прибора Biacore T200. Антитела были захвачены на чипе C1, модифицированном козьим актителом к Fc, и титровались 3-кратными серийными разведениями антигена DLL3, охватывающими концентрации от 90 нм до 1,1 нм. Ассоциацию контролировали в течение 2 минут, а диссоциацию — в течение 5 или

60 минут, используя скорость потока 100 мкл/мин. Необработанные данные связывания проверяли путем вычитания сигналов связывания аналита из холостых проб и анализировали с применением модели связывания Ленгмюра 1:1 с применением программного обеспечения для оценки Biacore Insight для получения кинетики, которую применяли для расчета аффинности связывания. Аффинности связывания антител к DLL3xCD3 с рекомбинантным человеческим DLL3 суммированы в **таблице 81**.

Таблица 81. Аффинности (KD) для взаимодействия биспецифических антител к DLL3xCD3 с человеческим DLL3, полученные способом Biacore (SPR). Антитела были захвачены с применением антитела к Fc человека, и антигены были введены инъекцией в растворе.

Название	Описание	k_D (pM)
DL3B582	CD3W245-LH-scFv; DL3B279-Fab	16
DL3B583	CD3W245-HL-scFv; DL3B279-Fab	16
DL3B585	CD3B376-Fab; DL3B279-LH-scFv	24
DL3B587	CD3W245-Fab; DL3B279-LH-scFv	31

Термотабильность биспецифических антител к DLL3 × CD3

Термостабильность (конформационную стабильность) биспецифических анти-DLL3xCD3 антител определяли способом NanoDSF с применением автоматизированного прибора Prometheus. Измерения проводили путем загрузки образца в 24-капиллярную матрицу из 384-луночного планшета для образцов. Были выполнены дублирующие запуски. Термические сканограммы варьируют от 20 °C до 95 °C со скоростью 1,0 °C/мин. Данные были обработаны для получения интегрированных данных и первого анализа производных для 330 нм, 350 нм, соотношения 330/350 и данных рассеяния, из которых были получены термические переходы, начало развертывания, T_m и $T_{аггр}$.

Результаты показывают, что эти биспецифические антитела к DLL3 × CD3 имеют первый переход (T_{m1}) выше 59 °C. Результаты также показывают, что большинство белков, за исключением DL3B585, имеют низкий потенциал агрегации с $T_{аггр}$ выше 70 °C и на 5 градусов или более, чем у T_{m1} (**таблица 82**).

Таблица 82. Данные о термостабильности биспецифических антител к DLL3 × CD3, полученные с применением прибора NanoDSF.

Название	Описание	$T_{аггр}$	T_{m1}
DL3B582	CD3W245-LH-scFv; DL3B279-Fab	74,7 °C	63,3 °C
DL3B583	CD3W245-HL-scFv; DL3B279-Fab	75,4 °C	63,1 °C
DL3B585	CD3B376-Fab; DL3B279-LH-scFv	62,7 °C	60,8 °C
DL3B587	CD3W245-Fab; DL3B279-LH-scFv	74,6 °C	62,4 °C

Связывание биспецифических антител к DLL3 × CD3 с опухолевыми клетками $DLL3^+$

Были определены профили клеточного связывания биспецифических антител к DLL3 × CD3 с линиями опухолевых клеток человека $DLL3^+$ (HCC1833 и SHP-77). Прилипшие клетки SCLC HCC1833 промывали DPBS и добавляли 0,25% трипсина, чтобы дать клеткам открепиться. Добавляли среду для нейтрализации трипсина и клетки переносили в коническую пробирку объемом 15 мл. Клетки суспензии SCLC SHP77 переносили в коническую пробирку объемом 15 мл и центрифугировали при 1200 об/мин в течение 3 минут. Среду отсасывали и клетки еще раз промывали DPBS. Клетки подсчитывали с применением анализатора жизнеспособности клеток Vi-cell XR и высевали при 100К/лунку в 100 мкл DPBS. Планшет центрифугировали при 1200 об/мин в течение 3 минут и дважды промывали DPBS. Клетки окрашивали красителем Violet Live/Dead (Thermo-Fisher) и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 25 мин. Клетки центрифугировали и дважды промывали буфером для окрашивания FACS (BD Pharmingen).

Испытываемые антитела разводили до конечной исходной концентрации 100 нм в буфере для окрашивания FACS и готовили 3-кратные серийные разведения из исходной концентрации, всего 10 точек разведения. Серийно разведенные испытываемые антитела (100 мкл/лунку) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Клетки дважды промывали буфером для окрашивания FACS, добавляли ослиное вторичное антитело к человеку, конъюгированное с AlexaFluor 647 (Jackson Immunoresearch), и инкубировали с клетками в течение 30 мин при 4 °C. Затем клетки дважды промывали буфером для окрашивания FACS и повторно

суспендировали в 100 мкл буфера FACS. Клетки запускали на BD Celesta с применением программного обеспечения FACS Diva и анализировали с применением программного обеспечения FlowJo. Как показано на **Фиг. 26А и 26Б**, профили связывания между плечами DLL3-Fab (DL3B582 и DL3B583) и плечами DLL3-scFv (DL3B585 и DL3B587) умеренно различаются.

Связывание биспецифических антител к DLL3 × CD3 с пан-Т-клетками

Также оценивали профили клеточного связывания биспецифических антител к DLL3 × CD3 с нормальными человеческими Т-клетками. Человеческие пан-Т-клетки (Biological Specialty Corporation, Колмар, Пенсильвания) размораживали и переносили в коническую емкость объемом 15 мл с DPBS (фосфатно-солевой буфер Дульбекко). Клетки центрифугировали при 1300 об/мин в течение 5 минут. DPBS отсасывали и клетки повторно суспендировали в DPBS. Клетки подсчитывали с применением анализатора жизнеспособности клеток Vi-cell XR и высевали при 100К/лунку в 100 мкл DPBS. Планшет центрифугировали при 1200 об/мин в течение 3 минут и дважды промывали DPBS. Клетки окрашивали красителем Violet Live/Dead (Thermo-Fisher) и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 25 мин. Клетки центрифугировали и дважды промывали буфером для окрашивания FACS (BD Pharmingen). Испытываемые антитела разводили до конечной исходной концентрации 100 нм в буфере для окрашивания FACS и готовили 3-кратные серийные разведения из исходной концентрации, всего 10 точек разведения. Серийно разведенные испытываемые антитела (100 мкл/лунку) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Клетки дважды промывали буфером для окрашивания FACS, добавляли ослиное вторичное антитело к человеку, конъюгированное с AlexaFluor 647 (Jackson Immunoresearch), и инкубировали с клетками с течение 30 мин при 4 °C. Клетки дважды промывали буфером для окрашивания FACS и ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS. Клетки запускали на BD Celesta с применением программного обеспечения FACS Diva и анализировали с применением программного обеспечения FlowJo. Как показано на **Фиг. 27**, профили связывания клеток различны для различных плеч CD3.

Опосредованная биспецифическими DLL3 × CD3 цитотоксичность по сравнению с линиями клеток-мишеней DLL3$^+$ в пан-Т-клетках

Был оценен опосредованный Т-клетками потенциал уничтожения биспецифических антител к DLL3 × CD3 в клеточных линиях DLL3$^+$ и DLL3-. DLL3$^+$ SHP77 и DLL3ˉHEK293, стабильно экспрессирующие красный ядерный краситель, были сгенерированы для применения в анализе цитотоксичности на основе IncuCyte. Замороженные флаконы здоровых донорских Т-клеток (Biological Specialty Corporation, Колмар, Пенсильвания) оттаивали на водяной бане при 37 °C, их переносили в коническую пробирку объемом 15 мл и один раз промывали 5 мл среды RPMI, не содержащей фенолового красного/10% HI FBS. Клетки подсчитывали с применением анализатора жизнеспособности клеток Viacell XR, и Т-клетки объединяли с клетками-мишенями для получения окончательного соотношения эффекторной Т-клетки к клетке-мишени (E: T) 5:1. Смесь клеток (100 мкл/лунку) объединяли в коническую пробирку объемом 50 мл и добавляли в прозрачный 96-луночный планшет с плоским дном. Затем испытываемые антитела разводили до конечной исходной концентрации 60 нм в среде RPMI/10% HI FBS, не содержащей фенолового красного, и готовили 3-кратные серийные разведения из исходной концентрации, всего 11 точек разведения. Серийно разведенные испытываемые антитела (100 мкл/лунку) добавляли к объединенным клеткам. Планшеты помещали либо в IncuCyte® Zoom, либо в IncuCyte S3® (Essen) при 37 °C с 5% CO_2 на 120 часов. Линии клеток-мишеней стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, который применяли для отслеживания кинетики лизиса клеток-мишеней. Ингибирование роста клеток в процентах (%) = (Начальное количество жизнеспособных клеток-мишеней – Текущее количество жизнеспособных клеток-мишеней)/ Начальное количество жизнеспособных клеток* 100%. Как показано на **Фиг. 28А** и 28Б, результаты анализа Т-клеточной цитотоксичности демонстрируют, что все биспецифические антитела к DLL3×CD3 способны достигать >95% лизиса опухоли за 5 суток.

Индукция цитокинов, опосредованная биспецифическими антителами DLL3 × CD3 в пан-Т-клетках

Были оценены профили высвобождения цитокинов биспецифических антител к DLL3 xCD3 в линии опухолевых клеток человека DLL3$^+$. Супернатанты анализировали с применением набора для культур тканей с провоспалительной панелью человека I (Meso Scale Discovery), и они оттаивали на влажном льду, их центрифугировали при

1500 об/мин в течение 5 минут при 4°C, затем помещали на лед. Планшеты для анализа MULT-SPOT были предварительно промыты в соответствии с протоколом производителя. Стандартную кривую строили путем серийного разведения входящих в комплект калибраторов в разбавителе 1 MSD. Стандарты и образцы испытываемых антител (25 мкл/лунку) добавляли в предварительно промытые планшеты. Планшеты для анализа считывали на SECTOR Imager 6000. Как показано на **Фиг. 29**, результаты эксперимента по профилированию цитокинов демонстрируют, что продуцирование IFN-гамма коррелирует с аффинностью к CD3 биспецифических антител к DLL3 xCD3.

Опосредованная биспецифическими DLL3 × CD3 цитотоксичность по сравнению с линиями клеток-мишеней DLL3$^+$ в PBMC

Чтобы испытать эффективность биспецифических средств в отношении клеток-мишеней DLL3$^+$ с различными уровнями экспрессии антигена, в анализе цитотоксичности испытывали клеточную линию DLL3 с высокой экспрессией (SHP-77 и HCC1833) и клеточную линию DLL3 с низкой экспрессией (G361). SHP-77 и HCC1833 представляют собой клеточные линии эпителия легкого и аденокарциномы легкого соответственно. Клетки G361 происходят из злокачественной меланомы кожи. В анализе цитотоксичности применяли клеточную линию DLL3$^+$ SHP-77, стабильно экспрессирующую белок ядерного матрикса NucLight Red (NLR). В сутки анализа клетки SHP-77-NLR собирали в пробирку Falcon объемом 50 мл и центрифугировали при 1300 об/мин в течение 5 мин. Затем клеточный осадок ресуспендировали в модифицированной среде RPMI 1640 + 10% FBS (полная среда) и количество клеток оценивали с помощью маркера живых/мертвых клеток трипанового синего с применением гемоцитометра. Затем клетки SHP-77-NLR высевали на покрытые коллагеном 96-луночные планшеты в концентрации 10 000 клеток/лунку/90 мкл полной среды. Клетки равномерно распределяли путем осторожного встряхивания и оставляли на 1 час в инкубаторе с 5% CO_2. В случае линий клеток-мишеней HCC1833 и G361 3000 клеток/лунку/90 мкл полной среды высевали в 96-луночные планшеты для культур тканей с плоским дном за одни сутки до добавления PBMC.

Флаконы с замороженными PBMC от здоровых доноров (Clinigene) быстро оттаивали на водяной бане при 37 °C, переносили в коническую пробирку на 15 мл и один раз промывали 10 мл полной среды. Клетки окрашивали антителом к CD3 человека и анализировали с помощью проточного цитометра для определения процента CD3 в PBMC. PBMC от каждого донора подсчитывали с применением маркера

живых/мертвых клеток трипанового синего с помощью гемоцитометра, и количество PBMC, необходимое для получения требуемого соотношения эффектора к мишени (ET) (CD3: клетка-мишень), добавляли к высеянным клеткам-мишеням в 90 мкл полной среды. Затем испытываемые антитела готовили в виде 10-кратных исходных объемов в полных средах и готовили 3-кратные серийные разведения. Серийно разведенные испытываемые антитела добавляли к совместной культуре PBMC-опухоли в количестве 20 мкл на лунку, так что конечная концентрация антитела становилась 1X. Лунки без антител (NBS) применяли в качестве контроля базовой цитотоксичности. Планшеты помещали в IncuCyte S3® (Essen BioScience) при 37 °C с 5% CO_2 на 5 суток. Увеличение красного сигнала соответствует пролиферации клеток-мишеней, а уменьшение сигнала соответствует гибели клеток-мишеней. Результаты обобщены в **таблице 83**. % лизиса рассчитывали как = {100 – (интенсивность сигнала красного в определенный момент времени с интенсивностью антитела/сигнала красного в этот момент времени в лунках NBS) * 100}.

Таблица 83. % лизиса клеток SHP-77, HCC1833 и G361 в сутки 5 после кокультивирования с цельными PBMC и биспецифическими антителами к DLL3 × CD3 в указанных концентрациях с применением соотношения ET 1:1 (CD3:клетки-мишени). Н/П означает, что не испытывалось.

молекулы		**Цитотоксичность (% лизиса в сутки 6, соотношение ET 1:1)**		
		SHP-77	**G361**	**HCC1833**
Название	Описание	30nM	30nM	30nM
DL3B582	CD3W245-LH-scFv DL3B279-Fab	87,3	98,9	93,7
DL3B583	CD3W245-HL-scFv DL3B279-Fab	99,8	98,9	88,4
DL3B585	CD3B376-Fab DL3B279-LH-scFv	58,1	Н/П	Н/П
DL3B587	CD3W245-Fab DL3B279-LH-ScFv	83,3	Н/П	Н/П

Мощный лизис опухолевых клеток наблюдали с биспецифическими антителами DLL3 × CD3 во всех клеточных линиях различного происхождения и плотности антигена. Чтобы сравнить эффективность высокоаффинного биспецифического CD3

(DL3B583) с низкоаффинным биспецифическим CD3 (DL3B585), испытывали цитотоксичность в отношении клеток SHP-77 с высокой экспрессией DLL3 при различных соотношениях ET. Цельные PBMC от 3 доноров культивировали с клетками SHP-77-NLR DLL3$^+$ при указанных соотношениях ET (CD3: SHP-77) при наличии биспецифических антител DLL3 × CD3. Лунки с PBMC и клетками-мишенями, но без антител, применяли в качестве контроля базовой цитотоксичности. Планшеты сканировали в течение 120 часов в IncuCyte S3® (Essen BioScience) в инкубаторе при 37 °C и 5% CO_2. % лизиса рассчитывали как = {100 – (интенсивность красного сигнала в определенный момент времени с интенсивностью антитела/красного сигнала в этот момент времени в лунках NBS) * 100}. Каждая точка на графике представляет среднее для 3 доноров. Как показано на Фиг. 30A–30B, биспецифические антитела DLL3 × CD3 с плечами как высокоаффинного CD3 (DL3B583), так и низкоаффинного CD3 (DL3B585) продемонстрировали сильную цитотоксичность в отношении клеток SHP-77. Лизис клеток-мишеней при концентрации антитела 90 нм и 30 нм был сходным для высокоаффинного и низкоаффинного антитела к CD3 при соотношении ET 10:1.

Пролиферация CD3+ Т-клеток в ответ на биспецифические антитела DLL3 × CD3 в анализе цитотоксичности цельных PBMC

Чтобы испытать, может ли связывание биспецифических антител DLL3 × CD3 с CD8$^+$ Т-клетками индуцировать пролиферацию и размножение CD8$^+$ Т-клеток, был проведен временной анализ пролиферации CD8$^+$ Т-клеток. Для анализа применяли клетки SHP-77 DLL3$^+$. В сутки анализа клетки SHP-77 собирали в пробирку Falcon объемом 50 мл и центрифугировали при 1300 об/мин в течение 5 мин. Затем клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл модифицированной среды RPMI 1640 + 10% FBS (полная среда) и количество клеток оценивали с помощью маркера живых/мертвых клеток трипанового синего с применением гемоцитометра. Затем клетки SHP77 высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном из расчета 10 000 клеток/лунку/90 мкл полной среды.

Флаконы с замороженными PBMC от здоровых доноров (Clinigene) быстро оттаивали на водяной бане при 37 °C, переносили в коническую пробирку на 15 мл и один раз промывали 10 мл полной среды. Клетки окрашивали антителом к CD3 человека и анализировали с помощью проточного цитометра для определения процента CD3 в PBMC. PBMC окрашивали красителем Cell Trace Violet (C34571, Thermo Fisher Scientific). PBMC от каждого донора подсчитывали с применением маркера

живых/мертвых клеток трипанового синего с применением гемоцитометра, и количество PBMC, необходимое для получения соотношения эффектора к мишени (ET) 10:1 (CD3: клетка-мишень), добавляли к высеянным клеткам-мишеням в 90 мкл полной среды.

Затем испытываемые антитела готовили в виде исходных 10-кратных растворов в полных средах и готовили 3-кратные серийные разведения из исходной концентрации, всего 3 точки разведения. Серийно разведенные испытываемые антитела добавляли к совместной культуре PBMC-опухоли в количестве 20 мкл на лунку, так что конечная концентрация антитела становилась 1X. Лунки без антител (NBS) служли контролем базовой цитотоксичности. Планшеты инкубировали в инкубаторе с 5% CO_2 в течение указанных периодов времени. По окончании периода инкубации клеточную суспензию переносили на планшет с v-образным дном и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 100 мкл DPBS. Отбирали 10 мкл клеточной суспензии для определения общего количества клеток при каждой концентрации антител с применением трипанового синего на гемоцитометре. Остальную клеточную суспензию обрабатывали набором для окрашивания мертвых клеток в ближнем ИК-поле LIVE/DEAD™ Fixable (L10119) и инкубировали в течение 20 мин на льду. Окрашивание жизнеспособности инактивировали буфером FACS и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Клетки окрашивали блоком Fc BD (564220, BD Pharmingen) в течение 10 мин с последующим окрашиванием антителами CD3 и CD8 и собирали на проточном цитометре. Проводили гейтирование CD8 T-клеток для оценки увеличения популяции цитотоксических CD8 T-клеток в CD3 T-клетках. Как показано на **Фиг. 31**, связывание биспецифических антител DLL3 × CD3 с T-клетками мощно опосредует размножение цитотоксических CD8 T-клеток.

Профиль активации CD8 T-клеток биспецифическими антителами DLL3 × CD3 в анализе цельных PBMC

Для изучения состояния активации популяции цитотоксических CD8 T-клеток в ответ на связывание биспецифических клеток DLL3 × CD3 был проведен кинетический анализ маркеров CD25, CD69 и CD71. Для анализа применяли клетки SHP-77 $DLL3^+$. Клетки SHP-77 собирали в пробирку Falcon объемом 50 мл и центрифугировали при 1300 об/мин в течение 5 мин. Затем клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл модифицированной среды RPMI 1640 + 10% FBS (полная среда) и количество клеток оценивали с помощью маркера живых/мертвых клеток трипанового синего с применением

гемоцитометра. Затем клетки SHP-77 высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном из расчета 10 000 клеток/лунку/90 мкл полной среды.

Флаконы с замороженными PBMC от здоровых доноров (Clinigene) быстро оттаивали на водяной бане при 37 °C, переносили в коническую пробирку на 15 мл и один раз промывали 10 мл полной среды. Клетки окрашивали антителом к CD3 человека и анализировали с помощью проточного цитометра для определения процента CD3 в PBMC. PBMC от каждого донора подсчитывали с применением маркера живых/мертвых клеток трипанового синего с применением гемоцитометра, и количество PBMC, необходимое для получения соотношения эффектора к мишени (ET) 10:1 (CD3: клетка-мишень), добавляли к высеянным клеткам-мишеням в 90 мкл полной среды.

Испытываемые антитела готовили в виде исходных 10-кратных растворов в полных средах и готовили 3-кратные серийные разведения из исходной концентрации, всего 3 точки разведения. Серийно разведенные испытываемые антитела добавляли к совместной культуре PBMC-опухоли в количестве 20 мкл на лунку, так что конечная концентрация антитела становилась 1X. Лунки без антител (NBS) применяли в качестве контроля базовой цитотоксичности. Планшеты инкубировали в инкубаторе с 5% CO_2 в течение указанных периодов времени. По окончании периода инкубации клеточную суспензию переносили на планшет с v-образным дном и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 100 мкл DPBS. Отбирали 10 мкл клеточной суспензии для определения общего количества клеток при каждой концентрации антител с применением трипанового синего на гемоцитометре.

Остальную клеточную суспензию обрабатывали набором для окрашивания мертвых клеток в ближнем ИК-поле LIVE/DEAD™ Fixable (L10119) и инкубировали в течение 20 мин на льду. Краситель для оценки жизнеспособности инактивировали буфером FACS и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Клетки окрашивали блоком Fc BD (564220, BD Pharmingen) в течение 10 мин с последующим окрашиванием антителами CD3, CD8, CD25, CD69 и CD71 и собирали на проточном цитометре. Как показано на **Фиг. 32A–32B**, мощная активация цитотоксических CD8 T-клеток наблюдалась с биспецифическими антителами DLL3 × CD3, на что указывает усиление экспрессии CD25, CD69 и CD71 на поверхности CD8 T-клеток.

Индукция цитокинов, опосредованная биспецифическими антителами DLL3 × CD3, в анализе цельных PBMC

Биспецифические антитела, перенаправляющие Т-клетки, могут вызывать токсичность из-за индукции синдрома высвобождения цитокинов. Эти цитокины могут продуцироваться самими Т-клетками или миелоидными клетками, что приводит к петле обратной связи, в результате которой увеличивается продуцирование цитокинов. Чтобы понять высвобождение цитокинов, таких как IL-6, TNF-a, IL-10, GMCSF и других Т-клеточных цитокинов, путем добавления биспецифических DLL3 × CD3, культуральные супернатанты из анализов цитотоксичности исследовали на уровни этих цитокинов. Для анализа применяли клетки SHP-77 $DLL3^+$. Клетки SHP-77 собирали в пробирку Falcon объемом 50 мл и центрифугировали при 1300 об/мин в течение 5 мин. Затем клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл модифицированной среды RPMI 1640 + 10% FBS (полная среда) и количество клеток оценивали с помощью маркера живых/мертвых клеток трипанового синего с применением гемоцитометра. Затем клетки SHP-77 высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном из расчета 10 000 клеток/лунку/90 мкл полной среды

Флаконы с замороженными PBMC от здоровых доноров (Clinigene) быстро оттаивали на водяной бане при 37 °C, переносили в коническую пробирку на 15 мл и один раз промывали 10 мл полной среды. Клетки окрашивали антителом к CD3 человека и анализировали с помощью проточного цитометра для определения процента CD3 в PBMC. PBMC от каждого донора подсчитывали с применением маркера живых/мертвых клеток трипанового синего с применением гемоцитометра, и количество PBMC, необходимое для получения соотношения эффектора к мишени (ET) 10:1 (CD3: клетка-мишень), добавляли к высеянным клеткам-мишеням в 90 мкл полной среды.

Испытываемые антитела готовили в виде 10-кратных растворов в полной среде и добавляли к совместной культуре PBMC-опухоли в количестве 20 мкл/лунку, так что конечная концентрация антитела становилась 1X. Лунки без антител (NBS) применяли в качестве контроля базовой цитотоксичности. Планшеты инкубировали в инкубаторе с 5% CO_2 в течение указанных периодов времени. По окончании периода инкубации клеточную суспензию переносили на планшет с v-образным дном и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Супернатант собирали и хранили при -20 °C для проведения анализа Luminex с применением панели магнитных гранул человеческих CD8+ Т-клеток MILLIPLEX MAP (HCD8MAG-15K, Millipore). Планшет анализировали

с применением MAGPIX с программным обеспечением eXPONENT. Результаты обобщены в **таблице 84**.

Таблица 84. Высвобождение цитокинов, опосредованное биспецифическими антителами DLL3 × CD3, в анализе цитотоксичности цельных PBMC

Цельные PBMC от 3 доноров культивировали с клетками SHP-77 $DLL3^+$ в соотношении ET 10:1 (CD3: SHP-77) при наличии антител CD3XDLL3 в концентрации 30 нм для DL3B582 и DL3B583 и 90 нм для DL3B585. Супернатант собирали в указанные моменты времени и анализировали на высвобождение цитокинов с помощью Luminex. Каждая точка на графике представляет собой среднее для 3 доноров.

Цитокины (нг/мл)	**Биспецифические антитела DLL3 × CD3**		
	DL3B582	**DL3B583**	**DL3B585**
ФНОα	2,7	2,0	1,1
GMSF	0,8	1,0	0,5
IL-10	13,5	20,7	1,9
IL-13	0,5	0,4	0,5
Gzm B	9,7	9,6	1,0
IL-2	1,0	0,8	0,0
IL-4	0,2	0,2	0,0
IL-5	0,1	0,1	0,1
IL-6	4,2	4,8	0,9

Низкие уровни высвобождения цитокинов наблюдались с биспецифическим антителом DLL3 × CD3 с более низкой аффинностью к CD3 (DL3B585) по сравнению с антителами с плечами более высокой аффинности к CD3 (DL3B582 и DL3B583), в частности, IL-10, IL-6, IL- 2 и IL-4, тогда как цитотоксическая активность этих биспецифических DLL3 × CD3 была сравнима.

Пример 20. Определение характеристик биспецифического антитела к DLL3 × CD3 с оптимизированной последовательностью антитела к DLL3

Аффинность связывания биспецифического антитела к DLL3 × CD3 к DLL3

Чтобы гарантировать, что мутация N в Q в области HCDR1 (или вблизи области HCDR1, в зависимости от применяемого разграничения) варианта DL3B279, как описано в примере 1, не приведет к изменению связывания с DLL3, аффинность связывания варианта DL3B279 рекомбинантной человеческой DLL3 определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением прибора Biacore T200 и сравнивали с исходным DL3B279. Антитело захватывали на чипе C1C, модифицированном козьим антителом к Fc, и титровали 3-кратными серийными разведениями антигена DLL3 человека и яванского макака в диапазоне концентраций от 90 нм до 1,1 нм. Ассоциацию контролировали в течение 3 минут, а диссоциацию — в течение 60 минут при скорости потока 50 мкл/мин. Необработанные данные связывания проверяли путем вычитания сигналов связывания аналита из холостых проб и анализировали с применением модели связывания Ленгмюра 1:1 с применением программного обеспечения для оценки Biacore Insight для получения кинетики, которую применяли для расчета аффинности связывания. Результаты (таблица 85) показали, что аффинность связывания биспецифического DLL3 × CD3 (C3C3B80), содержащего вариант DL3B279 (DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFV), сравнима с таковой исходного биспецифического DLL3xCD3 (DL3B585), содержащего начальную молекулу DL3B279-LH-scFV (DL3B585: 24 пМ).

Таблица 85. Аффинности (KD) для взаимодействия биспецифического антитела к DLL3 × CD3 с человеческим DLL3, полученные способом Biacore (SPR). Антитела к DLL3 захватывали с помощью антитела к Fc человека и вводили антигены путем инъекции в растворе

Название	Описание	k_D (pM)
DL3B585	HC1: CD3B376-Fab; HC2: DL3B279-LH-scFv	24
D3C3B80	HC1 : CD3B376-Fab × HC2 : DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFV	33

Конформационная стабильность биспецифического варианта антитела к DLL3 × антитела CD3 с помощью DSF

Термостабильность (конформационная стабильность) биспецифического антитела к DLL3 CD3, содержащего новую последовательность DL3B279 варианта DL3B279 (D3C3B80), определяли способом NanoDSF с применением автоматизированного прибора Prometheus. Измерения проводили путем загрузки образца в 24-капиллярную матрицу из 384-луночного планшета для образцов. Были выполнены дублирующие запуски. Термическое сканирование охватывает диапазон от 20 °C до 95 °C со скоростью 1,0 °C/минуту. Данные были обработаны для получения интегрированных данных и первого анализа производных для 330 нм, 350 нм, соотношения 330/350 и данных рассеяния, из которых были получены термические переходы, начало развертывания, T_m1 и $T_{аггр}$. Результаты (таблица 86) показали, что термостабильность биспецифического антитела DLL3 × CD3 с вариантом DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFV (D3C3B80) сравнима с таковой в начальной биспецифической молекуле с начальной последовательностью DL3B279-LH-scFv (DL3B585: $T_{аггр}$ = 62,7, T_m1 = 60,8, показано в таблице 86).

Таблица 86. Данные о термостабильности антител к DLL3, полученные с применением прибора nanoDSF.

Название	Описание	$T_{аггр}$	T_{m1}
DL3B585	HC1: CD3B376-Fab; HC2: DL3B279-LH-scFv	62,7 °C	60,8 °C
D3C3B80	HC1: CD3B376-Fab × HC2: DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFV	62,4 °C	60,9 °C

Связывание биспецифического варианта антитела к DLL3 варианту × антитела CD3 с Т-клетками

Пан-Т-клетки человека (Biological Specialty Corporation, Колмар, Пенсильвания) оттаивали и переносили в коническую пробирку объемом 15 мл с DPBS. Клетки центрифугировали при 1300 об/мин в течение 5 минут. DPBS отсасывали и клетки повторно суспендировали в DPBS. Клетки подсчитывали с применением анализатора жизнеспособности клеток Vi-cell XR и высевали при 100К/лунку в 100 мкл DPBS. Планшет центрифугировали при 1200 об/мин в течение 3 минут и дважды промывали DPBS. Клетки окрашивали красителем Violet Live/Dead (Thermo-Fisher) и инкубировали

при комнатной температуре в темноте в течение 25 мин. Клетки центрифугировали и дважды промывали буфером для окрашивания FACS (BD Pharmingen). Испытываемые антитела разводили до конечной исходной концентрации 100 нм в буфере для окрашивания FACS и готовили 3-кратные серийные разведения из исходной концентрации, всего 10 точек разведения. Серийно разведенные испытываемые антитела (100 мкл/лунку) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Клетки дважды промывали буфером для окрашивания FACS, добавляли ослиное вторичное антитело к человеку, конъюгированное с AlexaFluor 647 (Jackson Immunoresearch) и инкубировали с клетками с течение 30 мин при 4 °C. Клетки дважды промывали буфером для окрашивания FACS и ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS. Клетки запускали на BD Celesta с применением программного обеспечения FACS Diva и анализировали с применением программного обеспечения FlowJo. Как показано на **Фиг. 33A**, биспецифическое антитело DLL3 × CD3 с вариантом DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFV (D3C3B80) имеет связывание с Т-клетками, сравнимое со связыванием начальной биспецифической молекулы с начальной последовательностью DL3B279-LH-scFv (DL3B585).

Токсичность, опосредованная биспецифическим вариантом антитела к DLL3 × CD3, по сравнению с линиями клеток-мишеней $DLL3^+$ в пан-Т-клетках с помощью IncuCyte

SHP77 $DLL3^+$, стабильно экспрессирующие красный ядерный краситель, были сгенерированы для применения в анализе цитотоксичности на основе IncuCyte. Замороженные флаконы здоровых донорских Т-клеток (Biological Specialty Corporation, Колмар, Пенсильвания) оттаивали на водяной бане при 37 °C, их переносили в коническую пробирку объемом 15 мл и один раз промывали 5 мл среды RPMI, не содержащей фенолового красного/10% HI FBS. Клетки подсчитывали с применением анализатора жизнеспособности клеток Viacell XR, и Т-клетки объединяли с клетками-мишенями для окончательного соотношения эффекторной Т-клетки к клетке-мишени (E: T) 5:1. Смесь клеток объединяли в конической пробирке объемом 50 мл. Смесь клеток (100 мкл/лунку) добавляли в прозрачный 96-луночный планшет с плоским дном. Затем испытываемые антитела разводили до конечной исходной концентрации 60 нм в среде RPMI/10% HI FBS, не содержащей фенолового красного, и готовили 3-кратные серийные разведения из исходной концентрации, всего 11 точек разведения. Серийно разведенные испытываемые антитела (100 мкл/лунку) добавляли к объединенным

клеткам. Планшеты помещали либо в IncuCyte® Zoom, либо в IncuCyte S3® (Essen) при 37 °C с 5% CO_2 на 120 часов. Линии клеток-мишеней стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, который применяют для отслеживания кинетики лизиса клеток-мишеней. Процент ингибирования роста клеток равен разнице между начальным количеством переменных клеток-мишеней и текущим количеством жизнеспособных клеток-мишеней, деленной на начальное количество жизнеспособных клеток. Как показано на **Фиг. 33Б**, биспецифическое антитело DLL3 × CD3 с вариантом DL3B279-VL-A99G-VH-N27Q_M105T-LH-scFV (D3C3B80) имеет сравнимое ингибирование роста клеток с начальной биспецифической молекулой с начальной последовательностью DL3B279-LH-scFv (DL3B585).

Настоящие примеры показывают, что выделенные мультиспецифические белки, описанные в настоящем документе, особенно эффективны в опосредовании цитотоксичности, запускаемой Т-клетками, стимулировании активации и пролиферации Т-клеток, увеличении высвобождения цитокинов, секретируемых Т-клетками, и/или демонстрации повышенной противоопухолевой эффективности. Эти виды активности являются отражением комбинации антигенсвязывающих доменов, нацеленных на DLL3 на клетке-мишени и CD3 на Т-клетке. Специалисту в данной области будет понятно, что такой активности можно ожидать от сборки связывающих доменов в биспецифическое антитело, независимо от механизма сборки биспецифического антитела.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает кластер дифференцировки 3ε (CD3ε), причем антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 24;

b. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 27;

c. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 28;

d. HCDR1, HCDR2 HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 29; или

e. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 23 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 30.

2. Выделенный белок по п. 1, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3

a. SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11, соответственно;

b. SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 и 17, соответственно; или

c. SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 16 и 22, соответственно.

3. Выделенный белок по п. 1 или 2, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv, (scFv) 2, Fv, Fab, F(ab')2, Fd, dAb или VHH.

4. Выделенный белок по п. 3, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой Fab.

5. Выделенный белок по п. 3, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv.

6. Выделенный белок по п. 5, причем scFv содержит, от N- до C-конца, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

7. Выделенный белок по п. 6, причем L1 содержит:

a. около 5–50 аминокислот;

b. около 5–40 аминокислот;

c. около 10–30 аминокислот; или

d. около 10–20 аминокислот.

8. Выделенный белок по п. 6, причем L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

9. Выделенный белок по п. 8, причем L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 37 или 64.

10. Выделенный белок по любому из пп. 1–9, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

11. Выделенный белок по п. 10, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит:

a. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;

b. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;

c. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;

d. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или

e. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

12. Выделенный белок по любому из пп. 1–11, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 74.

13. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 23 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 103.

14. Выделенный белок по п. 13, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv, (scFv)2, Fv, Fab, F(ab')2, Fd, dAb или VHH.

15. Выделенный белок по п. 14, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой Fab.

16. Выделенный белок по п. 14, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv.

17. Выделенный белок по п. 16, причем scFv содержит, от N- до C-конца, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

18. Выделенный белок по п. 17, причем L1 содержит:

a. около 5–50 аминокислот;
b. около 5–40 аминокислот;
c. около 10–30 аминокислот; или
d. около 10–20 аминокислот.

19. Выделенный белок по п. 18, причем L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

20. Выделенный белок по п. 19, причем L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 37 или 64.

21. Выделенный белок по пп. 13–20, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24, 27, 28, 29 или 30.

22. Выделенный белок по п. 21, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит:

a. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24;
b. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 27;
c. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 28;
d. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 29; или
e. VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 30.

23. Выделенный белок по любому из пп. 1–22, причем выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок.

24. Выделенный белок по п. 23, причем мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок.

25. Выделенный белок по п. 23, причем мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок.

26. Выделенный белок по любому из пп. 1–25, дополнительно содержащий константную область иммуноглобулина (Ig) или фрагмент его константной области Ig.

27. Выделенный белок по п. 26, причем фрагмент константной области Ig содержит Fc-область.

28. Выделенный белок по п. 26, причем фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

29. Выделенный белок по п. 26, причем фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

30. Выделенный белок по п. 26, причем фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

31. Выделенный белок по п. 26, причем фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнирной области, домен CH2 и домен CH3.

32. Выделенный белок по п. 26, причем фрагмент константной области Ig содержит шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

33. Выделенный белок по любому из пп. 26–32, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

34. Выделенный белок по любому из пп. 26–32, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

35. Выделенный белок по любому из пп. 26–32, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3ε, конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig посредством второго линкера (L2).

36. Выделенный белок по п. 35, причем L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

37. Выделенный белок по любому из пп. 23–36, причем мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, отличный от CD3ε.

38. Мультиспецифическое антитело по п. 37, причем клеточный антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген.

39. Выделенный белок по любому из пп. 26–38, причем константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 изотип.

40. Выделенный белок по любому из пп. 26–39, причем константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания белка с Fcγ-рецептором (FcγR).

41. Выделенный белок по п. 40, причем по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания белка с FcγR, выбирают из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

42. Выделенный белок по любому из пп. 40–41, причем FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

43. Выделенный белок по любому из пп. 26–42, причем указанный белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig.

44. Выделенный белок по п. 38, причем по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области выбирают из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, T366L, F405W, T394W, K392L, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, T366L/K392L/T394W, L351Y/Y407A, L351Y/Y407V, T366A/K409F, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

45. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный белок по любому из пп. 1–44 и фармацевтически приемлемый носитель.

46. Полинуклеотид, кодирующий выделенный белок по любому из пп. 1–44.

47. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 46.

48. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 47.

49. Способ получения выделенного белка по любому из пп. 1–44, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 48 в условиях, в которых белок экспрессируется, и выделение белка, продуцируемого клеткой-хозяином.

50. Способ лечения рака у испытуемого, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела по любому из пп. 1–44 испытуемому, нуждающемуся в этом, для лечения рака.

51. Антиидиотипическое антитело, связывающееся с выделенным белком по любому из пп. 1–50.

52. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на CD3ε (SEQ ID NO: 1), причем эпитоп представляет собой прерывающийся эпитоп, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 100, 101 и 102.

53. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 747, 748, 77, 78, 749, 750, 751, 752, 753 и 754.

54. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 747.

55. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 748.

56. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 77.

57. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 78.

58. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 749.

59. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 750.

60. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 751.

61. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 752.

62. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 753.

63. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 754.

64. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 86.

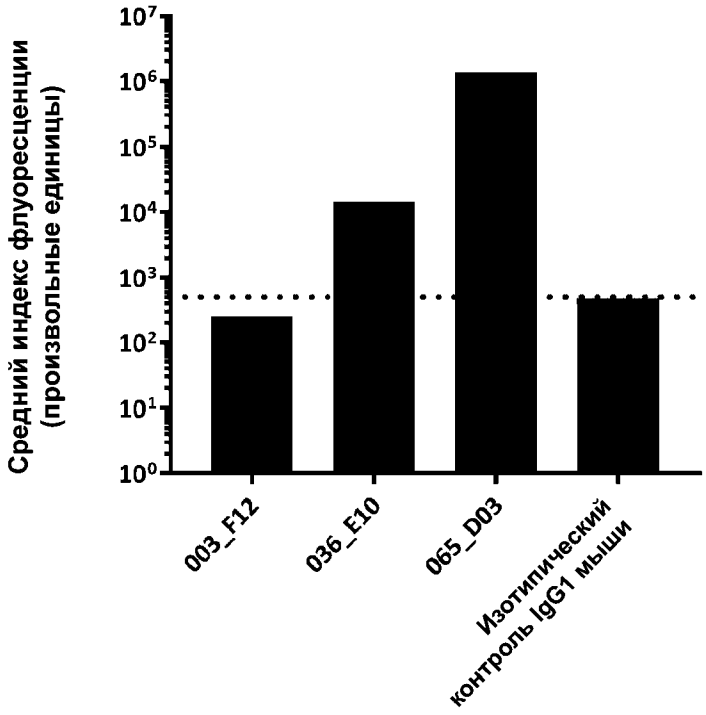
65. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 88.

66. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 90.

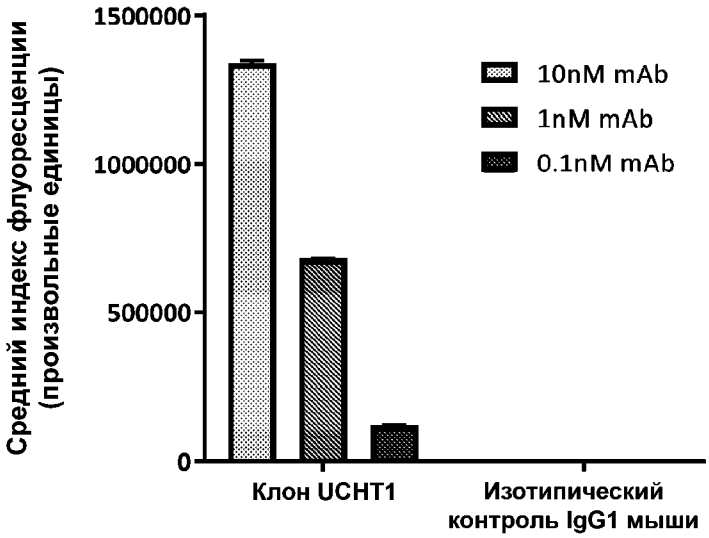
67. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 92.

68. Выделенный белок по п. 1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85 и 94.

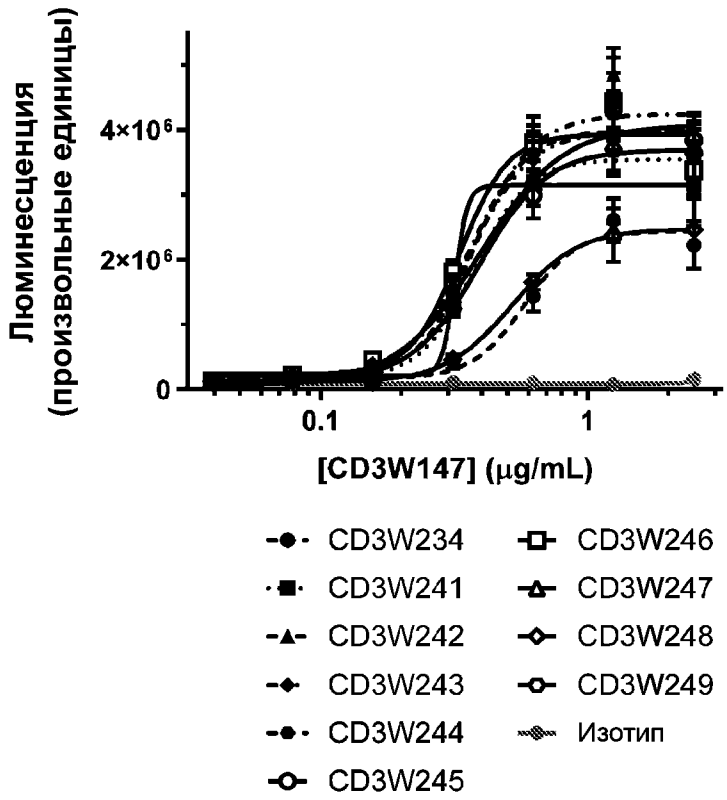
Фиг. 1А


Средний индекс флуоресценции (произвольные единицы)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
003_F12
036_E10
065_D03
Изотипический контроль IgG1 мыши

Фиг. 1Б


Средний индекс флуоресценции (произвольные единицы)
1500000
1000000
500000
0
10nM mAb
1nM mAb
0.1nM mAb
Клон UCHT1
Изотипический контроль IgG1 мыши

Фиг. 2


Люминесценция (произвольные единицы)
4×10⁶
2×10⁶
0
0.1
1
[CD3W147] (μg/mL)
CD3W234
CD3W241
CD3W242
CD3W243
CD3W244
CD3W245
CD3W246
CD3W247
CD3W248
CD3W249
Изотип

Фиг. 3

```
CD3B815  DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF
CD3W244  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRF
CD3W245  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRF
CD3W246  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRF
CD3W247  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRF
CD3W248  DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF
         ***:****::**:*:*:**:::*********************::::*:***:********:****


CD3B815  SGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK
CD3W244  SGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK
CD3W245  SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK
CD3W246  SGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK
CD3W247  SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK
CD3W248  SGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIK
         **************:*:*:**:*:******:*******:*******


VL consensus sequence (SEQ ID NO: 103)

DIQX1TQSPX2X3LSX4SX5GX6RVX7X8X9CRARQSIGTAIHWYQQKX10X11X12X13PX14LLIX15YASESISGX16PSRFS
GSGSGTDFTLTIX17SX18QX19EDX20CAX21YYCQQSX22SWPYTFGX23GTKLEIK; wherein

X1 is L or M;
X2 is G or S;
X3 is I or S;
X4 is V or A;
X5 is P or V;
X6 is E or D;
X7 is S or T;
X8 is F or I;
X9 is S or T
X10 is T or P;
X11 is N or G;
X12 is G or K;
X13 is S or A;
X14 is R or K;
X15 is K or Y;
X16 is I or V;
X17 is N or S;
X18 is V or L;
X19 is S or P;
X20 is I or F;
X21 is D or T;
X22 is N or G; or
X23 is G or Q.
```

Фиг. 4

10
20
30
40
50
60
70
80
90
QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYL SEQ ID No:99 CD3ε
QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYL SEQ ID No:99 CD3ε:OKT3
QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYL SEQ ID No:99 CD3ε:CD3W245

Фиг. 5

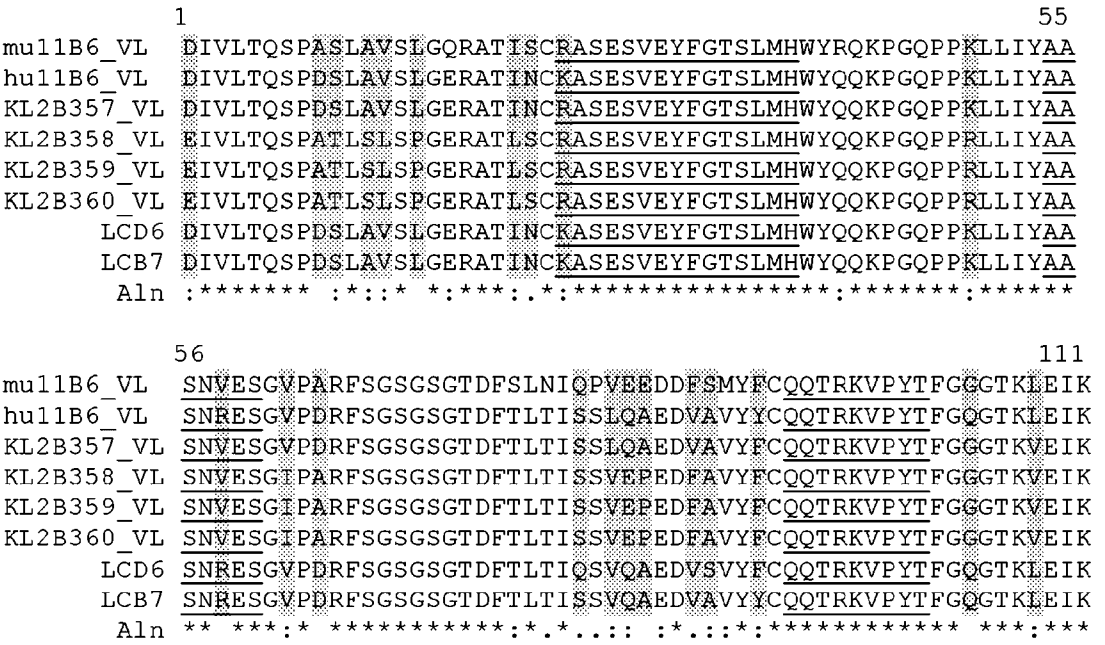
```
           1                                                   45
mu11B6_VH  DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQFPGNR
hu11B6_VH  QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKG
KL2B357_VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKG
KL2B358_VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKG
KL2B359_VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKR
KL2B360_VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKG
      HCF3 QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKG
      HCG5 QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKG
       Aln :***************::*****:*:*************** **:

           46                                                  90
mu11B6_VH  LEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPED
hu11B6_VH  LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVD
KL2B357_VH LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD
KL2B358_VH LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD
KL2B359_VH LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD
KL2B360_VH LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD
      HCF3 LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVD
      HCG5 LEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVD
       Aln ***:***********.******.:::******** *:*.***. *

           91                          117
mu11B6_VH  TATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
hu11B6_VH  TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
KL2B357_VH TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
KL2B358_VH TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
KL2B359_VH TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
KL2B360_VH TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
      HCF3 TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
      HCG5 TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
       Aln **.*:**********************
```

VH consensus sequence (SEQ ID NO: 356)

QVQLQESGPGLVKPSX_1TLSLTCX_2VSGNSITSDYAWNWIRQX_3PGKX_4LEWX_5GYISYSGSTT
YNPSLKSRVTX_6SRDTSKNQFSLKLSSVTX_7X_8DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

X_1 is D or Q;
X_2 is A or T;
X_3 is P or F;
X_4 is G or R;
X_5 is I or M;
X_6 is I or M;
X_7 is A or P; or
X_8 is V or A.

Фиг. 6



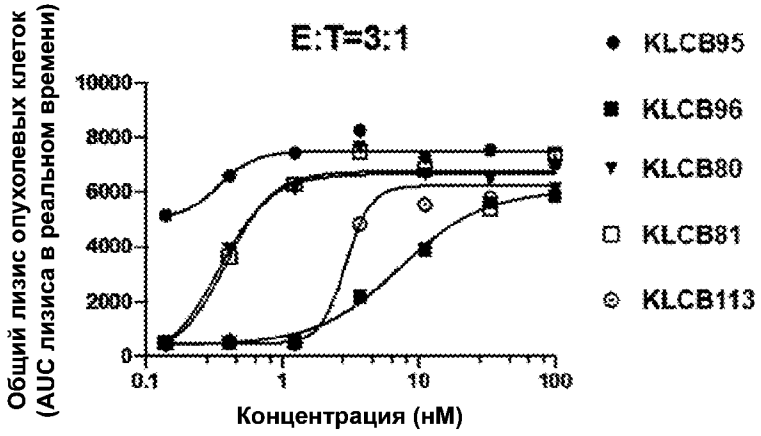
VL consensus sequence (SEQ ID NO: 357)
X_1IVLTQSPX_2X_3LX_4X_5SX_6GERATX_7X_8CX_9ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPX_{10}LLIYAASNX_{11}
ES$G X_{12}$PX_{13}RFSGSGSGTDFTLTIX_{14}S$X_{15}X_{16}$QX_{17}ED$X_{18}X_{19}$VYX_{20}CQQTRKVPYTFGX_{21}GTKX_{22}EIK

X_1 is D or E; X_2 is D or A; X_3 is S or T; X_4 is A or S;
X_5 is V or L; X_6 is L or P; X_7 is I or L; X_8 is N or S;
X_9 is R or K; X_{10} is K or R; X_{11} is V or R; X_{12} is V or I;
X_{13} is A or D; X_{14} is Q or S; X_{15} is L or V; X_{16} is Q or E;
X_{17} is P or A; X_{18} is F or V; X_{19} is A or S; X_{20} is Y or F;
X_{21} is Q or G; and X_{22} is L or V.

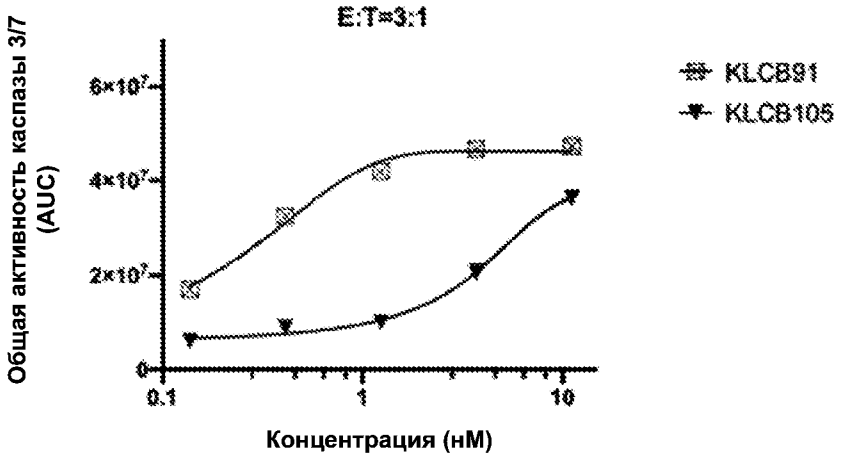
Фиг. 7

```
            1                                                  50
h11B6       VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KL2B494     VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KL2B467     VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KL2B30      VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KL2B413     VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KL2B53      VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL

            51                                                 100
h11B6       KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
KL2B494     KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
KL2B467     KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
KL2B30      KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
KL2B413     KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
KL2B53      KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS

            101                                                150
h11B6       SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
KL2B494     SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
KL2B467     SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
KL2B30      SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
KL2B413     SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
KL2B53      SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR

            151                                                200
h11B6       PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
KL2B494     PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
KL2B467     PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
KL2B30      PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
KL2B413     PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
KL2B53      PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL

            201                                            244
H11B6       VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
KL2B494     VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
KL2B467     VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
KL2B30      VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
KL2B413     VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
KL2B53      VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
```

Фиг. 8A


E:T=3:1
Общий лизис опухолевых клеток (AUC лизиса в реальном времени)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.1
1
10
100
Концентрация (нМ)
KLCB95
KLCB96
KLCB80
KLCB81
KLCB113

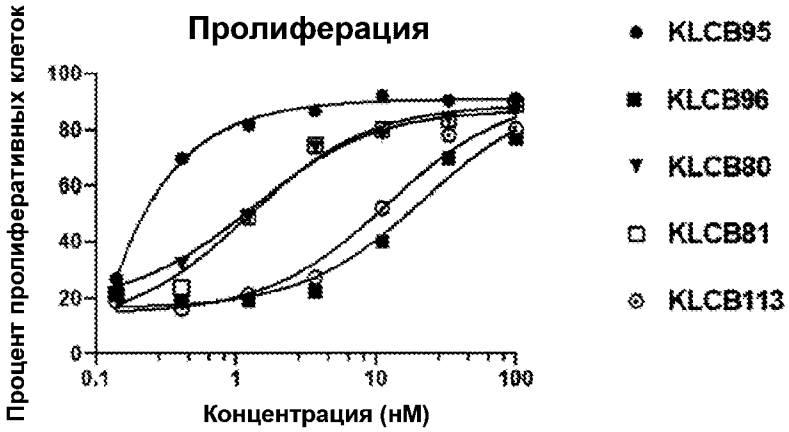
Фиг. 8Б


E:T=3:1
Общая активность каспазы 3/7 (AUC)
6×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
0
0.1
1
10
Концентрация (нМ)
KLCB91
KLCB105

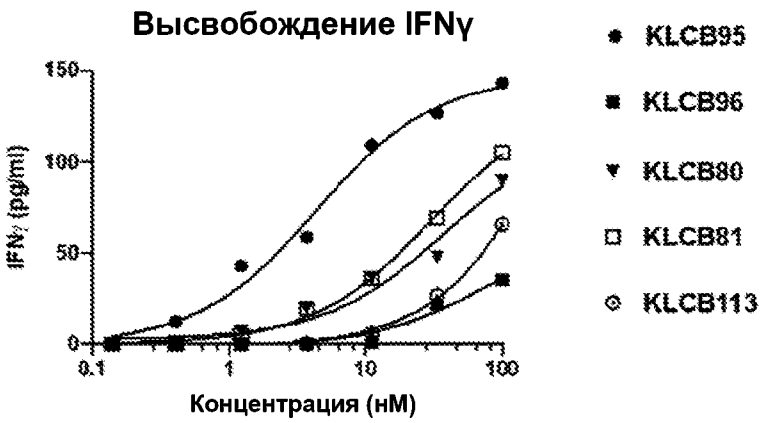
Фиг. 9A

Т-клеточная активация
CD25%
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Концентрация (нМ)
KLCB95
KLCB96
KLCB80
KLCB81
KLCB113

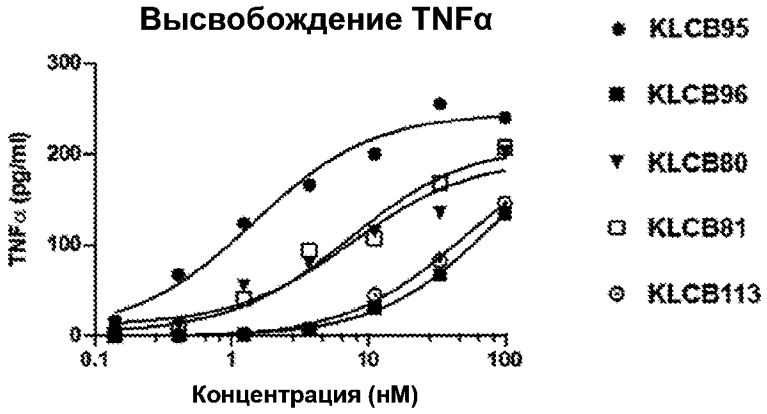
Фиг. 9Б


Пролиферация
Процент пролиферативных клеток
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
Концентрация (нМ)
KLCB95
KLCB96
KLCB80
KLCB81
KLCB113

Фиг. 10A


Высвобождение IFNγ
IFNγ (pg/ml)
150
100
50
0
0.1
1
10
100
Концентрация (нМ)
KLCB95
KLCB96
KLCB80
KLCB81
KLCB113

Фиг. 10Б


Высвобождение TNFα
TNFα (pg/ml)
300
200
100
0
0.1
1
10
100
Концентрация (нМ)
KLCB95
KLCB96
KLCB80
KLCB81
KLCB113

Фиг. 11A

Sequence of KL2B494 (Heavy Chain)

QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYAMSWVRQA PGKGLEWVST
IGGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH
LVMVTALLYD GMDVWGQGTM VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL
GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS
LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVSVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS
LSPGK

Sequence of KL2B494 (Light chain)

SSELTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVVYDD
SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFG
GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW
KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE
GSTVEKTVAP TECS

Фиг. 11Б

Sequence of KL2B467 (Heavy chain)

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS EYGMHWVRQA PGKGLEWVAF
ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAHLP
YSGSYHAFDY WGQGTQVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAAG GPSVFLFPPK
PKDTLMISRT PEVTCVVVSV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
K

Sequence of KL2B467 (Light chain)

QSVLTQPPSV SVAPGQTASI TCGGDNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVVYDN
SDRPSGIPER FSGSNSGTTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHPVVF
GGGTKVTVLG QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA
WKADSSPVKA GVETTTPSKQ SNNKYAASSY LSLTPEQWKS HRSYSCQVTH
EGSTVEKTVA PTECS

Фиг. 11B

Sequence of hu11B6 (Heavy chain)

QVQLQESGPG LVKPSDTLSL TCAVSGNSIT SDYAWNWIRQ PPGKGLEWIG
YISYSGSTTY NPSLKSRVTM SRDTSKNQFS LKLSSVTAVD TAVYYCATGY
YYGSGFWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC
NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

Sequence of hu11B6 (Light chain)

DIVLTQSPDS LAVSLGERAT INCKASESVE YFGTSLMHWY QQKPGQPPKL
LIYAASNRES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQTRKVPY
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

Фиг. 11Г

Sequence of KL2B413 (Heavy chain)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMTWVRQP PGKGLEWVAN
IKQDGSERYF VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLG
KYDLLTGHYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTKTYTCNVD HKPSNTKVDK RVESKYGPPC PPCPAPEAAG GPSVFLFPPK
PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
VLDSDGSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSLG
K

Sequence of KL2B413 (Light chain)

EIVLTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLSWYQQKP GKAPKLLIYA
TSTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ LNSYPRTFGQ
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

Фиг. 11Д

Sequence of KL2B30 Fab of KLCB80 bispecific (heavy chain)

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCAGTII
EGVVTPNEYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL
GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS
LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVSVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
PREPQVYVLP PSREEMTKNQ VSLLCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYL
TWPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS
LSPG

Sequence of KL2B30 Fab of KLCB80 bispecific (light chain)

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLAWYQQKP GKAPKFLIYA
ASTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ LNSYPLTFGG
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

Фиг. 11E

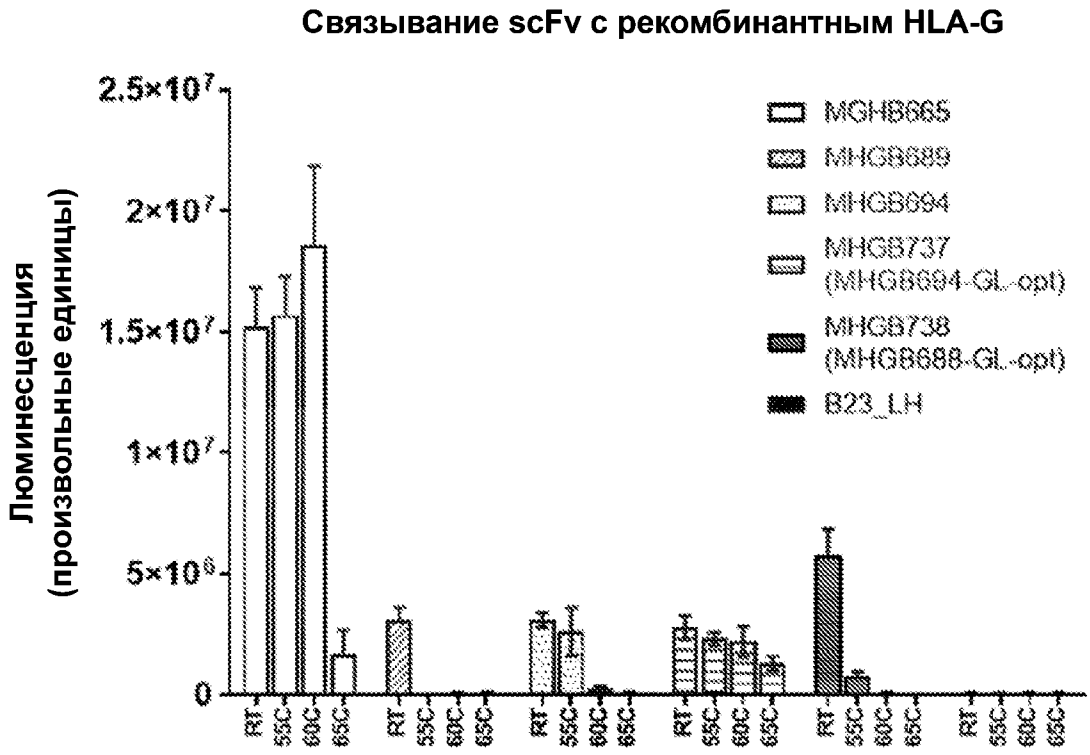
Sequence of KL2B353 Fab of KLCB113 bispecific (heavy chain)

EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCVASGFTFS SYDIHWVRQA PGKGLEWVAI
ISYDGSKKDY TDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMDSLRVED SAVYSCARES
GWSHYYYYGM DVWGQGTMVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV SVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYVLPPS REEMTKNQVS LLCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYLTW
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PG

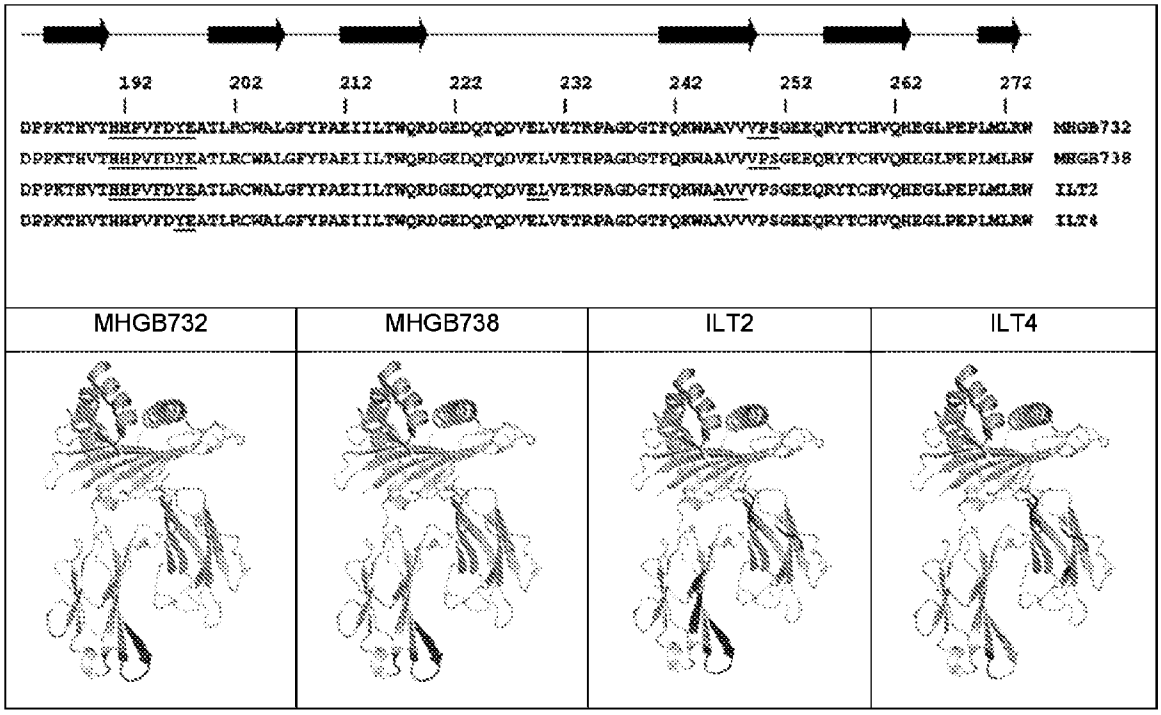
Sequence of KL2B353 Fab of KLCB113 bispecific (heavy chain)

DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLAWYQQKP GKVPKFLIYA
ASTLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQK YNSAPYTFGQ
GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

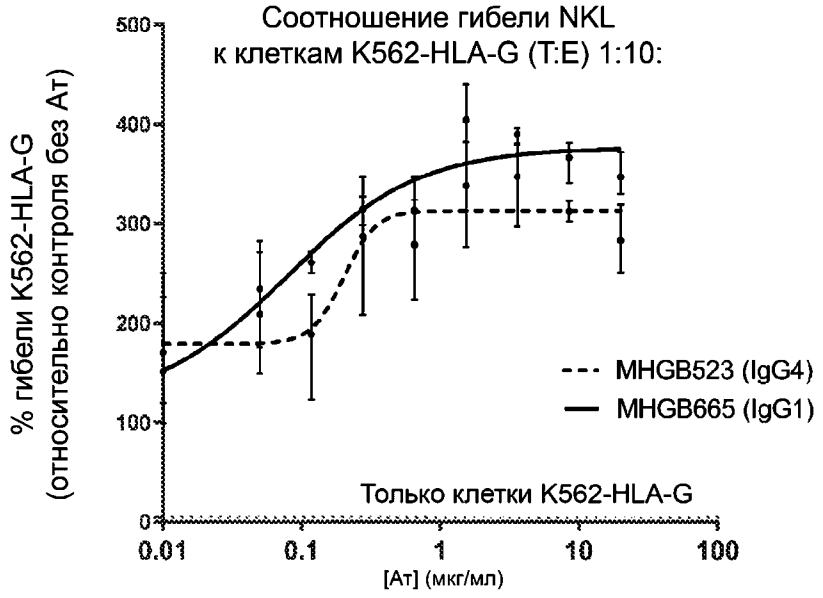
Фиг. 12


Связывание scFv с рекомбинантным HLA-G
Люминесценция (произвольные единицы)
2.5×10⁷
2×10⁷
1.5×10⁷
1×10⁷
5×10⁶
0
MGHB665
MHGB689
MHGB694
MHGB737 (MHGB694-GL-opt)
MHGB738 (MHGB688-GL-opt)
B23_LH
RT
55C
60C
65C

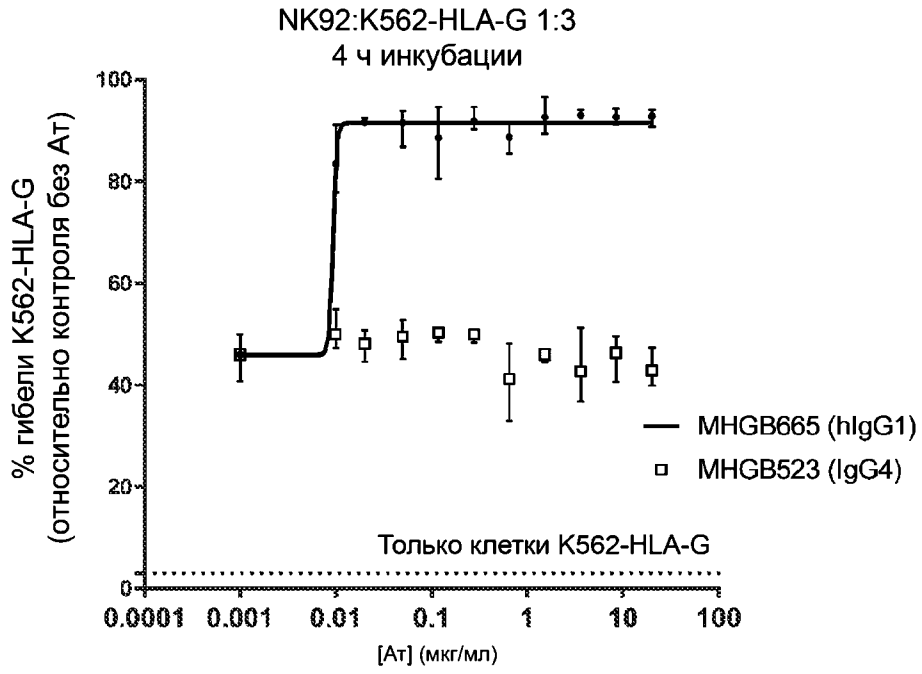
Фиг. 13


192
202
212
222
232
242
252
262
272
DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW MHGB732
DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW MHGB738
DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW ILT2
DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW ILT4
MHGB732
MHGB738
ILT2
ILT4

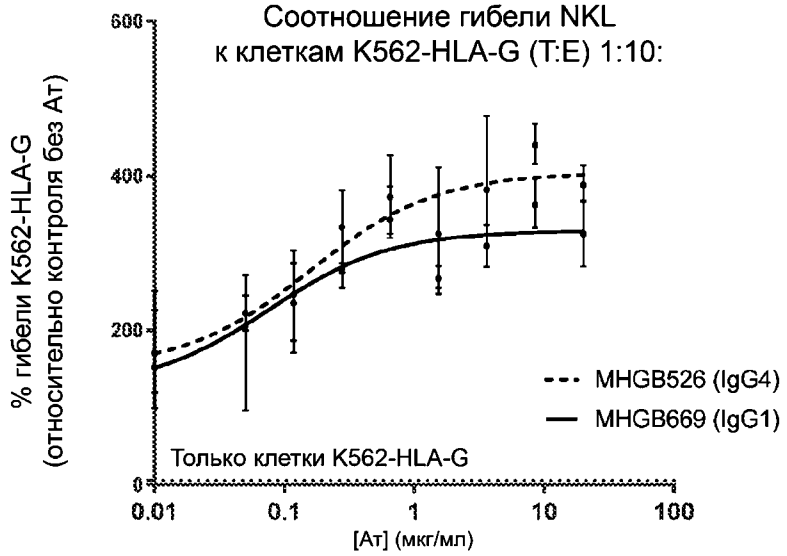
Фиг. 14А



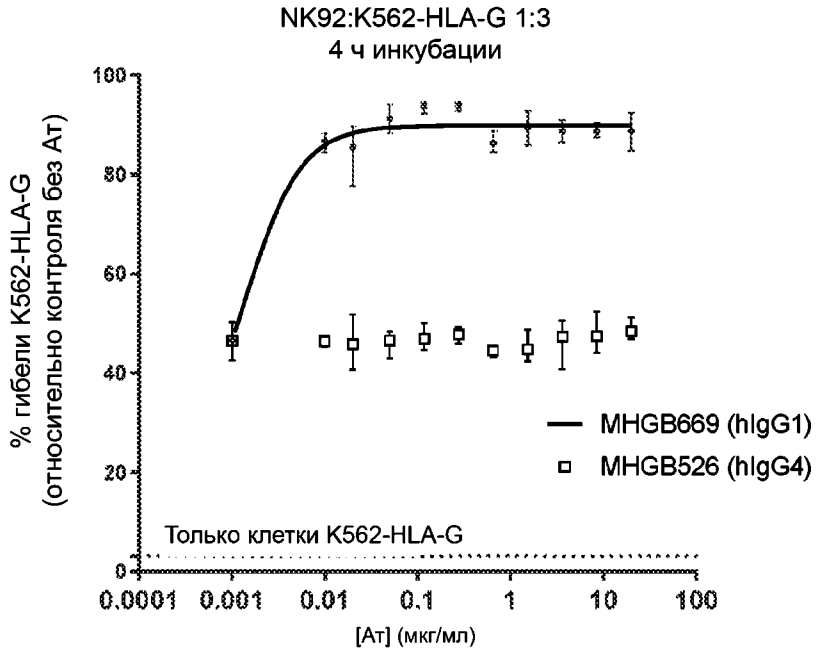
Фиг. 14Б



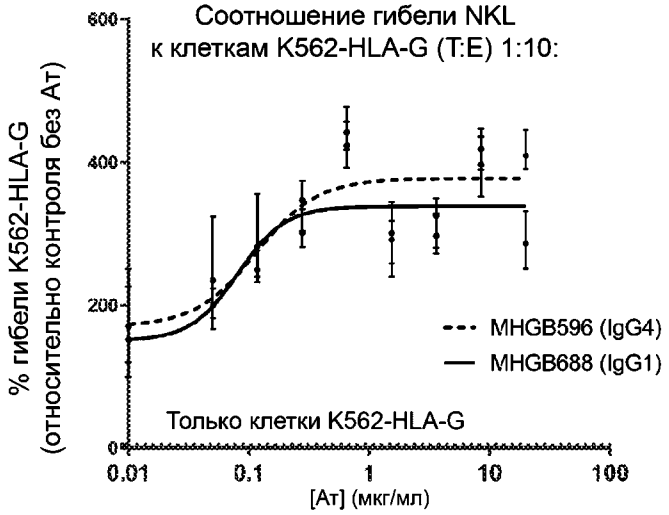
Фиг. 15А



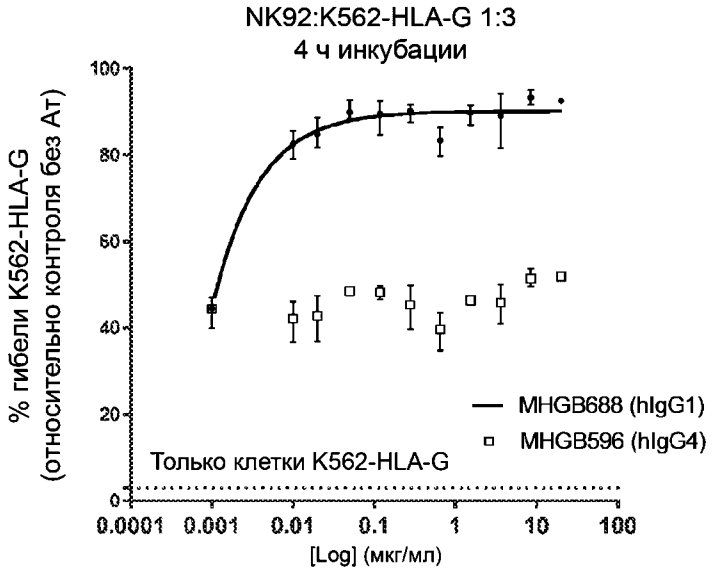
Фиг. 15Б



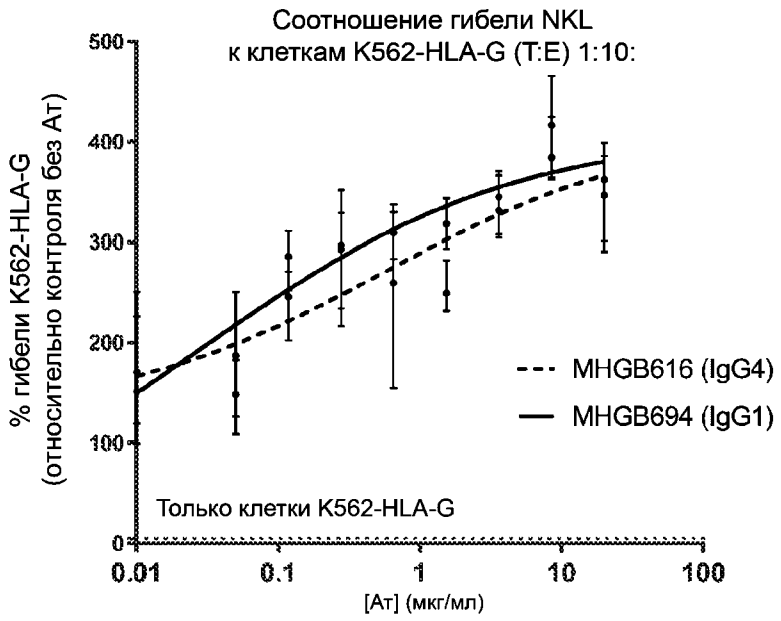
Фиг. 16А



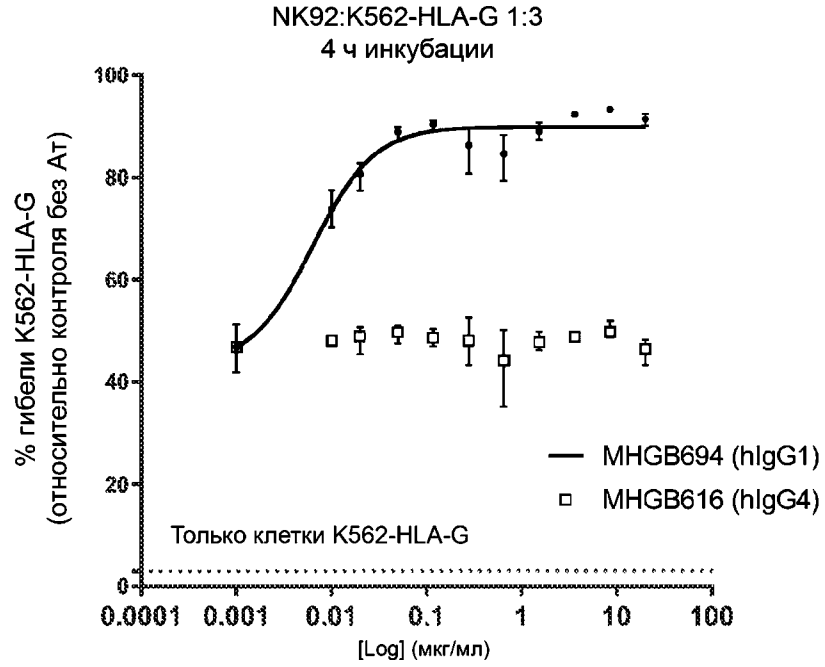
Фиг. 16Б



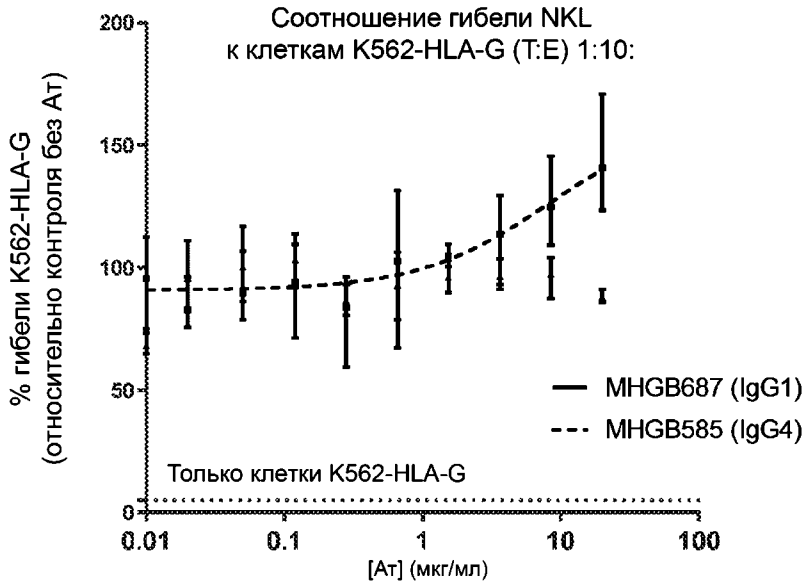
Фиг. 17А



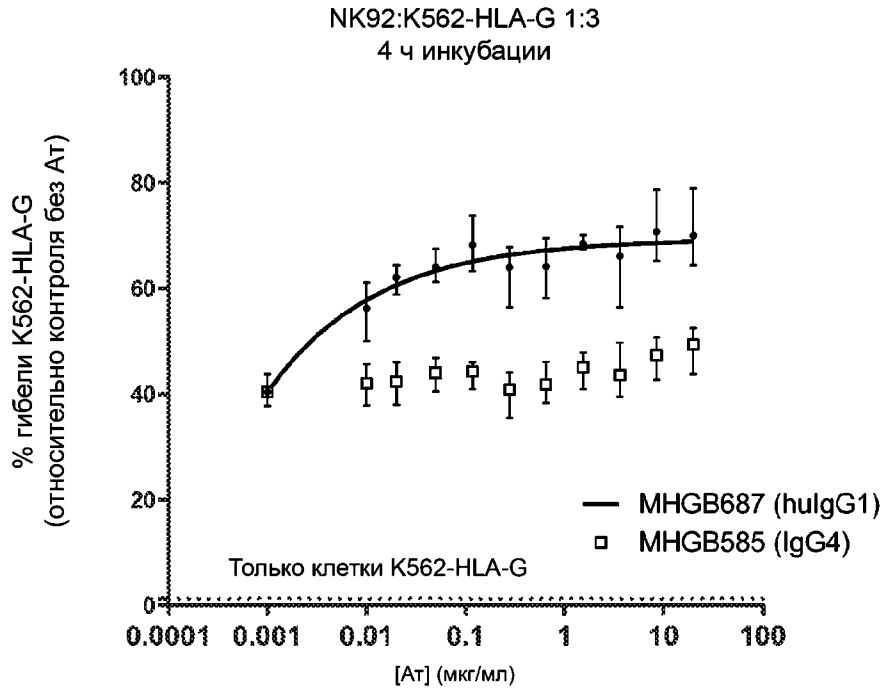
Фиг. 17Б



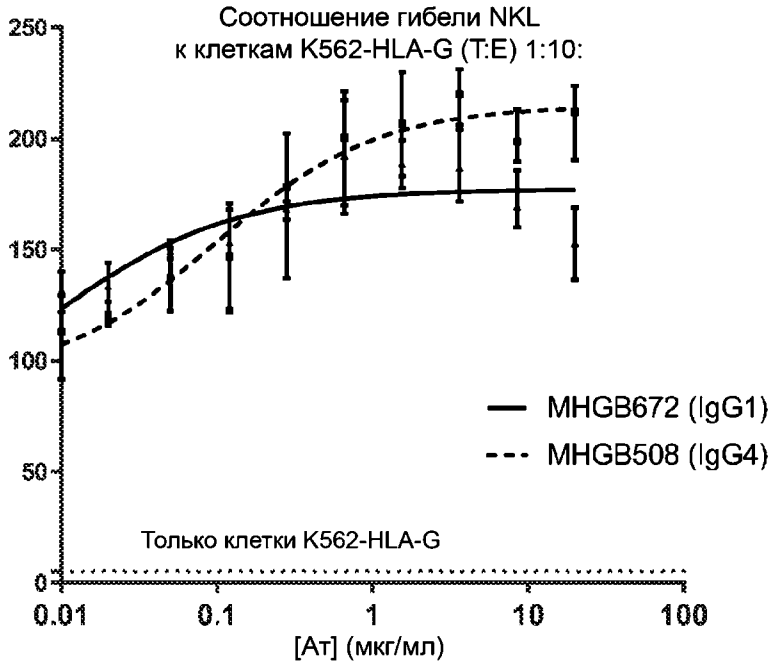
Фиг. 18А



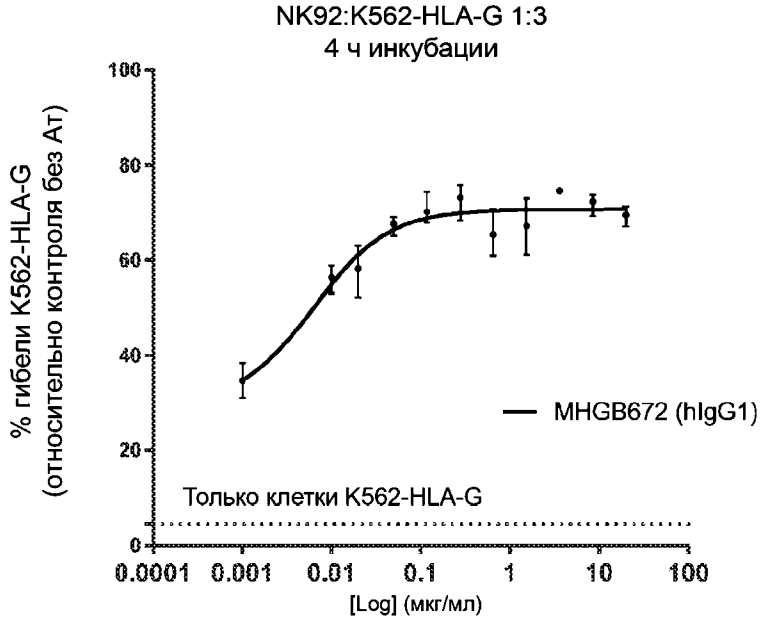
Фиг. 18Б



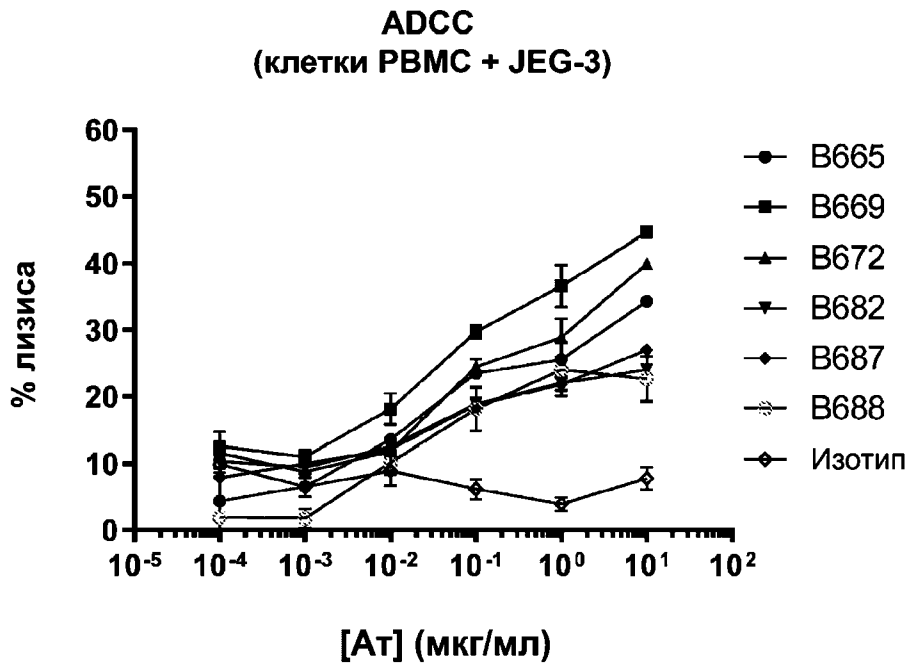
Фиг. 19А



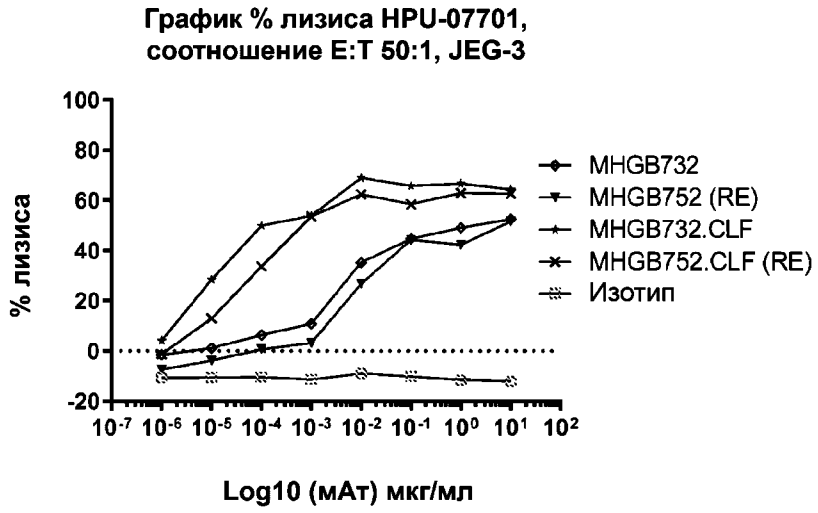
Фиг. 19Б



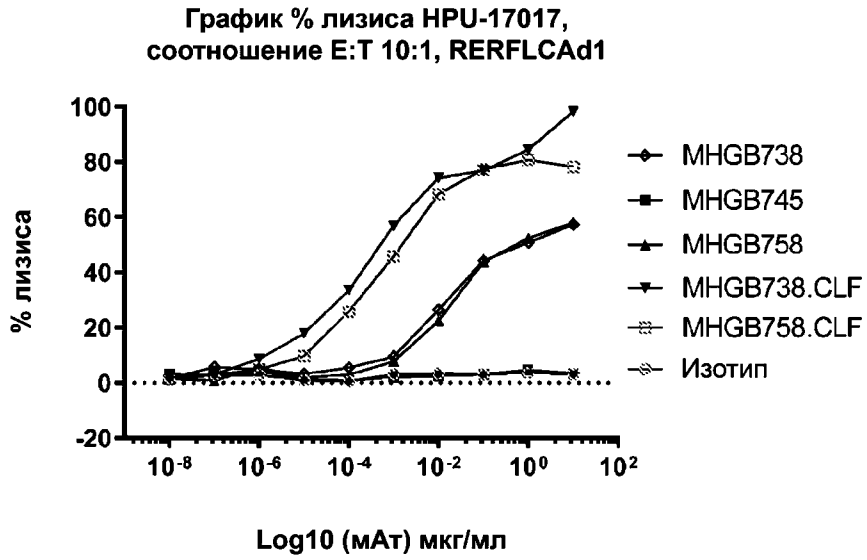
Фиг. 20


ADCC
(клетки PBMC + JEG-3)
% лизиса
60
50
40
30
20
10
0
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
[Ат] (мкг/мл)
B665
B669
B672
B682
B687
B688
Изотип

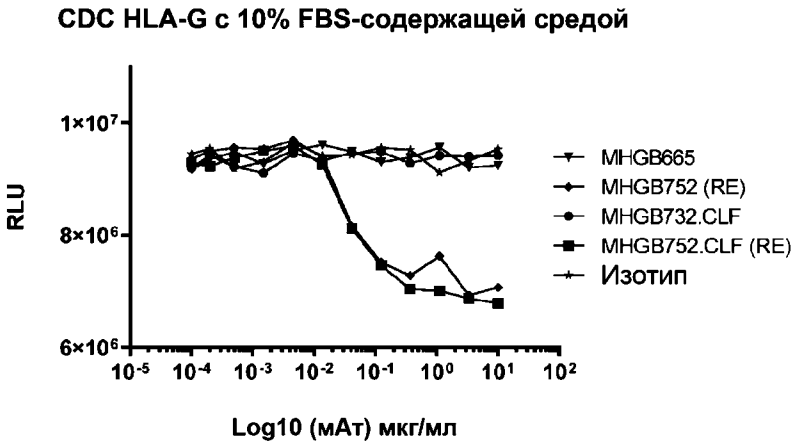
Фиг. 21А



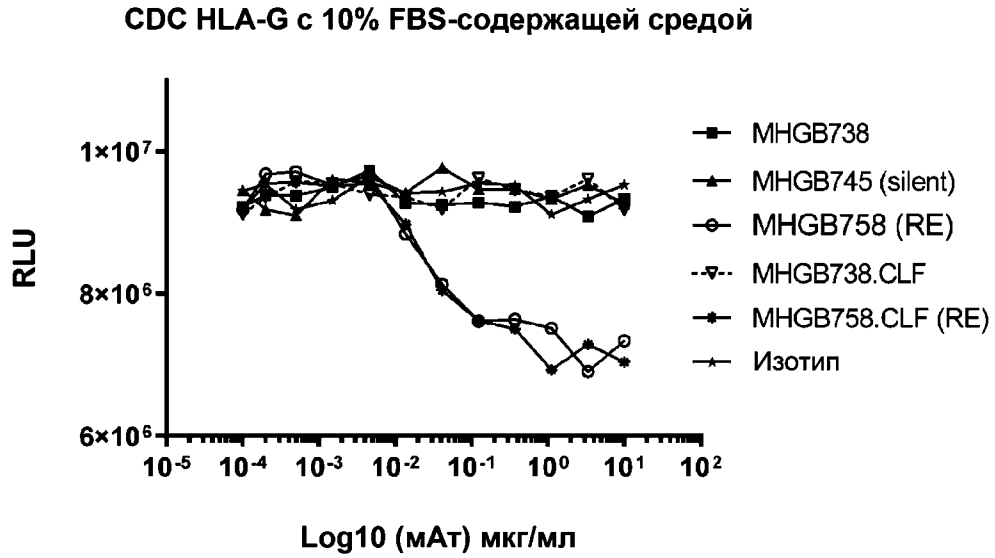
Фиг. 21Б



Фиг. 21Ц

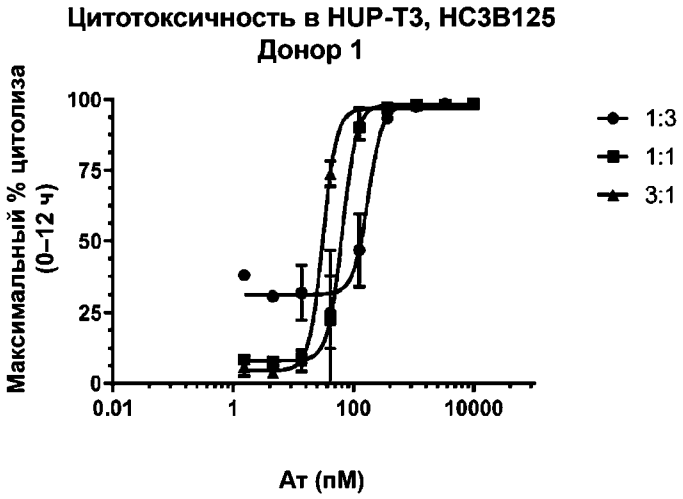


Фиг. 21Д

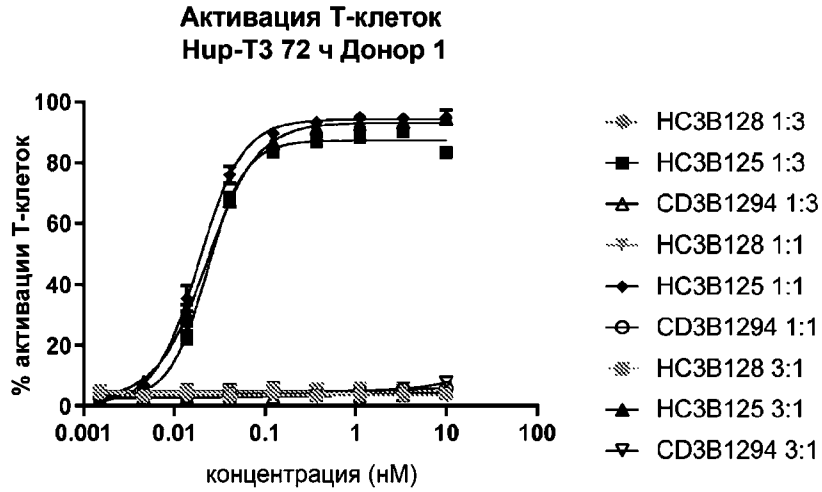


Фиг. 22А

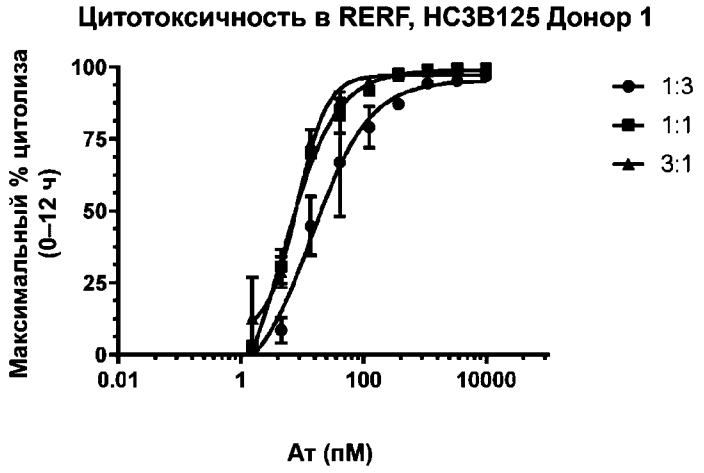
Фиг. 22Б



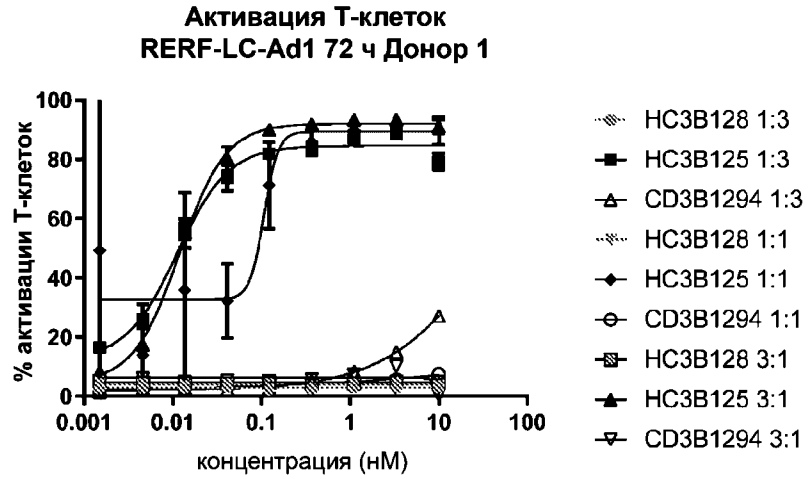
Фиг. 22Б



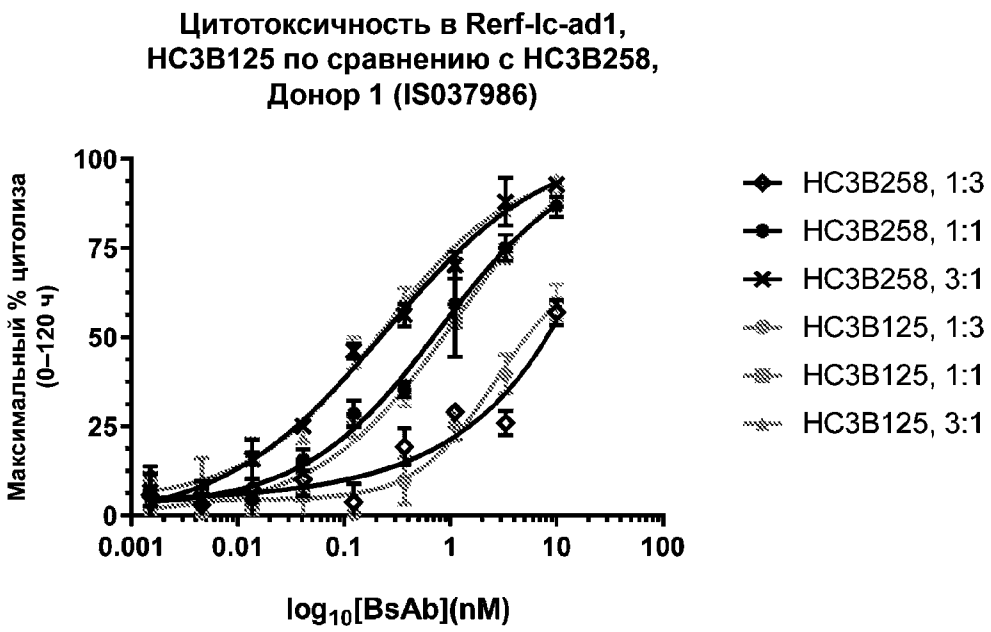
Фиг. 22Ц



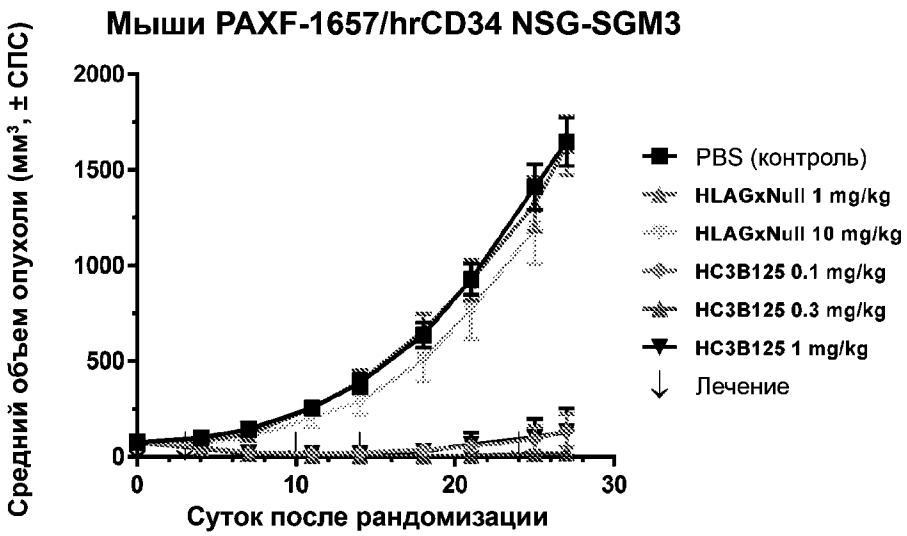
Фиг. 22Д



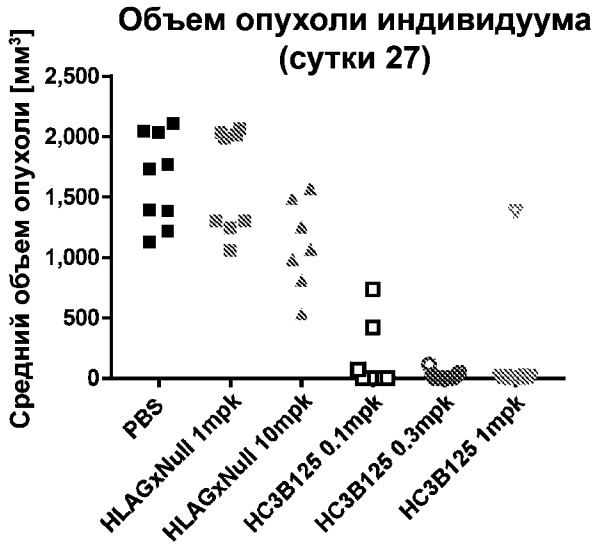
Фиг. 23


Цитотоксичность в Rerf-lc-ad1,
HC3B125 по сравнению с HC3B258,
Донор 1 (IS037986)
Максимальный % цитолиза
(0–120 ч)
100
75
50
25
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
log10[BsAb](nM)
HC3B258, 1:3
HC3B258, 1:1
HC3B258, 3:1
HC3B125, 1:3
HC3B125, 1:1
HC3B125, 3:1

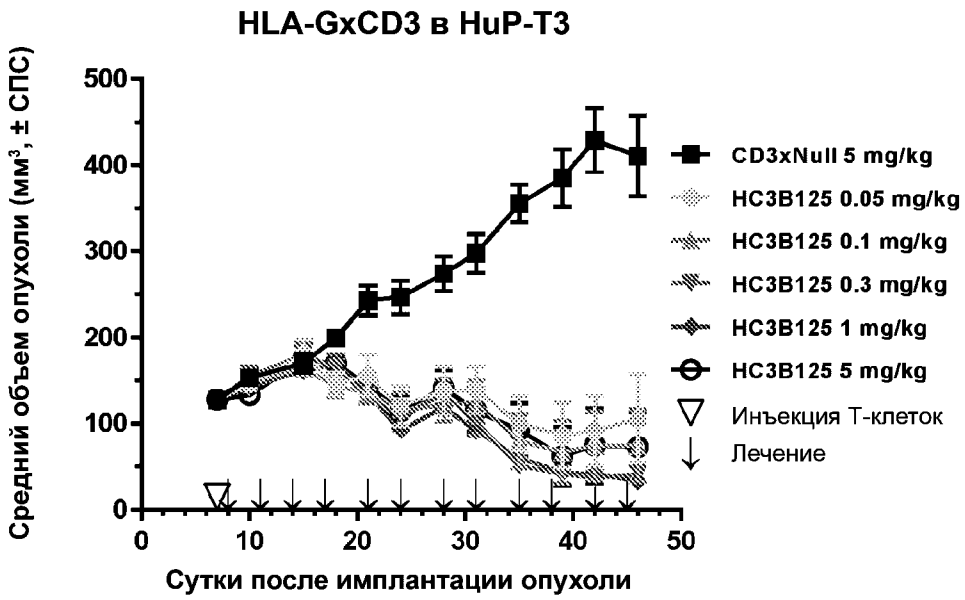
Фиг. 24А



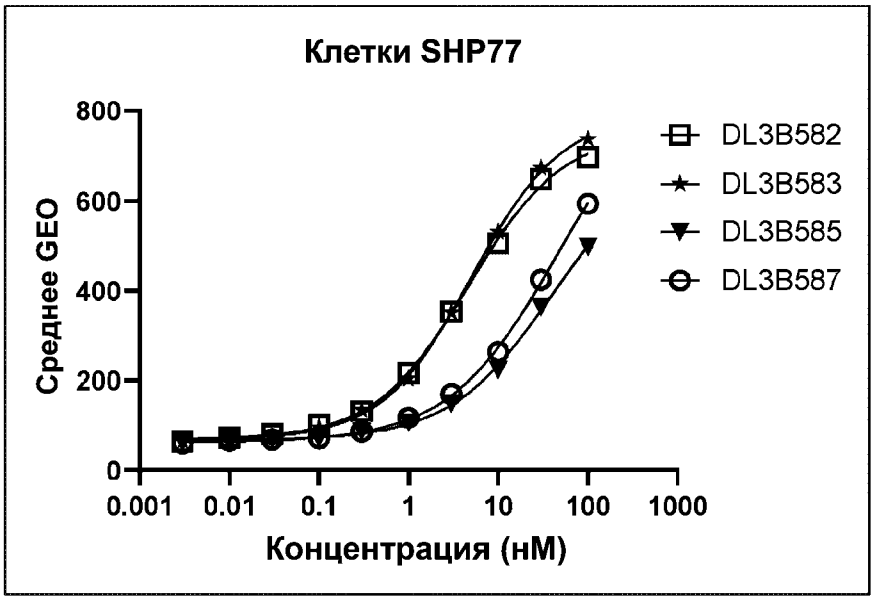
Фиг. 24Б



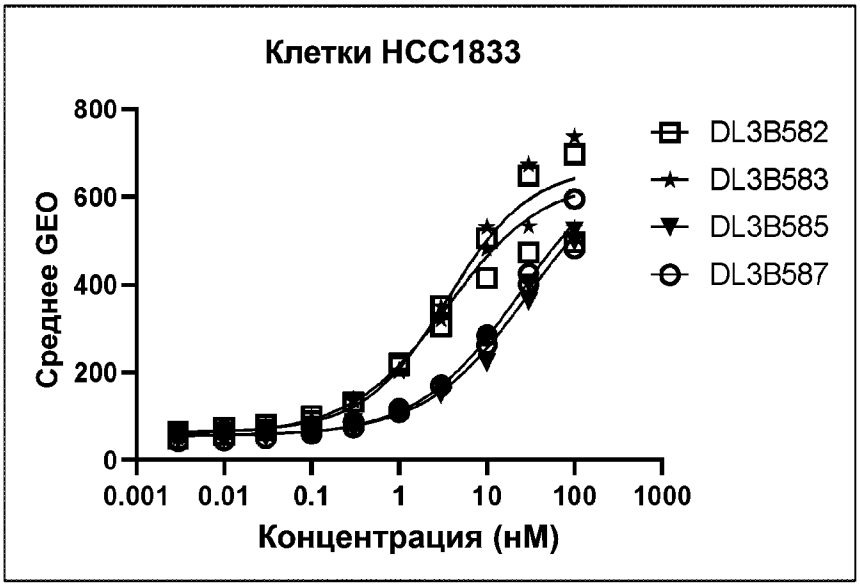
Фиг. 25


HLA-GxCD3 в HuP-T3
Средний объем опухоли (мм³, ± СПС)
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
Сутки после имплантации опухоли
CD3xNull 5 mg/kg
HC3B125 0.05 mg/kg
HC3B125 0.1 mg/kg
HC3B125 0.3 mg/kg
HC3B125 1 mg/kg
HC3B125 5 mg/kg
Инъекция Т-клеток
Лечение

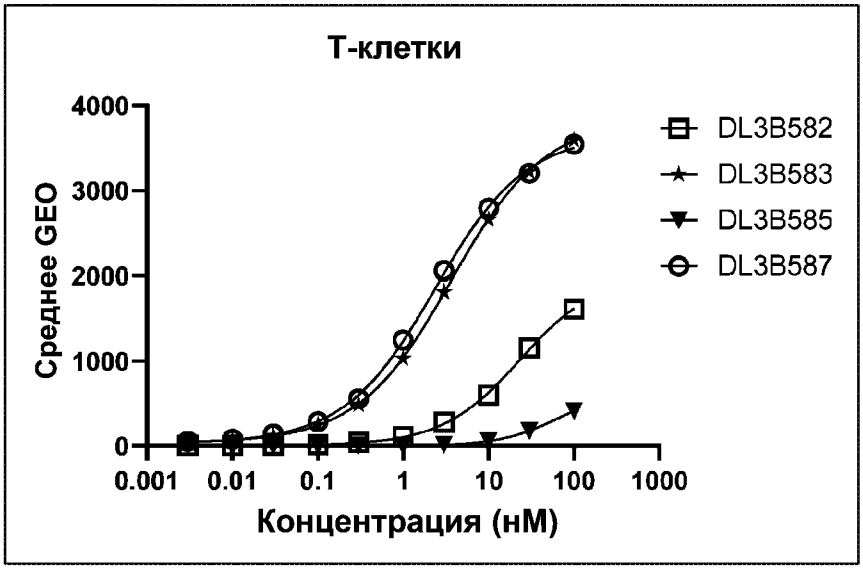
Фиг. 26А



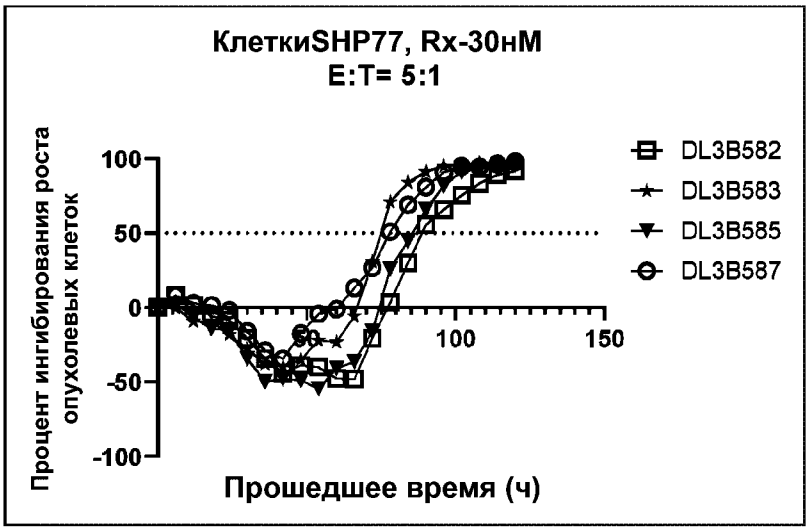
Фиг. 26Б



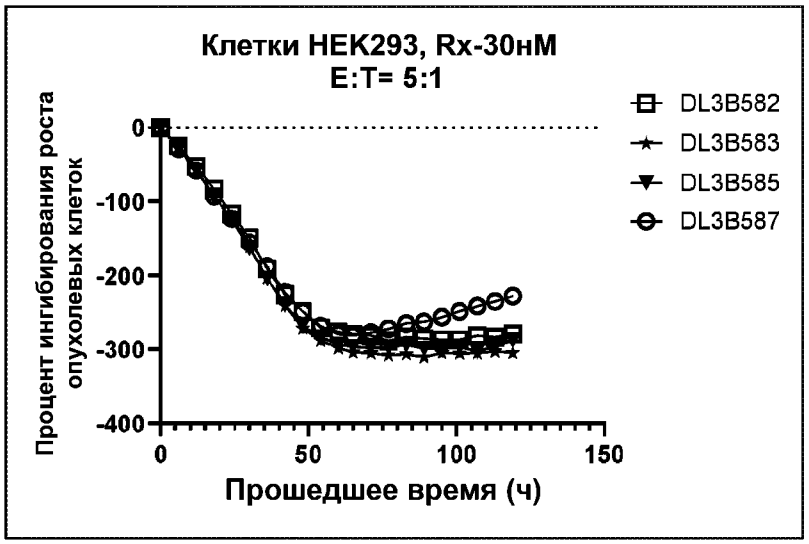
Фиг. 27


Т-клетки
Среднее GEO
4000
3000
2000
1000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Концентрация (нМ)
DL3B582
DL3B583
DL3B585
DL3B587

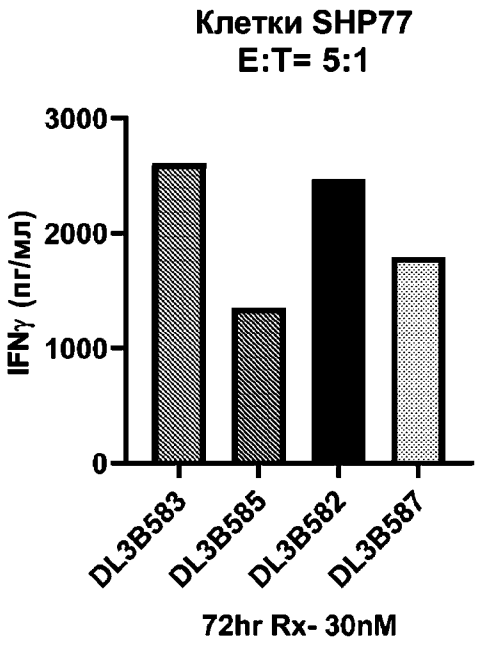
Фиг. 28А



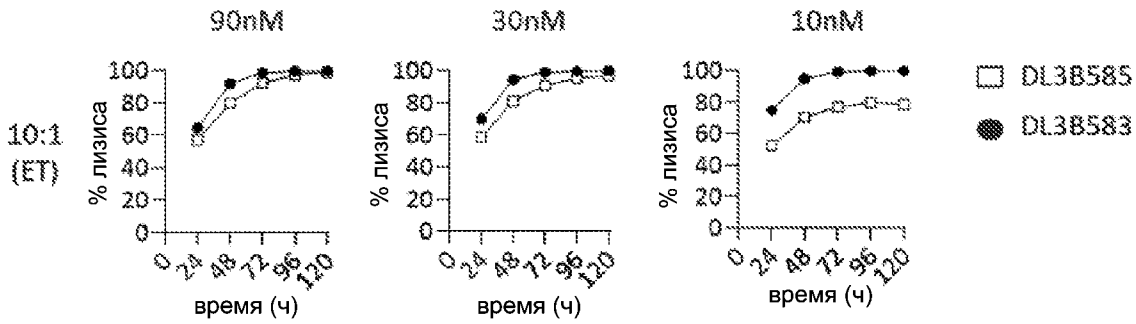
Фиг. 28Б



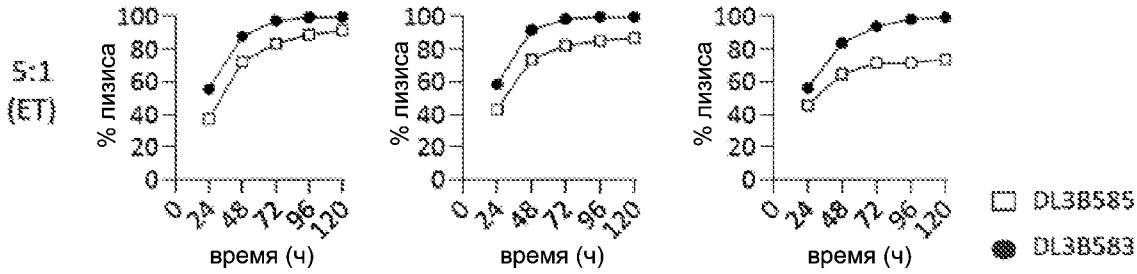
Фиг. 29


Клетки SHP77
E:T= 5:1
3000
2000
1000
0
IFNγ (пг/мл)
DL3B583
DL3B585
DL3B582
DL3B587
72hr Rx- 30nM

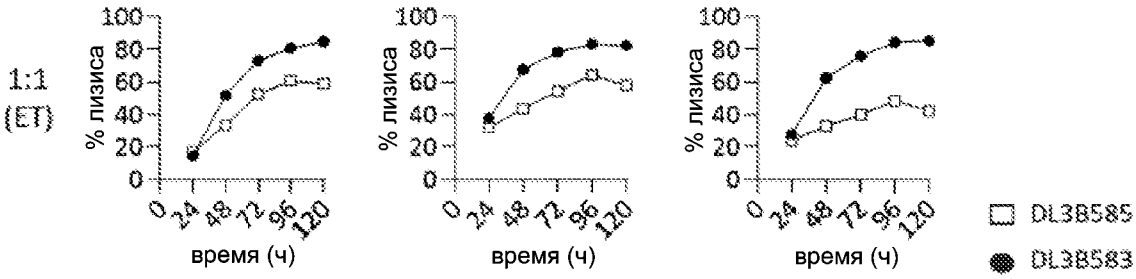
Фиг. 30В



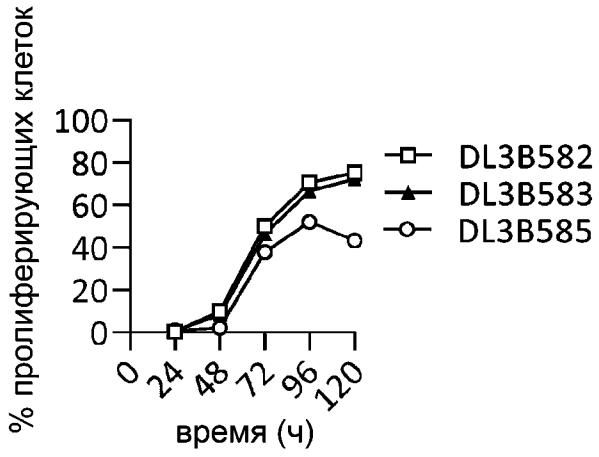
Фиг. 30А



Фиг. 30Б

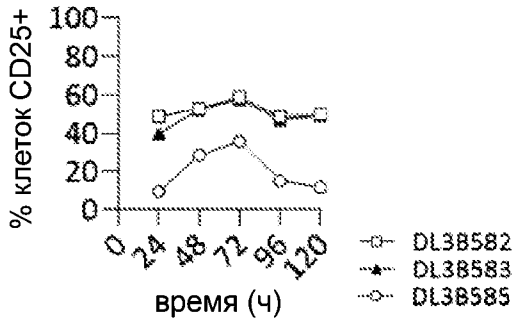


Фиг. 31

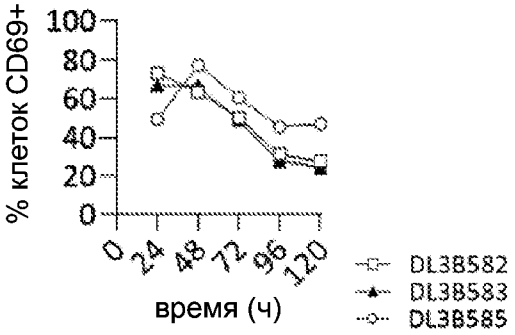

% пролиферирующих клеток
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
120
время (ч)
DL3B582
DL3B583
DL3B585

Фиг. 31

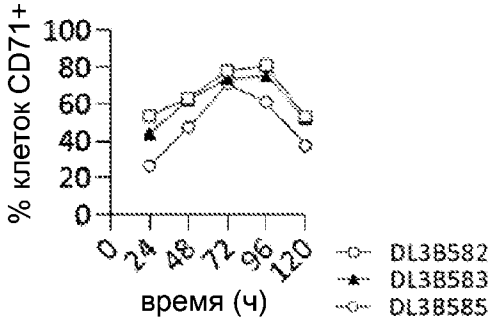
Фиг. 32А



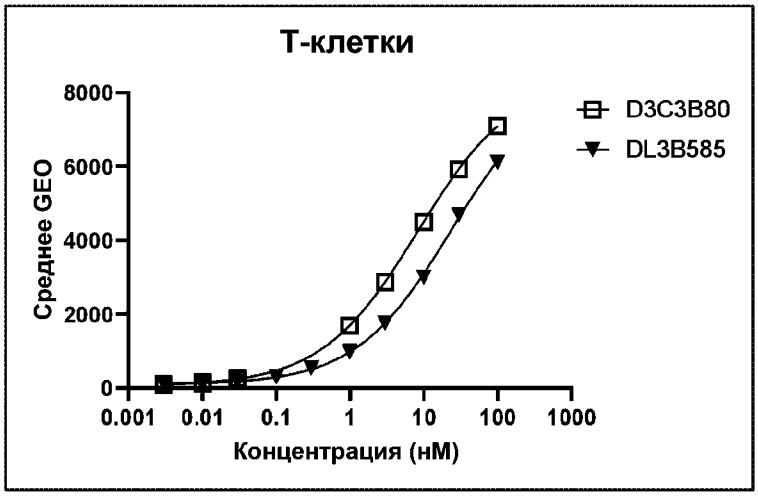
Фиг. 32Б



Фиг. 32В



Фиг. 33А



Фиг. 33Б