

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202293444 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.01.23

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.05.28

(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО

(31) 20177337.1

(32) 2020.05.29

(33) EP

(86) PCT/EP2021/064427

(87) WO 2021/239987 2021.12.02

(71) Заявитель:  
НУМАБ ТЕРАПЕУТИКС АГ (CH)

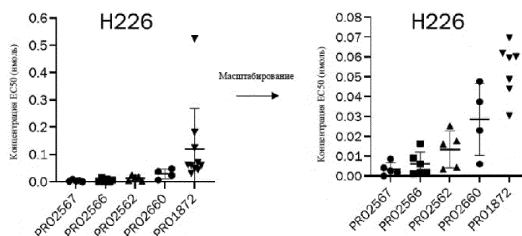
(72) Изобретатель:

Лихтлен Петер, Урех Давид, Хесс  
Кристиан, Гунде Теа (CH), Симонин  
Александр (FR), Вармут Штефан,  
Брок Маттиас, Чаттерджи Бити,  
Йоханссон Мария, Снелль Даниель  
(CH)

(74) Представитель:

Рогова Е.В., Микуцкая Т.Ю.,  
Файбисович А.С. (RU)

(57) Изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему два домена связывания на основе антител, которые специфически связываются с мезотелином (MSLN-BD), и по крайней мере один домен связывания на основе антител, который специфически связывается с CD3 (CD3-BD); причем указанное мультиспецифическое антитело не содержит полипептид Fc-области иммуноглобулина и причем каждый из указанных MSLN-BD связан с мезотелином (MSLN) с моновалентной константой диссоциации ( $K_D$ ) в диапазоне от 0,5 до 20 нмоль, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Настоящее изобретение также относится к последовательности(ям) нуклеиновой кислоты, кодирующей мультиспецифическое антитело, вектору(ам), содержащему указанную последовательность(и) нуклеиновой кислоты, клетке-хозяину(ам-ам), содержащей указанную последовательность(и) нуклеиновой кислоты или указанный вектор(ы), а также к способу получения мультиспецифического антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанное мультиспецифическое антитело, и способам их применения.



202293444 A1

202293444

A1

## **Описание изобретения**

### **МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО**

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему два связывающих домена на основе антител, которые специфически связываются с мезотелином (MSLN-BD); и по крайней мере одного связывающего домена на основе антител, который специфически связывается с CD3 (CD3-BD); причем указанное мультиспецифическое антитело не содержит полипептид Fc-области иммуноглобулина, и причем каждый домен MSLN-BD связывается с мезотелином (MSLN) с моновалентной константой диссоциации (KD) в диапазоне от 0,5 до 20 нмоль, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Настоящее изобретение также относится к последовательности(ям) нуклеиновой кислоты, кодирующей указанное мультиспецифическое антитело, вектору(ам), содержащему указанную последовательность(и) нуклеиновой кислоты, клетке-хозяину (клеткам-хозяевам), содержащей указанные последовательность(и) нуклеиновой кислоты или вектор(ы), а также к способу продуцирования/получения мультиспецифического антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанное мультиспецифическое антитело, и способам их применения.

#### **Предшествующий уровень техники**

Несмотря на значительный прогресс в области лечения рака, данный вопрос по-прежнему является серьезной неудовлетворенной медицинской потребностью. Наиболее существенный прогресс в области лечения рака в последние годы был достигнут благодаря появлению иммунотерапии различных молекулярных классов, включая без ограничения: терапии моноклональными антителами (mAbs), биспецифическими антителами (bsAbs), рекомбинантными белками и Т-клеточной (CAR-Т-клетки) терапии. Данные виды терапии индуцируют противоопухолевый иммунитет путем: а)

активного направления эффекторных клеток иммунной системы к резидентным опухолевым клеткам и/или б) стимуляции эффекторных клеток иммунной системы и/или с) ослабления опосредованного опухолью подавления иммунного ответа. В иммунотерапии данных видов обычно используют сверхэкспрессию специфических антигенов, связанную с резидентными опухолевыми клетками (*например*, злокачественными клетками, клетками сосудистой сети опухоли, стромальными клетками, иммунocyтами и т. д.), по сравнению с внеопухолевыми участками для направления их фармакологической активности на опухоли. В частности, к данным антигенам относятся опухоль-ассоциированные антигены (TAAs), которые содержат белки клеточной поверхности, выборочно сверхэкспрессированные в связи со злокачественными клетками. Используя связывание с опухоль-ассоциированными антигенами с высокой аффинностью, данные виды иммунотерапии позволяют в той или иной степени ограничить их иммуномодулирующую активность в отношении иммунологических синапсов между опухолевыми клетками и эффекторными клетками иммунной системы.

Общий класс TAA-связывающих иммунотерапевтических средств включает в себя mAbs - моноклональные антитела, которые вызывают противоопухолевый иммунитет путем опсонизации опухолевых клеток и запуска антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) с помощью клеток, экспрессирующих Fcγ-рецепторы (FcγR), в первую очередь клеток естественных киллеров (NK). Другие TAA-связывающие иммунотерапевтические средства используют цитотоксические Т-лимфоциты (CTLs) для направленной элиминации злокачественных клеток, таких как CAR-T-клетки, а также bsAbs, которые одновременно связываются с антигеном Т-клеток CD3 (TAA/CD3 bsAbs).

Хотя терапевтический эффект цитотоксических Т-лимфоцитов, (пере)направленных на TAA опухоль-ассоциированные антигены, и стандартных TAA/CD3 bsAbs - биспецифических антител к опухоль-

ассоциированным антигенам/CD3 был клинически подтвержден, дозолимитирующая токсичность (DLTs) зачастую исключает введение максимально эффективных доз (MED s) или приводит к прекращению лечения, что ограничивает его эффективность.

Одной из причин дозолимитирующей токсичности DLTs является то, что стандартные TAA/CD3 bsAbs - биспецифические антитела к опухоль-ассоциированным антигенам/CD3 также обычно ассоциируются с синдромом высвобождения цитокинов (CRS), предположительно из-за чрезмерной активности доменов антител к CD3. Внеопухолевая активность данных видов иммунотерапии вызывает секрецию про-воспалительных цитокинов в здоровых тканях, что приводит к получению нежелательных показателей безопасности. Кроме того, хотя биспецифические антитела к опухоль-ассоциированным антигенам/CD3 эффективно элиминируют клетки, сверхэкспрессирующие опухоль-ассоциированные антигены, это достигается путем привлечения и стимуляции CTLs - цитотоксических Т-лимфоцитов вне зависимости от того, экспрессируют ли такие клетки Т-клеточный рецептор (TCR), распознающий опухолевый антиген (антигены) (*m.e.* опухолереактивные Т-клетки). Таким образом, вместо стимуляции или реактивации природного противоопухолевого иммунитета хозяина биспецифические антитела к опухоль-ассоциированным антигенам/CD3 несколько неизбирательно стимулируют цитотоксические Т-лимфоциты, что создает потенциальные риски для безопасности.

Хотя конкретные пути возникновения дозолимитирующей токсичности могут быть различными, риск токсичности, связанной с иммунотерапией, обычно можно минимизировать или полностью исключить путем улучшения локализации опухоли и фармакологической активности.

TAAs (опухоль-ассоциированные антигены), которые почти всегда экспрессируются в раковых клетках (например, онкофетальные опухолевые антигены), называются очищенными TAAs - опухоль-ассоциированными антигенами. Опухоль-ассоциированные антигены, которые также



экспрессируются в нормальных (нераковых) клетках (обычно на более низких уровнях по сравнению с раковыми клетками), считаются неочищенными опухоль-ассоциированными антигенами. Благодаря очень высокой эффективности подходов с использованием биспецифических антител к опухоль-ассоциированным антигенам/CD3 неочищенные опухоль-ассоциированные антигены создают проблему, поскольку они повреждают неопухолевые клетки, которые также экспрессируют опухоль-ассоциированные антигены. Мезотелин (MSLN) является примером неочищенного опухоль-ассоциированного антигена; он экспрессируется не только в опухолевых клетках, но и в различных других тканях (хотя и на более низком уровне). Поэтому при нацеливании на неочищенные опухоль-ассоциированные антигены необходимы новые виды терапии, позволяющие улучшить селективность подходов с использованием биспецифических антител к опухоль-ассоциированным антигенам/CD3 для опухолевых тканей и минимизировать эффекты вне опухоли/на мишени. В частности, это касается подходов с использованием биспецифических антител к мезотелину/CD3 - MSLN/CD3 bsAb.

Мезотелин (MSLN) был предложен в качестве опухоль-ассоциированного антигена (TAA), который может стать мишенью для лечения солидного рака (MSLN<sup>+</sup>), такого как мезотелиома. Многие другие виды рака также экспрессируют мезотелин (MSLN<sup>+</sup>), включая некоторые формы рака яичников и рака поджелудочной железы, а также трижды негативный рак молочной железы. Современный стандарт лечения мезотелиомы включает в себя резекцию опухоли, химиотерапию и лучевую терапию, а также паллиативные меры (например, уменьшение количества жидкости и обезболивание). Иммуноterapia опухолей, продолжающих расти, включает в себя использование блокаторов PD-1/PD-L1, таких как пембролизумаб и ниволумаб, или антител к CTLA4, таких как ипилимумаб, для стимулирования иммунной системы, а также ингибиторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), таких как бевацизумаб, для блокирования ангиогенеза кровеносных

сосудов. Хотя данные методы лечения достигли клинического успеха, они сопряжены с повышенным риском системных побочных эффектов. В связи с этим существует потребность в специфическом подходе, нацеленном на мезотелин (MSLN).

Ранее были проведены (или проводятся в настоящее время) доклинические и клинические исследования на ранней стадии для оценки возможности нацеливания на мезотелин с помощью нескольких различных подходов, которые включают в себя препараты на основе антител и CAR-T-клетки. Препараты на основе антител включают в себя нацеливание на клетки, экспрессирующие мезотелин (MSLN) с помощью: иммунотоксина анти-MSLN SS1P фрагмента вместе с химиотерапевтическими средствами (например, пеметрексед и цисплатин) или в сочетании с фрагментом PE38; аматуксимаба, химерного моноклонального антитела для индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности; нагруженных лекарственных средств антитела (например, анетумаб равтансин (BAY 94-9343: анти-MSLN + ингибитор тубулина DM4) или DMOT4039A (анти-MSLN + антимитотический монометилауристатин E) для подавления роста опухоли. HPN536, представляющий собой мультиспецифическое привлекающее средство (анти-MSLN + анти-CD3 + анти-альбумин) с улучшенным периодом полужизни, перенаправляет Т-клетки для уничтожения клеток-мишеней, экспрессирующих мезотелин, *in vitro* и *in vivo* и, похоже, хорошо переносится макаками-крабоедами. Также хорошо переносится несколько видов терапии с использованием (CAR)-Т-клеток с анти-MSLN химерными антигенными рецепторами, включая CAR-T-клетки с транзиторной трансфекцией мРНК (RNA CARTmeso) и CAR-T-клетки с геном самоубийства (iCasp9m28z). Ответы на большинство видов терапии, нацеленных на мезотелин, до сих пор были скромными, что указывает на трудности, связанные с лечением солидных опухолей.

Для видов терапии, нацеленных на мезотелин, данная проблема усугубляется тем, что мезотелин попадает в сыворотку крови больных раком,

где он обнаруживается как растворимый мезотелин-родственный белок (SMRP). Антитела с высокой аффинностью к мезотелину также сильно связаны с растворимым мезотелин-родственным белком, что негативно отражается на их активности, снижая эффективную дозу воздействия на раковые клетки.

Таким образом, существует потребность в новых молекулах, способных эффективно локализоваться в опухолях и стимулировать ответ Т-клеток в присутствии растворимого мезотелин-родственного белка.

Мультиспецифические антитела, имеющие по крайней мере три домена связывания/связывающих домена, два из которых специфически связываются с мезотелином (MSLN-BD), а один специфически связывается с CD3 (CD3-BD), в которых связывающая аффинность двух доменов MSLN-BD находится в хорошо сбалансированном диапазоне, теоретически могут устранить многие из вышеуказанных ограничений с точки зрения безопасности и эффективности. Такие мультиспецифические антитела теоретически способны вызывать высокую локализацию в опухоли и улучшенную селективность, что может обеспечить повышенную безопасность и эффективность терапии различных видов рака. Кроме того, такие молекулы дополнительно ограничивают необходимость совместного введения дополнительных иммунотерапевтических средств для усиления ответа пациента, что упрощает разработку и минимизирует затраты на лечение. Однако внедрение мультиспецифических антител для терапевтического применения было затруднено в связи с проблемами с их молекулярной архитектурой, свойствами компонентов антигенсвязывающих доменов, их возможностью продуцирования и/или плохими биофизическими свойствами. Таким образом, остается явная потребность в новых мультиспецифических антителах, демонстрирующих повышенную локализацию в опухолевых клетках и обеспечивающих эффективную активацию Т-клеток с приемлемыми токсикологическими показателями, а также обладающих биофизическими свойствами, делающими их пригодными для фармацевтической разработки.

Кроме того, несмотря на наличие множества антител, специфичных к мезотелину и/или CD3, сложные и специальные требования к таким мультиспецифическим антителам требуют разработки новых доменов антител с индивидуальными свойствами.

Таким образом, несмотря на многочисленные варианты лечения больных раком, остается потребность в эффективных и безопасных терапевтических средствах и необходимость их предпочтительного использования более целенаправленным образом. Иммуномодулирующие биологические препараты предлагают перспективные подходы к лечению рака благодаря своим способам действия, однако, общая иммуностимуляция и невозможность ограничения иммуномодуляции до патологически значимых клеток и участков вызывают многочисленные побочные эффекты и значительную токсичность, что может приводить к увеличению заболеваемости и смертности пациентов. В связи с этим целью настоящего изобретения является создание лекарственного средства для улучшения лечения пролиферативного заболевания, в частности рака.

### **Сущность изобретения**

Целью настоящего изобретения является создание лекарственного средства для улучшения лечения пролиферативного заболевания, в частности рака. В частности, целью настоящего изобретения является создание лекарственного средства, имеющего повышенную эффективность нацеливания, тем самым улучшая токсикологический профиль.

В соответствии с первым аспектом настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему:

а) два связывающих домена на основе антител, которые специфически связываются с мезотелином (MSLN-BD); и

б) по крайней мере один связывающий домен на основе антител, который специфически связывается с CD3 (CD3-BD);

в котором указанное мультиспецифическое антитело не содержит полипептид Fc-области иммуноглобулина и в котором каждый указанный домен MSLN-BD

связывается с мезотелином (MSLN) с моновалентной константой диссоциации ( $K_D$ ) в диапазоне от 0,5 до 20 нмоль, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение относится к специфическому связывающему домену/домену связывания с мезотелином.

В соответствии с третьим аспектом настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты или двум последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим мультиспецифическое антитело или специфический домен связывания с мезотелином по настоящему изобретению.

В соответствии с четвертым аспектом настоящее изобретение относится к вектору или двум векторам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты или две последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В соответствии с пятым аспектом настоящее изобретение относится к клетке-хозяину или клеткам-хозяевам, содержащим вектор или два вектора по настоящему изобретению.

В соответствии с шестым аспектом настоящее изобретение относится к способу получения мультиспецифического антитела или специфического связывающего домена по настоящему изобретению, содержащему (i) предоставление последовательности нуклеиновой кислоты или двух последовательностей нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или вектора или двух векторов по настоящему изобретению, экспрессию указанных последовательности нуклеиновой кислоты или последовательностей нуклеиновой кислоты, или указанных вектора или векторов, и сбор указанных мультиспецифического антитела или специфического связывающего домена из экспрессионной системы, или (ii) предоставление клетки-хозяина или клеток-хозяев по настоящему изобретению, культивирование указанных клетки-хозяина или клеток-хозяев; а также сбор указанных мультиспецифического антитела или специфического связывающего домена из клеточной культуры.

В соответствии с седьмым аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В соответствии с восьмым аспектом настоящее изобретение относится к применению мультиспецифического антитела по настоящему изобретению в лечении заболевания, в частности заболевания человека, еще более конкретно такого заболевания человека, как рак, воспалительное и аутоиммунное заболевание, в котором мультиспецифическое антитело представляет собой одноцепочечный белок, содержащий три или четыре связывающих домена.

В соответствии с девятым аспектом настоящее изобретение относится к применению мультиспецифического антитела по настоящему изобретению в лечении заболевания, в частности заболевания человека, еще более конкретно такого заболевания человека, как рак, воспалительное и аутоиммунное заболевание, в котором мультиспецифическое антитело представляет собой гетеродимерный белок, содержащий три или четыре связывающих домена.

В соответствии с десятым аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, в частности заболевания человека, еще более конкретно такого заболевания человека, как рак, воспалительное и аутоиммунное заболевание, содержащему этап введения вышеуказанного одноцепочечного мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, при этом указанное одноцепочечное мультиспецифическое антитело содержит три или четыре связывающих домена.

В соответствии с одиннадцатым аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, в частности заболевания человека, еще более конкретно такого заболевания человека, как рак, воспалительное и аутоиммунное заболевание, содержащему этап введения вышеуказанного гетеродимерного мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, при этом указанное гетеродимерное мультиспецифическое антитело содержит три или четыре связывающих домена.

Аспекты, полезные отличительные особенности и предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, кратко изложенные в следующих пунктах (по отдельности или в сочетании друг с другом), также способствуют достижению цели изобретения:

1. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

а) два связывающих домена на основе антител, которые специфически связываются с мезотелином (MSLN-BD); и

б) по крайней мере один связывающий домен на основе антител, который специфически связывается с CD3 (CD3-BD);

причем указанное мультиспецифическое антитело не содержит полипептид Fc-области иммуноглобулина и причем каждый домен MSLN-BD связывается с мезотелином (MSLN) с моновалентной константой диссоциации ( $K_D$ ) в диапазоне от 0,5 до 20 нмоль, измеренной SPR.

2. Мультиспецифическое антитело по п. 1, в котором концентрация  $EC_{50}$  указанного мультиспецифического антитела для уничтожения клеток-мишеней, у которых уровень экспрессии мезотелина в 6–8 раз выше, чем у клеток MeT-5A (ATCC CRL-9444), что определяется с помощью проточной цитометрии, не увеличивается более чем в 25 раз в присутствии по крайней мере 200 нг/мл, более конкретно – по крайней мере 300 нг/мл, еще более конкретно – по крайней мере 400 нг/мл, еще более конкретно – по крайней мере 500 нг/мл растворимого мезотелина по данным анализа цитотоксичности Т-клеток по отношению к клеткам-мишеням.

3. Мультиспецифическое антитело по п. 1, где указанное мультиспецифическое антитело способно уничтожать клетки-мишени, у которых уровень экспрессии мезотелина в 6–8 раз выше, чем у клеток MeT-5A (ATCC CRL-9444), что определяется с помощью проточной цитометрии, с концентрацией  $EC_{50}$ , которая по крайней мере в 10 раз, более конкретно – по крайней мере в 20 раз, еще более конкретно – по крайней мере в 25 раз меньше концентрации  $EC_{50}$  для уничтожения указанных клеток MeT-5A, что

определяется с помощью анализа цитотоксичности Т-клеток по отношению к клеткам-мишеням и клеткам MeT-5A.

4. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–3, в котором каждый указанный домен MSLN-BD связывается с мезотелином (MSLN) с моновалентной константой диссоциации ( $K_D$ ) в диапазоне от 0,5 до 15 нмоль, конкретно – в диапазоне от 0,6 до 10 нмоль, еще более конкретно – в диапазоне от 0,7 до 5 нмоль при измерении методом SPR.

5. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

а) два связывающих домена на основе антител, которые специфически связываются с мезотелином (MSLN-BD); и

б) по крайней мере один связывающий домен на основе антител, который специфически связывается с CD3 (CD3-BD);

причем указанное мультиспецифическое антитело не содержит полипептид Fc-области иммуноглобулина и причем каждый указанный домен MSLN-BD связывается с мезотелином (MSLN) с моновалентной константой диссоциации ( $K_D$ ) в диапазоне от 0,1 до 5 нмоль, измеренной методом SPR.

6. Мультиспецифическое антитело по п. 5, в котором концентрация  $EC_{50}$  указанного мультиспецифического антитела для уничтожения клеток-мишеней, у которых уровень экспрессии мезотелина в 6–8 раз выше, чем у клеток MeT-5A (ATCC CRL-9444), что определено с помощью проточной цитометрии, не увеличивается более чем в 50 раз в присутствии по крайней мере 200 нг/мл, более конкретно – по крайней мере 300 нг/мл, еще более конкретно – по крайней мере 400 нг/мл, еще более конкретно – по крайней мере 500 нг/мл растворимого мезотелина по данным анализа цитотоксичности Т-клеток по отношению к клеткам-мишеням.

7. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 5 или 6, в котором каждый указанный домен MSLN-BD связывается с мезотелином (MSLN) с моновалентной константой диссоциации ( $K_D$ ) в диапазоне от 0,1 до 3 нмоль, более конкретно – в диапазоне от 0,15 до 2 нмоль, еще более конкретно – в диапазоне от 0,2 до 1 нмоль при измерении методом SPR.



8. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором каждый указанный домен MSLN-BD специфически связывается с мезотелином человека.

9. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором каждый указанный домен MSLN-BD связан с областью I, областью II и/или областью III MSLN, предпочительно – с областью I и/или областью II MSLN, в частности, с областью I MSLN.

10. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–9, в котором два домена MSLN-BD связываются с одним и тем же эпитопом MSLN.

11. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–4 и 8–10, в котором домен MSLN-BD содержит

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 1, 2 (или 10) и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно; или последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно; и

(ii) последовательности каркасных областей FR1–FR4 домена VH3 или VH4; конкретно – последовательности каркасных областей FR1–FR4 домена VH3; и

(iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, конкретно – каркасные области FR1–FR3 каркаса V<sub>κ1</sub> или V<sub>κ3</sub>, более конкретно – каркасные области FR1–FR3 каркаса V<sub>κ1</sub>, и каркасную область FR4, выбранную из каркасной области FR4 каркаса V<sub>κ</sub> и каркасной области FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, более конкретно – каркасную область FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную любой последовательности SEQ ID NO: 132–139 по крайней мере на 70, 80 или 90 процентов, более конкретно – каркасную область FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 132–139, еще более конкретно – каркасную область FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, содержащую последовательность SEQ ID NO: 132 или 139.

12. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–4 и 8–11, в котором домен MSLN-BD содержит

а.1) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 1, 2 (или 10) и 3, соответственно,

б.1) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно,

с.1) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

д.1) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

а.2) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 1, 2 (или 10) и 3, соответственно,

б.2) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно,

с.2) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

д.2) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

а.3) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно,

б.3) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно,

с.3) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.3) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

а.4) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно,

б.4) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно,

с.4) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.4) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

а.5) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно,

б.5) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно,

с.5) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.5) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

а.6) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно,

б.6) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно,

с.6) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

д.6) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

а.7) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно,

б.7) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно,

с.7) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

д.7) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов.

13. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 5–10, в котором указанный домен MSLN-BD содержит

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно; и

(ii) последовательности каркасных областей FR1–FR4 домена VH3 или VH4; конкретно – последовательности каркасных областей FR1–FR4 домена VH3; и

(iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, более конкретно – каркасные области FR1–FR3 каркаса V<sub>κ1</sub> или V<sub>κ3</sub>, более конкретно – каркасные области FR1–FR3 каркаса V<sub>κ1</sub>, и каркасную область FR4, выбранную из каркасной области FR4 каркаса V<sub>κ</sub> и каркасной области FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, более конкретно – каркасную область FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную любой последовательности SEQ ID NO: 132–139 по крайней мере на 70, 80 или 90 процентов, более конкретно – каркасную область FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 132–139, еще более конкретно – каркасную область FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, содержащую последовательность SEQ ID NO: 132 или 139.

14. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 5–10 и 13, в котором указанный домен MSLN-BD содержит

а.1) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно,

б.1) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно,

с.1) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

д.1) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов.

или

а.2) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно,

б.2) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно,

с.2) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.2) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов.

или

а.3) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно,

б.3) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно,

с.3) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.3) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов.

или

а.4) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно,

б.4) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно,

с.4) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.4) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов.

15. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 11–14, в котором указанный домен VH содержит аминокислотный остаток C51

(система нумерации АН<sub>о</sub>), а указанный домен VL содержит аминокислотный остаток C141 (система нумерации АН<sub>о</sub>).

16. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 8–15, в котором каждый указанный домен MSLN-BD перекрестно реагирует с мезотелином MSLN *Macaca fascicularis* (*Cynomolgus*), более конкретно – связывается с мезотелином MSLN *Cynomolgus* с моновалентной константой диссоциации  $K_D$  в диапазоне от 0,2 до 75 нмоль, конкретно – в диапазоне от 0,3 до 60 нмоль, более конкретно – в диапазоне от 0,4 до 50 нмоль, еще более конкретно – в диапазоне от 0,5 до 40 нмоль, при измерении методом SPR.

17. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный домен CD3-BD связывается с CD3 $\epsilon$ .

18. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное антитело содержит один или два домена CD3-BD, более конкретно – один домен CD3-BD.

19. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный домен CD3-BD связывается с CD3 $\epsilon$  с моновалентной константой диссоциации  $K_D$  менее 50 нмоль, конкретно – с моновалентной константой диссоциации  $K_D$  в диапазоне от 0,5 до 50 нмоль, более конкретно – в диапазоне от 1 до 40 нмоль, еще более конкретно – в диапазоне от 2 до 30 нмоль, при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

20. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором домен CD3-BD содержит

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 45, 46 и 47, соответственно, в каркасе VH антитела человека, более конкретно – в каркасе VH3, и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, в каркасе VL антитела человека, в котором каркас VL содержит каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, более конкретно – каркаса V<sub>κ</sub>1, и каркасную область FR4, выбранную из V<sub>κ</sub> FR4 и V<sub>λ</sub> FR4.

21. Мультиспецифическое антитело по п. 20, в котором домен CD3-BD содержит

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, 140, 141 или 142; и

(ii) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

22. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело дополнительно содержит по крайней мере один связывающий домен с человеческим сывороточным альбумином (hSA-BD), более конкретно – один домен hSA-BD.

23. Мультиспецифическое антитело по п. 22, в котором указанный домен hSA-BD содержит

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 53, 54 и 55, соответственно, в каркасе VH антитела человека, более конкретно – в каркасе VH3, и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 56, 57 и 58, соответственно, в каркасе VL антитела человека, в котором каркас VL содержит каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, более конкретно – каркаса V<sub>κ</sub>1, и каркасную область FR4, выбранную из каркасной области FR4 каркаса V<sub>κ</sub>, более конкретно – V<sub>κ</sub> FR4, и V<sub>λ</sub> FR4;

или

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 63, 64 и 65, соответственно, в каркасе VH антитела человека, более конкретно – в каркасе VH3, и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 66, 67 и 68, соответственно, в каркасе VL антитела человека, в котором каркас VL содержит каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, более конкретно – каркаса V<sub>κ</sub>1, а также каркасную область FR4, выбранную из каркасной области FR4 каркаса V<sub>κ</sub>, более конкретно – V<sub>κ</sub> FR4, и V<sub>λ</sub> FR4;

или



(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 63, 64 и 65, соответственно, в каркасе VH антитела человека, более конкретно – в каркасе VH3, и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 66, 67 и 68, соответственно, в каркасе VL антитела человека, в котором каркас VL содержит каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, более конкретно – каркаса V<sub>κ</sub>1, а также каркасную область FR4, выбранную из каркасной области FR4 каркаса V<sub>κ</sub>, более конкретно – V<sub>κ</sub> FR4, и V<sub>λ</sub> FR4.

24. Мультиспецифическое антитело по п. 22 или п. 23, в котором указанный домен hSA-BD содержит

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; или

(ii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или

(iii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; или

(iv) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72; или

(v) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79 или 143, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 или 144; или

(vi) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 или 145, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 или 146; или

25. Мультиспецифическое антитело по п. 24, в котором домен VH содержит аминокислотный остаток C51 (система нумерации AНo), а домен VL содержит аминокислотный остаток C141 (система нумерации AНo).

26. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанные домены связывания независимо выбраны из группы, состоящей из антигенсвязывающего фрагмента (Fab), вариабельного фрагмента (Fv), одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), стабилизированного дисульфидными связями вариабельного фрагмента (dsFv), одноцепочечного антитела (scAb) и STAB.

27. Мультиспецифическое антитело по п. 26, в котором каждый связывающий домен независимо выбран из

- (a) когнатной пары домена VL и домена VH (Fv-фрагмента); или
- (b) когнатной пары домена VL и домена VH, сцепленной с помощью олиго- или полипептидного линкера (одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv)).

28. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором мультиспецифическое антитело имеет формат, выбранный из группы, состоящей из tandemного одноцепочечного диатела (scDb, Tandab), линейного димерного одноцепочечного диатела (LD-scDb), циркулярного димерного одноцепочечного диатела (CD-scDb), tandemного одноцепочечного вариабельного фрагмента три-scFv, триотела (Fab-(scFv)<sub>2</sub>), Fab-Fv<sub>2</sub>, триотела, scDb-scFv, тетратела, ди-диатела, CODV, tandem-ди-scFv, tandem-три-scFv, Fab-(scFv)<sub>2</sub>, Fab-Fv<sub>2</sub> или CODV, слитого с N- и/или C-концами домена гетеродимеризации, за исключением гетеродимерных доменов в кристаллизующемся фрагменте (Fc), и MATCH.

29. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–28, в котором антитело не содержит области CH1 и/или CL.

30. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело имеет формат scDb-scFv, триотела, MATCH, более конкретно в котором мультиспецифическое антитело имеет формат MATCH или триотела, еще более конкретно в котором мультиспецифическое

антитело имеет формат MATCH, еще более конкретно в котором мультиспецифическое антитело имеет формат MATCH3 или MATCH4.

31. Мультиспецифическое антитело по пп. 1–30, в котором мультиспецифическое антитело представляет собой одноцепочечный белок.

32. Мультиспецифическое антитело по п. 31, в котором одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, состоящую из:

- (i) первого домена VL,
- (ii) первого полипептидного линкера,
- (iii) первого домена VH,
- (iv) второго полипептидного линкера,
- (v) второго домена VL,
- (vi) третьего полипептидного линкера, и
- (vii) второго домена VH,

расположенных друг за другом в указанном порядке,

в котором первый домен VL ассоциирован со вторым доменом VH, чтобы сформировать первый связывающий домен, а второй домен VL ассоциирован с первым доменом VH, чтобы сформировать второй связывающий домен,

и в котором одноцепочечный белок также содержит

(viii) третий связывающий домен, который сформирован с помощью третьего домена VL и третьего домена VH, соединенных через четвертый полипептидный линкер, при этом С-конец или N-конец третьего связывающих домена слит через пятый полипептидный линкер с аминокислотной последовательностью,

в котором три связывающих домена имеют следующую специфичность:

а) первый связывающий домен специфически связывается с доменом CD3 человека (CD3-BD); и

б) второй и третий домены связывания специфически связываются с мезотелином (MSLN-BD).

33. Мультиспецифическое антитело по п. 32, в котором одноцепочечный белок также содержит домен hSA-BD, который сформирован с помощью четвертого домена VL и четвертого домена VH, соединенных через шестой полипептидный линкер, при этом С-конец или N-конец домена hSA-BD слит через седьмой полипептидный линкер с аминокислотной последовательностью.

34. Мультиспецифическое антитело по пп. 1–30, в котором мультиспецифическое антитело представляет собой гетеродимерный белок, содержащий первый и второй одноцепочечные белки,

в котором первый одноцепочечный белок содержит первую аминокислотную последовательность, состоящую (от N-до С-конца) из:

- (ia) первого домена VL,
- (iia) первого полипептидного линкера, и
- (iiia) второго домена VL, и

в котором второй одноцепочечный белок содержит вторую аминокислотную последовательность, состоящую (от N-до С-конца) из:

- (ib) первого домена VH,
- (iib) второго полипептидного линкера, и
- (iiib) второго домена VH, и

в котором первый домен VL ассоциирован с первым или вторым доменом VH, чтобы сформировать первый связывающий домен, а второй домен VL ассоциирован с другим доменом VH, чтобы сформировать второй связывающий домен,

и в котором первый и/или второй одноцепочечные белки также содержат

(iv) третий связывающий домен, который сформирован с помощью третьего домена VL и третьего домена VH, соединенных через третий полипептидный линкер, при этом третий связывающий домен слит через четвертый полипептидный линкер с первой или второй аминокислотной последовательностью,

и в котором необязательно по крайней мере один из указанных первого и/или второго одноцепочечных белков также содержит

(v) четвертый связывающий домен, который сформирован с помощью четвертого домена VL и четвертого домена VH, соединенных через пятый полипептидный линкер, при этом четвертый связывающий домен слит через шестой полипептидный линкер с первой или второй аминокислотной последовательностью,

в котором три, или необязательно четыре, связывающих домена имеют следующую специфичность:

а) один связывающий домен на основе антител специфически связывается с CD3 человека (CD3-BD);

б) другие два связывающих домена на основе антител специфически связываются с мезотелином (MSLN-BD), и при наличии необязательного четвертого связывающих домена

с) оставшийся связывающий домен специфически связывается с человеческим сывороточным альбумином (hSA-BD).

35. Мультиспецифическое антитело по п. 34, в котором присутствует необязательный четвертый домен и в котором первый или второй связывающий домен представляет собой домен CD3-BD, а другой – домен hSA-BD.

36. Мультиспецифическое антитело по п. 34 или п. 35, в котором присутствует необязательный четвертый домен и в котором третий связывающий домен слит либо с первой, либо со второй аминокислотными последовательностями, а четвертый связывающий домен слит с другой из указанных двух аминокислотных последовательностей.

37. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 34–36, в котором любые связывающие домены, содержащиеся в указанном гетеродимерном белке, состоят исключительно из переменных доменов иммуноглобулина, расположенных в указанных первом и втором одноцепочечных белках.

38. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 34–37, в котором указанный гетеродимерный белок не содержит когнатную пару первого и второго доменов взаимодействия белков, за исключением первого и второго доменов VL и VH, в котором указанный первый домен взаимодействия белков содержится в указанном первом одноцепочечном белке и в котором указанный второй домен взаимодействия белков содержится в указанном втором одноцепочечном белке.

39. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 34–38, в котором указанный первый одноцепочечный белок и указанный второй одноцепочечный белок гетеродимеризуются в параллельной ориентации, *т. е.* указанный первый домен VL ассоциируется с указанным первым доменом VH, а указанный второй домен VL ассоциируется с указанным вторым доменом VH.

40. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 34–38, в котором указанный первый одноцепочечный белок и указанный второй одноцепочечный белок гетеродимеризуются во встречно-параллельной ориентации, *т. е.* указанный первый домен VL ассоциируется с указанным вторым доменом VH, а указанный второй домен VL ассоциируется с указанным первым доменом VH.

41. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 34–40, в котором

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, в

частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 89 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 89, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 90 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 90; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ



ID NO: 95 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 97 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 97, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 98 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 98; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 99 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 99, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100,

в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100;  
или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 101 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 101,  
и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 102 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 102;  
или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 103 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 103,  
и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 104 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 104;  
или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 105 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105,

в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 105,  
и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 106 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 106; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 107 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 107, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 110 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110,

в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 110;  
или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111,  
и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112;  
или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113,  
и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114;  
или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115,

в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115,  
и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 116 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 116; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 118 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 118; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 119 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 119, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 120 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120,

в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 120; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 121 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 121, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 123 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 123, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124 по крайней мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, более конкретно – содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124.

42. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором по крайней мере один из указанных переменных доменов антитела содержит CDR области, полученные из исходного антитела кролика.

43. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором по крайней мере один из доменов MSLN-BD и CD3-BD

способен одновременно связываться с соответствующими антигенами, более конкретно – в котором оба домена MSLN-BD и CD3-BD способны одновременно связываться с соответствующими антигенами.

44. MSLN-связывающий домен по любому из пп. 11–15.

45. Последовательность нуклеиновой кислоты или две последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–43 или MSLN-связывающий домен по п. 44.

46. Вектор или два вектора, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты или две последовательности нуклеиновой кислоты по п. 45.

47. Клетка-хозяин или клетки-хозяева, содержащие вектор или два вектора по п. 46.

48. Способ получения мультиспецифического антитела по любому из пп. 1–43 или MSLN-связывающего домена по п. 44, содержащий (i) предоставление последовательности нуклеиновой кислоты или двух последовательностей нуклеиновой кислоты по п. 45 или указанного вектора или двух векторов по п. 46, экспрессирование указанной последовательности нуклеиновой кислоты или последовательностей нуклеиновой кислоты, или вектора или векторов, а также сбор указанного мультиспецифического антитела или указанного MSLN-связывающего домена из экспрессионной системы, или (ii) предоставление клетки-хозяина или клеток-хозяев по п. 47, культивирование указанной клетки-хозяина или указанных клеток-хозяев; и сбор указанного мультиспецифического антитела или указанного MSLN-связывающего домена из клеточной культуры.

49. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–43 и фармацевтически приемлемый носитель.

50. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–43 для применения в лечении заболевания, более конкретно заболевания человека,

еще более конкретно заболевания человека, которое выбрано из группы, включающей в себя рак, воспалительное и аутоиммунное заболевания.

51. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–43 для применения в лечении заболевания по п. 50, в котором заболевание представляет собой рак, более конкретно рак, выбранный из мезотелиомы, рака поджелудочной железы и рака яичников.

52. Способ лечения заболевания, более конкретно заболевания человека, еще более конкретно заболевания человека, которое выбрано из группы, включающей в себя рак, воспалительное и аутоиммунное заболевания, содержащий этап введения мультиспецифического антитела по любому из пп. 1–43.

Способ по п. 52, в котором заболевание представляет собой рак, более конкретно рак, выбранный из мезотелиомы, рака поджелудочной железы и рака яичников.

### **Краткое описание чертежей**

**На фиг. 1** изображено связывание одноцепочечных Fv-фрагментов антител к мезотелину PRO1783, PRO1922, PRO1925, PRO2306, PRO2309 и эталонного антитела (аматуксимаба) с плазматической мембраной клеток из линии клеток H226, экспрессирующей высокие уровни мезотелина человека. Связывание PRO1783, PRO1922, PRO1925, PRO2306, PRO2309 и аматуксимаба с линией клеток H226 было проверено с помощью конкурентного метода ИФА. Белок L, сопряженный с пероксидазой хрена (HRP), и антитело человека к IgG, сопряженное с пероксидазой хрена, были использованы для обнаружения PRO1783, PRO1922, PRO1925, PRO2306, PRO2309 и аматуксимаба, связанных с клетками H226 при использовании конкурентного метода ИФА. Оптическая плотность ( $OD_{450-690 \text{ нм}}$ ) представлена в виде функции зависимости от концентрации антител (в нмоль). Следует отметить, что были использованы только концентрации с возрастающими значениями. Значение концентрации  $EC_{50}$  для PRO1783 примерно в 6 раз выше значения для эталонного антитела (аматуксимаба). Значения концентрации  $EC_{50}$  для PRO1925, PRO2306,



PRO2309 находятся в одном диапазоне с PRO1783, а значение концентрации  $EC_{50}$  для PRO1922 близко к значению для аматуксимаба.

**На фиг. 2** представлено связывание одноцепочечных Fv-фрагментов антител к мезотелину PRO1783 и эталонного антитела (аматуксимаба) с плазматической мембраной клеток из линии клеток CHO, экспрессирующей мезотелин макака-крабоеда. Связывание плазматической мембраны PRO1783 и аматуксимаба с линией клеток CHO, экспрессирующей мезотелин макака-крабоеда, было проверено с помощью конкуретного метода ИФА. Связывание PRO1783 и аматуксимаба было определено с помощью белка L, сопряженного с пероксидазой хрена, и антитела человека к IgG, сопряженного с пероксидазой хрена, соответственно. Оптическая плотность ( $OD_{450-690 \text{ нм}}$ ) представлена в виде функции зависимости от концентрации антител (в нмоль). Аматуксимаб и PRO1783 продемонстрировали связывание с мезотелином макака-крабоеда.

**На фиг. 3** представлена блокада взаимодействия мезотелина/муцина 16 человека с помощью одноцепочечных Fv-фрагментов антител к мезотелину PRO1783, PRO1922 и PRO1925. Эффективность PRO1783, PRO1922, PRO1925 и аматуксимаба с точки зрения блокады взаимодействия мезотелина/муцина 16 была проверена с помощью конкуретного метода ИФА. Оптическая плотность ( $OD_{450-690 \text{ нм}}$ ) представлена в виде функции зависимости от концентрации антител (в нмоль). Концентрация  $IC_{50}$  PRO1783 составила 0,5 нмоль, при этом эталонное антитело (аматуксимаб) более эффективно нейтрализовало взаимодействие мезотелина/муцина 16 ( $IC_{50} = 0,014 \text{ нмоль}$ ). PRO1925 имеет концентрацию  $IC_{50}$ , аналогичную показателю для PRO1783, при этом концентрация  $IC_{50}$  PRO1922 близка к концентрации  $IC_{50}$  аматуксимаба.

**На фиг. 4** представлены химерные варианты мезотелина человека (hMSLN)/мезотелина мыши (mMSLN). Домен, выделенный темно-серым, является сегментом последовательности мезотелина человека, замененным на соответствующую последовательность мыши. Сегмент VI соответствует части

С-конца внеклеточного домена мезотелина, расположенной ближе всего к плазматической мембране. Сегменты I и II соответствуют области I мезотелина; сегменты III и IV – области II мезотелина; а сегменты V и VI – области III мезотелина.

**На фиг. 5** показаны разные форматы MATCH. (Слева) Архитектура встречно-параллельного формата MATCH4, в котором разделенные переменные домены, формирующие гетеродимер, в каждой цепи организованы в обратном порядке «от N- к С-концу», как их когнатные переменные домены в комплементарной цепи MATCH. (Справа) Иллюстративный пример архитектуры формата scMATCH3, в котором разделенные переменные домены расположены в одиночной пептидной цепи, которые собираются в триспецифичные молекулы. Альтернативные конфигурации (например, VL2-VL1-VH1-VH2-одноцепочечный Fv-фрагмент) также подпадают под концепцию формата scMATCH3. Глицин-сериновые линкеры, которые были использованы для соединения доменов, обозначены линиями. В таблице 17 описаны домены, содержащиеся в различных полученных молекулах, и их расположение в молекулах (домены 1–4). Нумерация доменов не связана с нумерацией доменов связывания, указанной в пунктах формулы изобретения.

**На фиг. 6** представлены цитотоксическая активность и влияние на активацию Т-клеток CD8<sup>+</sup> PRO2000 и PRO1872 в присутствии человеческого сывороточного альбумина. (А) Специфическое уничтожение клеток рака с высокими уровнями экспрессии мезотелина (клеток H226). Для клеток рака с высокими уровнями экспрессии мезотелина эффективность уничтожения клеток-мишеней, полученная для PRO2000, была в 75 раз выше, чем для PRO1872. (В) Специфическое уничтожение мезотелиальных клеток с низкими уровнями экспрессии мезотелина (клеток MeT-5A). Для клеток, полученных из здоровой мезотелиальной ткани (MeT-5A; ATCC CRL-9444), с низкими уровнями экспрессии мезотелина моновалентный мезотелин-связывающий белок PRO1872 демонстрирует лучшую эффективность уничтожения. (С) Активация Т-клеток CD8<sup>+</sup> в присутствии клеток рака с высокими уровнями

экспрессии мезотелина (клеток H226), и (D) активация Т-клеток CD8<sup>+</sup> в присутствии мезотелиальных клеток с низкими уровнями экспрессии мезотелина (клеток MeT-5A). Аналогичные данные были получены для активации Т-клеток CD8<sup>+</sup>. Были использованы моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) от донора № 1. Клетки-мишени и Т-клетки CD8<sup>+</sup> были проанализированы методом проточной цитометрии через 40 ч после начала их инкубации с помощью соответствующих молекул, после чего была построена сигмоидальная 4-параметрическая логистическая кривая (GraphPad Prism).

**На фиг. 7** представлены цитотоксическая активность и влияние на активацию Т-клеток CD8<sup>+</sup> PRO2000 и PRO1872 в присутствии человеческого сывороточного альбумина. (A) Специфическое уничтожение клеток рака с высокими уровнями экспрессии мезотелина (клеток H226). Для клеток рака с низкими уровнями экспрессии мезотелина эффективность уничтожения клеток-мишеней, полученная для PRO1872, была в 7 раз выше, чем для PRO2000. (B) Специфическое уничтожение клеток рака со средними уровнями экспрессии мезотелина (клеток рака поджелудочной железы (HPAC)). Для клеток рака со средними уровнями экспрессии мезотелина моновалентные и бивалентные связующие мезотелина PRO1872 и PRO2000 продемонстрировали одинаковую эффективность уничтожения. (C) Активация Т-клеток CD8<sup>+</sup> в присутствии клеток рака с низкими уровнями экспрессии мезотелина (клеток H292), и (D) активация Т-клеток CD8<sup>+</sup> в присутствии клеток рака со средними уровнями экспрессии мезотелина (клеток рака поджелудочной железы). Аналогичные данные были получены для активации Т-клеток CD8<sup>+</sup>, за исключением того, что PRO2000 был явно более эффективным (в 4 раза) по сравнению с PRO1872 в присутствии клеток рака поджелудочной железы человека. Были использованы моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) от донора № 1. Клетки-мишени и Т-клетки CD8<sup>+</sup> были проанализированы методом проточной цитометрии через 40 ч после начала их инкубации с помощью соответствующих молекул,

после чего была построена сигмоидальная 4-параметрическая логистическая кривая (GraphPad Prism).

**На фиг. 8** показаны цитотоксическая активность и влияние на активацию Т-клеток CD8<sup>+</sup> PRO2000 и PRO1872 при отсутствии или в присутствии растворимого мезотелина (sMSLN). (A–C) Цитотоксическая активность PRO2000 и PRO1872 на клетках-мишенях H226. Специфическое уничтожение клеток H226 при отсутствии растворимого мезотелина (A), в присутствии 50 нг/мл растворимого мезотелина (B) или в присутствии 500 нг/мл растворимого мезотелина (C). Увеличение концентраций растворимого мезотелина меньше влияет на эффективность уничтожения PRO2000, чем на PRO1872 (D–F). Аналогичные данные были получены для активации Т-клеток CD8<sup>+</sup> при соответствующих условиях. Активация Т-клеток CD8<sup>+</sup> в присутствии клеток H226 без растворимого мезотелина (D), в присутствии 50 нг/мл растворимого мезотелина (E) или в присутствии 500 нг/мл растворимого мезотелина (F). Были использованы мононуклеарные клетки периферической крови от донора № 2. Клетки-мишени и Т-клетки CD8<sup>+</sup> были проанализированы методом проточной цитометрии через 40 ч после начала их инкубации с помощью соответствующих молекул, после чего была построена сигмоидальная 4-параметрическая логистическая кривая (GraphPad Prism).

**На фиг. 9** показана цитотоксическая активность PRO2000, PRO2100 и PRO1872 при отсутствии или в присутствии 100 нг/мл растворимого мезотелина: специфическое уничтожение клеток H226 при отсутствии растворимого мезотелина (A) или в присутствии 100 нг/мл растворимого мезотелина (B); Специфическое уничтожение клеток Met-5A (ATCC CRL-9444) при отсутствии растворимого мезотелина (C) или в присутствии 100 нг/мл растворимого мезотелина (D). Были использованы мононуклеарные клетки периферической крови от донора № 3. Клетки-мишени были проанализированы методом проточной цитометрии через 40 ч после начала их инкубации с помощью соответствующих молекул, после чего

была построена сигмоидальная 4-параметрическая логистическая кривая (GraphPad Prism).

**На фиг. 10** показана цитотоксическая активность PRO2562, PRO2566, PRO2567 и PRO2660 для клеток рака с высокими уровнями экспрессии мезотелина (клеток H226), клеток рака со средними уровнями экспрессии мезотелина (клеток OVCAR-3) и клеток рака с низкими уровнями экспрессии мезотелина (клеток Met-5A). В качестве отрицательного контроля («контроля») был использован паливизумаб.

**На фиг. 11** приведены общие значения концентрации  $EC_{50}$  для PRO2562, PRO2566, PRO2567, PRO2660 и моновалентного эталонного антитела PRO1872 для специфического уничтожения клеток H226 (А), специфического уничтожения клеток OVCAR3 (В, слева) и специфического уничтожения клеток Met-5A (В, справа).

**На фиг. 12** представлена цитотоксическая активность PRO2562, PRO2566, PRO2567, PRO2660 и моновалентного эталонного антитела PRO1872 для клеток H226 при отсутствии, в присутствии 50 нг/мл растворимого мезотелина или в присутствии 500 нг/мл растворимого мезотелина.

**На фиг. 13** представлены общие значения концентрации  $EC_{50}$  для PRO2562, PRO2566, PRO2567, PRO2660 и моновалентного эталонного антитела PRO1872 для специфического уничтожения клеток H226 при отсутствии, в присутствии 50 нг/мл растворимого мезотелина или в присутствии 500 нг/мл растворимого мезотелина.

**На фиг. 14** показано связывание молекул MATCH с линиями клеток-мишеней с разными уровнями мезотелина на поверхности клеток. Связывание PRO2000, PRO2100 и PRO1872 с (А) клетками H226 с высокими уровнями экспрессии мезотелина, (С) клетками рака поджелудочной железы человека со средними уровнями экспрессии мезотелина, (В) клетками рака H292 с низкими уровнями экспрессии мезотелина и (D) мезотелиальными клетками с низкими уровнями экспрессии мезотелина, MeT-5A (ATCC CRL-9444), а также связывание PRO2562, PRO2566, PRO2567 и PRO2660 с (Е) клетками H226 с

высокими уровнями экспрессии мезотелина, (F) клетками OVCAR-3 со средними уровнями экспрессии мезотелина и (G) мезотелиальными клетками, MeT-5A (ATCC CRL-9444) с низкими уровнями экспрессии мезотелина были оценены методом проточной цитометрии, при этом данные были представлены с помощью сигмоидальной 4-параметрической логистической кривой (GraphPad Prism).

**На фиг. 15** показано, что лечение с помощью молекулы PRO2000 (biMSLN.CD3) приводит к подавлению роста опухоли (ксенотрансплантатной модели H292) относительно контрольных условий. (A) Продольный анализ роста опухоли в присутствии или отсутствии лечения с помощью biMSLN.CD3. Линиями изображена медиана. Животным были подкожно имплантированы  $1 \times 10^7$  опухолевых клеток H292 и  $1 \times 10^7$  мононуклеарных клеток периферической крови, при этом лечение проводили внутривенно, начиная с 5-го дня и повторяя каждые 5 дней до конца эксперимента. (B) Данные на 40 сутки представлены в виде диаграммы разброса данных. Каждая точка соответствует одному животному, при этом данные отображаются в виде среднего и среднеквадратического отклонения. После дисперсионного анализа (ANOVA) с повторными измерениями было выполнено испытание с помощью критериев множественных сравнений Тьюки, при этом значимость каждого набора данных представлена относительно паливизумаба, используемого в качестве контроля (Ctrl, нижняя линия) или отсутствия лечения (верхняя линия). ns = незначительно; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ . Пунктирная серая линия соответствует 0 на оси Y.

**На фиг. 16** показано, что лечение с помощью молекулы PRO2000 (biMSLN.CD3) приводит к подавлению роста опухоли (ксенотрансплантатной модели рака поджелудочной железы человека) относительно контрольных условий. (A) Продольный анализ роста опухоли в присутствии увеличивающейся концентрации PRO2000 (biMSLN.CD3). Линиями изображена медиана. Животным были подкожно имплантированы  $1 \times 10^7$  клеток рака поджелудочной железы человека и  $2,5 \times 10^6$  мононуклеарных

клеток периферической крови, при этом лечение проводили внутривенно, начиная с 5-го дня и повторяя каждые 5 дней до конца эксперимента. (B) Соответствующие результаты продольного анализа роста опухоли при увеличивающихся концентрациях PRO2000 (biMSLN.CD3) и (для сравнения) при увеличивающихся концентрациях PRO1872 (MSLN.CD3). Линиями изображена медиана. Паливизумаб использовали в качестве отрицательного контроля. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ; \*\*\*\*\*,  $p < 0,00001$ . (C) Участок графика (B), на котором показаны только наименьшие дозы в зависимости от времени.

### **Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения**

Распространенными недостатками видов иммунотерапии на основе MSLN/CD3 bsAbs, известных из уровня техники, являются дозолимитирующая токсичность и ограниченная эффективность *in vivo*. В связи с этим в медицинской области существует необходимость в новых видах иммунотерапии на основе MSLN/CD3 bsAbs, которые не имеют или имеют меньшую дозолимитирующую токсичность, а также обладают более высокой эффективностью по сравнению с существующими подходами.

В настоящем изобретении предложено мультиспецифическое антитело, содержащее сочетание двух доменов связывания с мезотелином (MSLN-BD) и по крайней мере одного домена связывания с CD3 (CD3-BD), в котором аффинность связывания домена MSLN-BD с мезотелином регулируется таким образом, чтобы обеспечить эффективную локализацию в клетках-мишенях с высокими уровнями экспрессии мезотелина при меньшем влиянии на здоровые мезотелиальные клетки. Благодаря присутствию двух доменов MSLN-BD, встроенных в четко определенную и компактную мультидоменную архитектуру антитела, которая не имеет полипептидов Fc-области иммуноглобулина, в сочетании со сбалансированными аффинностями связывания с мезотелином и CD3, данные мультиспецифические антитела демонстрируют высокую эффективность в отношении мишени и вызывают слабые побочные эффекты вне опухоли. Компактная бивалентная

конфигурация мультиспецифических антител по настоящему изобретению, которая не может быть достигнута бивалентными мультиспецифическими антителами, использующими классическую архитектуру IgG, а также их отрегулированные аффинности связывания с мезотелином и CD3 являются основными признаками, позволяющими получить требуемые показатели селективности и эффективности.

Мультиспецифические антитела по настоящему изобретению способны связываться с клетками-мишенями через два домена MSLN-BD с высокой степенью зависимости от плотности антигена, используя эффект авидности. В то же время мультиспецифические антитела по настоящему изобретению способны индуцировать активацию Т-клеток и уничтожение опухолевых клеток за счет связывания с CD3 через домен CD3-BD. Благодаря улучшенной селективности для клеток с высокими уровнями экспрессии мезотелина, которая приводит к эффективной локализации опухоли, мультиспецифические антитела по настоящему изобретению позволяют проводить лечение без дозолимитирующей токсичности, вызванной неспецифической активацией Т-клеток.

Кроме того, неожиданно было обнаружено, что эффективность уничтожения клеток-мишеней с высокими уровнями экспрессии мезотелина незначительно снижается в присутствии высоких уровней растворимого мезотелина, который зачастую обнаруживается в сыворотке пациента. Кроме того, мультиспецифические антитела по настоящему изобретению, содержащие (а) два домена связывания с мезотелином/ MSLN-связывающих домена и (b) по крайней мере один домен CD3-BD, а также имеющие вышеуказанную конфигурацию и связывающую аффинность к антигену, также продемонстрировали полезные свойства, представленные в примерах и на сопроводительных чертежах. Кроме того, необязательное добавление домена антитела к hSA (человеческому сывороточному альбумину) с увеличенным периодом полужизни не только обеспечивает удобное



дозирование, но и способствует доставке молекулы в микроокружение опухоли.

Таким образом, мультиспецифические антитела по настоящему изобретению обеспечивают явные терапевтические преимущества по сравнению со стандартными составами и видами терапии.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют общепринятые значения, известные специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Термины «содержащий» и «включающий в себя» используются в настоящем документе в неограничивающем смысле, если не указано иное. Что касается таких вариантов осуществления, термин «содержащий» включает в себя более узкий термин «состоящий из».

Слова «любой» и «данный», а также аналогичные ссылки в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующих пунктов формулы изобретения) относятся к единственному и множественному числу, если иное не указано в настоящем документе или явно не противоречит контексту. Например, термин «любая клетка» включает в себя множество клеток, в т. ч. их сочетания. При использовании множественного числа для соединений, солей и т. д., подразумевается, что также может использоваться одно соединение, соль и т. д.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему:

- а) два домена связывания/связывающих домена на основе антител, которые специфически связываются с мезотелином (MSLN-BD); и
  - б) по крайней мере один домен связывания/связывающий домен на основе антител, который специфически связывается с CD3 (CD3-BD);
- в котором указанное мультиспецифическое антитело не содержит полипептид Fc-области иммуноглобулина и в котором каждый домен MSLN-BD связывается с мезотелином (MSLN) с моновалентной константой диссоциации

( $K_D$ ) в диапазоне от 0,1 до 20 нмоль, измеренной методом SPR (поверхностного плазмонного резонанса).

Термин «антитело» и его аналог, как указано в настоящем документе, включает в себя полные антитела или их одиночные цепи; и любой антигенсвязывающий фрагмент (*т. е.* «антигенсвязывающую часть») или его одиночные цепи; и молекулы, содержащие CDRs антител, области VH или области VL (в частности, мультиспецифические антитела). Встречающееся в природе «полное антитело» представляет собой гликопротеин, состоящий по крайней мере из двух тяжелых (H) и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно – VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно – VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена: CL. Области VH и VL могут быть также разделены на области гипервариабельности, так называемые «определяющие комплементарность области (CDRs)», перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, так называемые «каркасные области (FRs)». Каждая область VH и VL состоит из трех CDRs и четырех FRs, расположенных от аминных концов до карбоксильных концов в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат домен связывания/связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями-хозяевами или факторами-хозяевами, включая разные клетки иммунной системы (*например*, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классического пути комплемента.

Термин «Fc-область иммуноглобулина», используемый в настоящем документе, относится к доменам CH2 и CH3 константных областей тяжелой цепи.

Термины «домен связывания», «его антигенсвязывающий фрагмент», «антигенсвязывающая часть» антитела и аналогичные термины, используемые в настоящем документе, относятся к одному или нескольким фрагментам интактного антитела, которое сохраняет способность специфически связываться с определенным антигеном (*например*, MSLN, CD3, hSA). Антигенсвязывающие функции антитела могут выполняться фрагментами интактного антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления домен связывания мультиспецифического антитела по настоящему изобретению выбирается из группы, состоящей из Fab-фрагмента, моновалентного фрагмента, состоящего из доменов VL, VH, CL и CH1; F(ab)2-фрагмента, бивалентного фрагмента, содержащего два Fab-фрагмента, сцепленных с помощью дисульфидного мостика в шарнирной области; Fd-фрагмента, состоящего из доменов VH и CH1; Fv-фрагмента, состоящего из доменов VL и VH одного плеча антитела; фрагмента однодоменного антитела (dAb) (Ward et al., 1989 г., Nature 341:544-546), который состоит из домена VH; выделенной определяющей комплементарность области (CDR), одноцепочечного Fv-фрагмента, стабилизированного дисульфидными связями переменного фрагмента (dsFv), одноцепочечного антитела (scAb), STAB, однодоменного антитела (sdAb или dAb), однодоменного антитела тяжелой цепи и однодоменного антитела легкой цепи, VHH, VNAR, однодоменных антител на основании структуры VNAR акулы, а также доменов связывания на основании альтернативных каркасов, в частности, доменов на основе анкирина, финомеров, авимеров, антикалинов, фибронектинов, а также сайтов связывания, встроенных в константные области антител (*например*, технология f-star (Modular Antibody Technology™ компании F-star)). Таким образом, домен связывания по настоящему изобретению представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) или одиночный переменный домен антитела. В предпочтительном варианте осуществления домен связывания по настоящему изобретению представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). В соответствии с частными

вариантами осуществления два переменных домена антигенсвязывающего фрагмента, как в Fv- или scFv-фрагменте, стабилизируются с помощью междоменной дисульфидной связи, в котором, в частности, домен VH содержит один цистеиновый остаток в позиции 51 (система нумерации АНо), а домен VL содержит один цистеиновый остаток в позиции 141 (система нумерации АНо).

Термин «определяющие комплементарность области» («CDRs») относится к аминокислотным последовательностям с границами, определенными с помощью любого номера известных схем, описанных, в частности, Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD («Kabat» numbering scheme); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 («Chothia» numbering scheme); ImMunoGenTics (IMGT) numbering (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)) («IMGT» numbering scheme); и схема нумерации, описанная у Honegger & Plückthun, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670 («АНо» нумерация). Например, для классических форматов по Kabat аминокислотные остатки CDR в переменном домене тяжелой цепи (VH) имеют номера 31–35 (HCDR1), 50–65 (HCDR2) и 95–102 (HCDR3); а аминокислотные остатки CDR в переменном домене легкой цепи (VL) имеют номера 24–34 (LCDR1), 50–56 (LCDR2) и 89–97 (LCDR3). По Chothia аминокислоты CDR в VH имеют номера 26–32 (HCDR1), 52–56 (HCDR2) и 95–102 (HCDR3); а аминокислотные остатки в VL имеют номера 24–34 (LCDR1), 50–56 (LCDR2) и 89–97 (LCDR3). Путем комбинирования определений CDR по Kabat и Chothia CDRs состоят из аминокислотных остатков 26–35 (HCDR1), 50–65 (HCDR2) и 95–102 (HCDR3) в VH человека и аминокислотных остатков 24–34 (LCDR1), 50–56 (LCDR2) и 89–97 (LCDR3) в VL человека. По схеме IMGT аминокислотные остатки CDR в VH имеют приблизительные номера 26–35 (HCDR1), 51–57 (HCDR2) и 93–102 (HCDR3), а аминокислотные остатки CDR в VL имеют приблизительные номера 27–32 (LCDR1), 50–52 (LCDR2) и 89–97 (LCDR3) (нумерация по

Kabat). По схеме IMGT CDRs антитела могут быть определены с помощью программы IMGT/DomainGap Align.

В контексте настоящего изобретения используется система нумерации, предложенная Honegger & Plückthun («АНо») (Honegger & Plückthun), J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670), если явно не указано иное. В частности, следующие остатки определяются как CDRs по схеме нумерации АНо: LCDR1 (также называемый – CDR-L1): L24-L42; LCDR2 (также называемый – CDR-L2): L58-L72; LCDR3 (также называемый – CDR-L3): L107-L138; HCDR1 (также называемый – CDR-H1): H27-H42; HCDR2 (также называемый – CDR-H2): H57-H76; HCDR3 (также называемый – CDR-H3): H108-H138. Для ясности система нумерации по Honegger & Plückthun учитывает разнообразие длин, обнаруженное во встречающихся в природе антителах, в разных подсемействах VH и VL и, более конкретно в CDRs, а также предусматривает наличие разрывов в последовательностях. Таким образом, в заданном переменном домене антитела обычно не все позиции 1–149 будут заняты аминокислотным остатком.

Термин «специфичность связывания», используемый в настоящем документе, относится к способности отдельного антитела реагировать с одной антигенной детерминантой, а не с другой антигенной детерминантой. Термин «специфически связывается с» или «специфический для», используемый в настоящем документе, относится к измеряемым и воспроизводимым взаимодействиям (например, к связыванию между мишенью и антителом), которое является определяющим с точки зрения наличия мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, антитело, которое специфически связывается с мишенью (которая может представлять собой эпитоп), является антителом, которое связывает данную мишень с большей аффинностью, авидностью легче и/или дольше, чем при связывании с другими мишенями. В более общем виде (без конкретной ссылки) «специфическое связывание» относится к способности антитела различать мишень, представляющую интерес, и

неподходящую молекулу, как указано, например, в анализе специфичности, известном из уровня техники. Подобные анализы, в частности, включают в себя вестерн-блоттинг (Western blots), иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA), электрохемилюминесцентный метод (ECL), количественный радиоиммуноанализ (IRMA), поверхностный плазмонный резонанс (SPR) и пептидное сканирование. Например, можно выполнить стандартный иммуноферментный анализ (ELISA). Оценка может быть выполнена с помощью стандартного цветного проявления (*например*, с помощью вторичного антитела с пероксидазой хрена и тетраметилбензидина с перекисью водорода). Реакция в определенных лунках оценивается на основании оптической плотности, например, при 450 нм. Типичное фоновое значение (= отрицательная реакция) может составлять около 0,1 OD; типичная положительная реакция может составлять около 1 OD. Это означает, что соотношение между положительным и отрицательным значениями может быть равно 10 или больше. В дополнительном примере может быть выполнен анализ методом SPR, в котором соотношение между фоновым значением и сигналом, указывающим на специфическое связывание, равно по крайней мере 10, более конкретно – по крайней мере 100. Обычно определение специфичности связывания выполняется не с помощью одной меченой молекулы, а с помощью набора из трех–пяти молекул, не представляющих интерес, например, сухого молока, трансферрина и т. д.

Таким образом, антитело по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело. Термин «выделенное антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое является практически свободным от других антител, имеющих разные антигенные специфичности (*например*, выделенное антитело, которое специфически связывает мезотелин и CD3, практически не имеет антител, которые специфически связывают антигены, отличные от мезотелина и CD3, а выделенное антитело, которое специфически связывает мезотелин, CD3 и человеческий сывороточный альбумин, практически не имеет антител, которые специфически связывают

антигены, отличные от мезотелина, CD3 и человеческого сывороточного альбумина). Более того, выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Таким образом, антитело по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело. Термин «моноклональное антитело» или «композиция на основе моноклональных антител», используемый в настоящем документе, относится к антителам, практически идентичным аминокислотной последовательности или полученным из того же генетического источника. Композиция на основе моноклональных антител показывает специфичность связывания и аффинность к определенному эпитопу или специфичность связывания и аффинность к специфическим эпитопам.

Антитела по настоящему изобретению включают в себя, в частности, химерные антитела, антитела человека и гуманизированные антитела.

Термин «химерное антитело» (или его антигенсвязывающий фрагмент) представляет собой молекулу антитела (или его антигенсвязывающий фрагмент), в которой (а) константная область или ее часть изменена, перемещена или заменена таким образом, чтобы антигенсвязывающий сайт (вариабельная область) был сцеплен с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функции и/или вида или с абсолютно другой молекулой, которая добавляет новые свойства химерному антителу (*например*, фермент, токсин, гормон, фактор роста, лекарственный препарат и т. д.); или в которой (b) вариабельная область (или ее часть) изменяется, перемещается или заменяется на вариабельную область, имеющую другую или измененную специфичность антигена. Например, антитело мыши может быть модифицировано путем замены его константной области на константную область из иммуноглобулина человека. Благодаря замене на константную область человека химерное антитело может сохранить свою специфичность при распознавании антигена, имея уменьшенную антигенность у человека по сравнению с оригинальным антителом мыши.

Термин «антитело человека» (или его антигенсвязывающий фрагмент), используемый в настоящем документе, включает в себя антитела (и их антигенсвязывающие фрагменты), имеющие переменные области, в которых каркасные и CDR области получены из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, данная константная область также была получена из таких человеческих последовательностей (*например*, человеческих последовательностей зародышевого типа или мутированных версий человеческих последовательностей зародышевого типа). Антитела человека и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не закодированные с помощью человеческих последовательностей (*например*, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*). Данное определение антитела человека специфически исключает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки, не являющиеся человеческими. Антитела человека можно продуцировать с помощью разных техник, известных из уровня техники, включая фаг-дисплейную библиотеку (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol, 227:381 (1991); Marks et al, J. Mol. Biol, 222:581 (1991)). Также для подготовки моноклональных антител человека можно использовать способы, описанные у Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al, J. Immunol, 147(1):86-95 (1991). См. также van Dijk и van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol, 5: 368-74 (2001). Антитела человека можно получить путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано так, чтобы продуцировать такие антитела в ответ на стимуляцию антигеном, но чьи эндогенные локусы были деактивированы, *например*, иммунизированная ксеномышь (см., *например*, патенты США № 6075181 и 6150584 в отношении технологии XENOMOUSE™). См. также, *например*, Li et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) в



отношении антител человека, образованных посредством технологии на основе В-клеточной гибридомы человека.

«Гуманизированное» антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), используемое согласно настоящему документу, представляет собой антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), которое сохраняет реактивность антитела, не являющегося человеческим, и является менее иммуногенным для людей. Этого можно достичь, например, путем сохранения CDR областей и замены остальных частей антитела на их аналоги человеческого происхождения (*т. е.* константную область и каркасные части вариабельной области). Дополнительные модификации каркасных областей могут быть выполнены в каркасных последовательностях человека, а также в CDR последовательностях, которые были получены из зародышевых линий других видов млекопитающих. Гуманизированные антитела по настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не закодированные с помощью человеческих последовательностей (*например*, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*, или консервативное замещение для улучшения стабильности или производства). См., *например*, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; и Padlan, Molec. Immun., 31: 169-217, 1994. Другие примеры технологий генетической инженерии включают в себя, в частности, технологию Хома, раскрытую в патенте США № 5766886.

Термин «рекомбинантное гуманизированное антитело», используемый в настоящем документе, включает в себя все антитела человека, которые были подготовлены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, например, антитела, выделенные из клетки-хозяина, преобразованного так, чтобы экспрессировать гуманизированные антитела (*например*, из трансфектомы), и антитела, которые были подготовлены,

экспрессированы, созданы или выделены другими средствами, которые подразумевают сплайсинг последовательностей всего гена иммуноглобулина человека или его части с другими последовательностями ДНК.

Таким образом, антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. Таким образом, антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным и содержит CDRs, которые были получены от кролика.

Термин «мультиспецифическое антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое связывается с двумя или более разными эпитопами по крайней мере в двух или более разных мишенях (*например*, MSLN и CD3). Термин «мультиспецифическое антитело» включает в себя биспецифическое, триспецифическое, тетраспецифическое, пентаспецифическое и гексаспецифическое антитело. Термин «биспецифическое антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое связывается с двумя разными эпитопами по крайней мере в двух разных мишенях (*например*, MSLN и CD3). Термин «триспецифическое антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое связывается с тремя разными эпитопами по крайней мере в трех разных мишенях (*например*, MSLN, CD3 и hSA).

Термин «эпитоп» обозначает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул (*например*, боковых цепей аминокислот или сахара) и имеют специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. «Конформационные» и «линейные» эпитопы различаются тем, что связывание с первыми (но не со вторыми) теряется в присутствии денатурирующих растворителей.

Термин «конформационный эпитоп», используемый в настоящем документе, относится к аминокислотным остаткам антигена, которые

собираются вместе на поверхности, когда полипептидная цепь складывается для образования нативного белка.

Термин «линейный эпитоп» относится к эпитопу со всеми точками взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (например, антителом), которое происходит линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка (непрерывно).

Термин «распознать», используемый в настоящем документе, относится к антигенсвязывающему фрагменту антитела, который находит и взаимодействует (*например*, связывается) с конформационным эпитопом.

Используемый в настоящем документе термин «аффинность» относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном на отдельных антигенных сайтах. В каждом антигенном сайте переменная область «плеча» антитела взаимодействует через небольшие силы ковалентной связи с антигеном на некоторых сайтах; при этом чем сильнее такое взаимодействие, тем выше аффинность.

Термин «аффинность связывания» относится общей силе нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (*например*, антителом) и его партнером по связыванию (*например*, антигеном). Если не указано иное, в настоящем документе термины «аффинность связывания», «связываются с», «связывается с» или «связывание с» относятся к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (*например*, между фрагментом антитела и антигеном). Аффинность молекулы X для ее партнера Y может быть представлена с помощью константы диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность может быть измерена с помощью стандартных способов, известных из уровня техники, включая описанные в настоящем документе. Обычно антитела с низкой аффинностью медленно связывают и легко диссоциируют антигены, а антитела с высокой аффинностью обычно связывают антигены быстрее и дольше остаются связанными. Из уровня техники известно множество способов измерения аффинности связывания, любой из которых можно использовать для целей

настоящего изобретения. Ниже описаны конкретные и специфические иллюстративные варианты для измерения аффинности связывания, *т. е.* силы связывания.

Термин «Kassoc», «Ka» или «Kon», используемый в настоящем документе, относится к скорости ассоциации определенного взаимодействия антитело-антиген, а термин «Kdis», «Kd» или «Koff», используемый в настоящем документе, относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. В одном варианте осуществления термин «K<sub>D</sub>», используемый в настоящем документе, относится к константе диссоциации, равной отношению Kd к Ka (*т. е.* Kd/Ka), и выражается в виде молярной концентрации (M). В одном варианте осуществления настоящего изобретения «K<sub>D</sub>», «значение K<sub>D</sub>», «KD» или «значение KD» измеряется методом поверхностного плазмонного резонанса. Аффинность к рекомбинантному мезотелину человека (MSLN человека) и рекомбинантному *Cynomolgus* MSLN (*Cynomolgus* MSLN) была определена с помощью измерений методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как указано в параграфе [0168]. Аффинность к рекомбинантному CD3 человека была измерена методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как указано в параграфе [0196].

Таким образом, мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является бивалентным для специфичности MSLN (мезотелина).

Таким образом, мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является моновалентным, бивалентным или мультивалентным для специфичности CD3. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является бивалентным для специфичности CD3. В предпочтительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является моновалентным для специфичности CD3.

Термин «мультивалентное антитело» относится к одной связывающей молекуле, имеющей несколько валентностей, где «валентность» описывается

как количество антигенсвязывающих фрагментов, которое связано с эпитопами в идентичных молекулах-мишенях. Таким образом, одиночная связывающая молекула может связываться с несколькими сайтами связывания в мишени-молекуле. Примеры мультивалентных антител включают в себя, в частности, бивалентные антитела, тривалентные антитела, тетравалентные антитела, пентавалентные антитела и т. д.

Термин «моновалентное антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое связывается с одиночным эпитопом в мишени-молекуле, например, с CD3. Также термин «домен связывания» или «моновалентный домен связывания», используемый в настоящем документе, относится к домену связывания, который связывается с одиночным эпитопом в мишени-молекуле, например, с CD3.

Термин «бивалентное антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое связывается с двумя эпитопами в двух идентичных мишенях-молекулах, например, в мишенях-молекулах мезотелина.

Два домена MSLN-BD мультиспецифических антител по настоящему изобретению связываются с любой областью внеклеточной части мезотелина, например, с областью I, областью II и/или областью III MSLN. Предпочтительно, чтобы два домена MSLN-BD мультиспецифических антител по настоящему изобретению связывались с областью I и/или областью II MSLN, более конкретно – с областью I MSLN. Область I является частью MSLN, расположенной на наибольшем расстоянии от поверхности клетки, к которой прикреплен MSLN.

Два домена MSLN-BD мультиспецифических антител по настоящему изобретению связывают одинаковые или разные эпитопы в мишенях-молекулах MSLN. Предпочтительно, чтобы два домена MSLN-BD мультиспецифических антител по настоящему изобретению связывали одинаковые эпитопы в мишенях-молекулах MSLN. Термин «одинаковый эпитоп», используемый в настоящем документе, относится к отдельным

белковым детерминантам в одном белке, способном обеспечить специфическое связывание с антителом, где данные отдельные белковые детерминанты являются идентичными, т. е. состоят из идентичных химически активных поверхностных группировок молекул (например, боковых цепей аминокислот или сахара), имеющих идентичные характеристики трехмерной структуры, а также идентичные характеристики заряда. Термин «разный эпитоп», используемый в настоящем документе в отношении специфического белка-мишени, относится к отдельным белковым детерминантам в одном белке, способном обеспечить специфическое связывание с антителом, где данные отдельные белковые детерминанты не являются идентичными, т. е. состоят из неидентичных химически активных поверхностных группировок молекул (например, боковых цепей аминокислот или сахара), имеющих разные характеристики трехмерной структуры, а также разные характеристики заряда. Данные разные эпитопы могут быть перекрывающимися или неперекрывающимися.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что, например, триспецифические молекулы (biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA) PRO2000, PRO2562, PRO2565, PRO2566 и PRO2567 способны уничтожать клетки-мишени, уровень экспрессии MSLN которых примерно в 7 раз выше, чем у здоровых клеток Met-5A (ATCC CRL-9444), используя метод проточной цитометрии, при высокой эффективности и концентрации EC<sub>50</sub>, которая по крайней мере в 25 раз меньше, чем концентрация EC<sub>50</sub> для уничтожения клеток Met-5A, используя анализ цитотоксичности Т-клеток по отношению к клеткам-мишеням и клеткам Met-5A (см., например, таблицу 31). Таким образом, хотя PRO2000, PRO2562, PRO2566 и PRO2567 имеют очень высокую эффективность уничтожения клеток-мишеней с высокими уровнями экспрессии MSLN, их эффективность уничтожения здоровых клеток гораздо ниже, что указывает на потенциально широкое терапевтическое окно для лечения с помощью PRO2000, PRO2562, PRO2566 и PRO2567. С другой стороны, уровни эффективности триспецифической эталонной молекулы

PRO1872 ( $\text{MSLN}_{\text{низкая KD}} \times \text{CD3xhSA}$ ), которая содержит один домен MSLN-BD, аффинность связывания ( $K_D$ ) которого более чем в 5 раз превышает показатель домена MSLN-BD для PRO2000, PRO2562, PRO2566 и PRO2567, с точки зрения уничтожения клеток-мишеней с высокими уровнями экспрессии MSLN и здоровых клеток Met-5A не имеют существенных различий. Это указывает на значительное расширение терапевтического окна для применения мультиспецифических антител по настоящему изобретению при лечении больных раком. Более того, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что значения концентрации  $\text{EC}_{50}$  триспецифических молекул PRO2000, PRO2562, PRO2566 и PRO2567 ( $\text{biMSLN}_{\text{высокая KD}} \times \text{CD3xhSA}$ ) с точки зрения уничтожения клеток-мишеней, уровень экспрессии MSLN которых почти в 7 раз выше, чем у здоровых клеток Met-5A, согласно результатам проточной цитометрии, не увеличиваются более чем в 6 раз в присутствии 50 нг/мл растворимого мезотелина и не увеличиваются более чем в 40 раз в присутствии 500 нг/мл растворимого мезотелина согласно результатам анализа цитотоксичности Т-клеток по отношению к клеткам-мишеням. С другой стороны, значение концентрации  $\text{EC}_{50}$  триспецифической эталонной молекулы PRO1872 ( $\text{MSLN}_{\text{низкая KD}} \times \text{CD3xhSA}$ ) для уничтожения клеток-мишеней увеличилась почти в 8 раз в присутствии 50 нг/мл растворимого мезотелина и более чем в 75 раз – в присутствии 500 нг/мл растворимого мезотелина. Таким образом, высокая эффективность уничтожения триспецифических молекул PRO2000, PRO2562, PRO2566 и PRO2567 в отношении клеток-мишеней с высокими уровнями экспрессии MSLN лишь в незначительной степени зависит от высоких концентраций растворимого мезотелина. С другой стороны, эффективность уничтожения триспецифических молекул PRO2000, PRO2562, PRO2566 и PRO2567 в отношении здоровых клеток также снижается в присутствии высокой концентрации растворимого мезотелина (sMSLN) (данные не показаны), что указывает на то, что терапевтическое окно для их клинического применения дополнительно расширяется в присутствии sMSLN. Это важный вывод,

поскольку в плазме пациентов часто наблюдаются высокие уровни растворимого мезотелин-родственного белка (SMRP). Изобретатели обнаружили аналогичные предпочтительные результаты с точки зрения эффективности активации Т-клеток CD8+ PRO2000. Вышеуказанные результаты являются даже более неожиданными, поскольку *a priori* нельзя было спрогнозировать, что все четыре домена связывания останутся функциональными без стерического или иного ингибирования друг друга в сложной ситуации с множеством мишеней и клеток.

Домены MSLN-BD, подходящие для применения в мультиспецифическом антителе по настоящему изобретению, представляют собой домены связывания, представленные в настоящем изобретении. Мезотелин- BDs по настоящему изобретению включают в себя, в частности, гуманизированные домены связывания с мезотелином или MSLN-связывающие домены, последовательности которых представлены в таблице 1.

CD3-BDs, подходящие для применения в мультиспецифическом антителе по настоящему изобретению, представляют собой домены связывания, приведенные в настоящем изобретении. CD3-BDs по настоящему изобретению включают в себя, в частности, гуманизированные домены связывания с CD3 или CD3-связывающие домены, последовательности которых представлены в таблице 3.

Таким образом, мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению имеет две разные специфичности (MSLN и CD3). Таким образом, мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело, являющееся бивалентным для MSLN. Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может содержать дополнительную специфичность (триспецифическое антитело) или специфичности (тетраспецифическое, пентаспецифическое или гексаспецифическое антитело). В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело является биспецифическим (MSLN и CD3). В



другом варианте осуществления мультиспецифическое антитело является триспецифическим (MSLN, CD3 и hSA).

Таким образом, антитело по настоящему изобретению не содержит полипептида Fc-области иммуноглобулина.

Для увеличения количества специфичностей/функциональностей при том же или меньшем молекулярном весе предпочтительно использовать антитела, содержащие фрагменты антитела, например, Fv-, Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты и другие фрагменты антитела. Такие меньшие молекулы сохраняют антигенсвязывающую активность полного антитела, а также могут иметь улучшенное проникновение в ткань и фармакокинетические свойства по сравнению с полными молекулами иммуноглобулина. Хотя подобные фрагменты обладают рядом преимуществ по сравнению с цельными иммуноглобулинами, они также страдают от повышенной скорости клиренса из сыворотки, поскольку у них отсутствует Fc-домен, который обеспечивает длительный период полужизни в естественных условиях *in vivo* (Medasan et al., 1997, J. Immunol. 158:2211-2217). Молекулы с меньшим молекулярным весом эффективнее проникают в ткани-мишени (например, солидный рак) и, следовательно, могут быть более эффективными при аналогичной или меньшей дозе.

Изобретатели неожиданно обнаружили, что добавление домена связывания с человеческим сывороточным альбумином (hSA-BD) к мультиспецифическому антителу по настоящему изобретению не мешает способности других доменов связывания связываться с другими соответствующими мишенями. Это является даже более неожиданным результатом, поскольку *a priori* нельзя было спрогнозировать, что все четыре домена связывания останутся функциональными без стерического или иного ингибирования друг друга в сложной ситуации с множеством мишеней и клеток *in vivo*.

Таким образом, мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может содержать дополнительный домен связывания, имеющий

специфичность к человеческому сывороточному альбумину. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело содержит: (i) два MSLN-BD; (ii) по крайней мере один CD3-BD; и (iii) по крайней мере один hSA-BD.

Термин «hSA» относится, в частности, к человеческому сывороточному альбумину, идентификационный номер в базе данных UniProt: P02768. Человеческий сывороточный альбумин (hSA) представляет собой обильный белок массой 66,4 кДа в сыворотке человека (50 % от общего количества белка), состоящий из 585 аминокислот (Sugio, Protein Eng, том 12, 1999, 439-446). Многофункциональный hSA белок связан с его структурой, что обеспечивает связывание и транспортировку нескольких метаболитов, включая жирные кислоты, ионы металлов, билирубин и некоторые лекарственные препараты (Fanali, Molecular Aspects of Medicine, том 33, 2012, 209-290). Концентрация hSA в сыворотке составляет около 3,5-5 г/дл. Альбуминсвязывающие антитела и их фрагменты можно использовать, например, для увеличения периода полужизни лекарственных препаратов или белков, конъюгированных с ними, в сыворотке *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления hSA-BD получают из моноклонального антитела или фрагмента антитела.

hSA- BDs, подходящие для применения в мультиспецифическом антителе по настоящему изобретению, представляют собой домены связывания, указанные в настоящем изобретении. hSA- BDs по настоящему изобретению включают в себя, в частности, гуманизированные домены связывания с hSA или hSA-связывающие домены, последовательности которых представлены в таблице 4.

В частности, hSA- BDs по настоящему изобретению специфически связываются с человеческим сывороточным альбумином.

Другой hSA-BD, подходящий для применения в мультиспецифическом антителе по настоящему изобретению, содержит или получается из антитела, выбранного из группы, состоящей из: (i) полипептидов, которые связывают

сывороточный альбумин (см., например, Smith et al., 2001, Bioconjugate Chem. 12:750-756; EP0486525; US6267964; WO 2004/001064; WO 2002/076489; и WO 2001/45746); (ii) одиночных переменных доменов связывания антител к сывороточному альбумину, описанных в Holt et al., Protein Engineering, Design & Selection, vol 21, 5, pp283-288, WO 2004/003019, WO 2008/096158, WO 2005/118642, WO 2006/0591056 и WO 2011/006915; (iii) антител к сывороточному альбумину, описанных в WO 2009/040562, WO 2010/035012 и WO 2011/086091.

Другие переменные домены по настоящему изобретению включают в себя мутировавшие аминокислотные последовательности, остающиеся идентичными по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов в CDR областях по сравнению с CDR областями, как показано в последовательностях, представленных в таблицах 1, 3 и 4. Другие переменные домены по настоящему изобретению включают в себя мутировавшие аминокислотные последовательности, в которых по сравнению с CDR областями, которые представлены в последовательности из таблиц 1, 3 и 4, мутировало не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в CDR областях.

Таким образом, домены VH связывающих доменов по настоящему изобретению принадлежат семейству VH3 или VH4. В одном варианте осуществления домен связывания по настоящему изобретению содержит домен VH, принадлежащий семейству VH3. В контексте настоящего изобретения термин «принадлежащий к семейству VHx (или семейству VLx)» означает, что каркасные последовательности FR1–FR3 демонстрируют высочайшую степень гомологии с семейством VHx (или VLx соответственно). Примеры семейств VH и VL приведены в Knappik et al., J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86, или в WO 2019/057787. Конкретный пример домена VH, принадлежащего семейству VH3, представлен с помощью последовательности SEQ ID NO: 129, а конкретный пример домена VH, принадлежащего семейству VH4, представлен с помощью последовательности SEQ ID NO: 130. В частности, каркасные области FR1–

FR3, взятые из последовательности SEQ ID NO: 129, принадлежат семейству VH3 (таблица 7, области, обозначенные нежирным шрифтом). Таким образом, домен VH, принадлежащий семейству VH3 по настоящему документу, представляет собой домен VH, содержащий каркасные области FR1–FR3, которые идентичны последовательности SEQ ID NO: 129 по крайней мере на 85 %, более конкретно – по крайней мере на 90 %, еще более конкретно – по крайней мере на 95 %. Альтернативные примеры последовательностей VH3 и примеры последовательностей VH4 приведены в Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296 (2000) 57-86, или в WO 2019/057787. Таким образом, hSA-BD по настоящему изобретению содержит каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, более конкретно – каркаса V<sub>κ</sub>1 или V<sub>κ</sub>3, более конкретно – каркасные области FR1–3 каркаса V<sub>κ</sub>1, а также каркасную область FR4, выбранную из каркасной области FR4 каркаса V<sub>κ</sub> и каркасной области FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, более конкретно – каркасную область FR4 каркаса V<sub>λ</sub>. Подходящие каркасные области FR1–3 каркаса V<sub>κ</sub>1 и иллюстративная каркасная область FR4 каркаса V<sub>λ</sub> указаны в последовательности SEQ ID NO: 131 (таблица 7, каркасные области FR обозначены нежирным шрифтом). Альтернативные примеры последовательностей V<sub>κ</sub>1 и примеры последовательностей V<sub>κ</sub>2, V<sub>κ</sub>3 или V<sub>κ</sub>4 приведены в Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296 (2000) 57-86. Подходящие каркасные области FR1–3 каркаса V<sub>κ</sub>1 содержат аминокислотные последовательности, которые идентичны аминокислотным последовательностям, соответствующим каркасным областям FR1–3, по крайней мере на 70, 80, 90, 95 процентов и взяты из последовательности SEQ ID NO: 131 (таблица 7, каркасные области FR обозначены нежирным шрифтом). Подходящие каркасные области FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, как указано ниже в последовательности SEQ ID NO: 132–138 и 139, содержащие одиночный цистеиновый остаток, в частности, когда второй одиночный цистеин присутствует в соответствующей цепи VH, более конкретно – в позиции 51 (система нумерации AНo) цепи VH, для формирования междоменной дисульфидной связи. В одном варианте осуществления домены VL по

настоящему изобретению содержат каркасные области FR4 каркаса VL идентичны аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 132–139, более конкретно – из последовательностей SEQ ID NO: 132 и 139, по крайней мере на 70, 80, или 90 процентов.

Домены связывания по настоящему изобретению содержат домен VH, указанный в таблицах 1, 3 и 4. Таким образом, домен связывания по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность VH, указанную в одной из таблиц 1, 3 и 4, в котором не более 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, в последовательности, которая не является определяющей комплементарность областью) было мутировано (при этом в качестве неограничивающего примера мутация является добавлением, заменой или удалением). Таким образом, домен связывания по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность VH, указанную в одной из таблиц 1, 3 и 4, в котором не более 15 аминокислот, более конкретно – не более 10 аминокислот, еще более конкретно – не более 5 аминокислот, в каркасной последовательности (например, в последовательности, которая не является определяющей комплементарность областью) было мутировано (при этом в качестве неограничивающего примера мутация является добавлением, заменой или удалением). Другие домены связывания по настоящему изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но являются по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичными в областях VH областям VH, изображенным в соответствующих последовательностях, описанных в одной из таблиц 1, 3 и 4, включая домены VH, содержащие по крайней мере позиции 5–140 (система нумерации АНо), более конкретно – по крайней мере позиции 3–145 одной из последовательностей, изображенных в таблицах 1, 3 и 4.

В частности, домен связывания по настоящему изобретению содержит домен VL, указанный в одной из таблиц 1, 3 и 4. Таким образом, домен связывания по настоящему изобретению содержит аминокислотную

последовательность VL, указанную в одной из таблиц 1, 3 и 4, в котором не более 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, в последовательности, которая не является определяющей комплементарность областью) было мутировано (при этом в качестве неограничивающего примера мутация является добавлением, заменой или удалением). Таким образом, домен связывания по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность VL, указанную в одной из таблиц 1, 3 и 4, в котором не более 15 аминокислот, более конкретно – не более 10 аминокислот, еще более конкретно – не более 5 аминокислот, в каркасной последовательности (например, в последовательности, которая не является определяющей комплементарность областью) было мутировано (при этом в качестве неограничивающего примера мутация является добавлением, заменой или удалением). Другие домены связывания по настоящему изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но являются по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичными в областях VL области VL, изображенной в последовательностях, описанных в одной из таблиц 1, 3 и 4, включая домены VL, содержащие по крайней мере позиции 5–140 (система нумерации АНо), более конкретно – по крайней мере позиции 3–145 одной из последовательностей, изображенных в таблицах 1, 3 и 4.

В контексте настоящего изобретения термин «домен связывания по настоящему изобретению» относится к самому домену связывания, *т. е.* не зависит от мультиспецифического контекста, и, в частности, относится к домену связывания, содержащемуся в мультиспецифической конструкции (например, к одному из доменов связывания, содержащихся в биспецифической, триспецифической или тетраспецифической конструкции).

Таким образом, домен связывания по настоящему изобретению выбирают из группы, состоящей из антигенсвязывающего фрагмента (Fab), вариабельного фрагмента (Fv), одноцепочечного вариабельного фрагмента

(scFv), стабилизированного дисульфидными связями переменного фрагмента (dsFv), одноцепочечного антитела (scAb) и STAB.

Таким образом, домен связывания по настоящему изобретению представляет собой фрагмент антитела scFv.

Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может иметь любой подходящий формат.

Таким образом, домены связывания мультиспецифического антитела являются функционально сцепленными. Домены связывания мультиспецифического антитела по настоящему изобретению способны одновременно связываться с соответствующими антигенами или рецепторами. Термин «одновременно», используемый в данной связи, относится к одновременному связыванию с по меньшей мере одним из MSLN-BD и CD3-BD. В отдельных случаях (например, для клеток-мишеней с высокой плотностью мезотелина на поверхности клетки) также одновременно может быть связано три домена связывания, *т. е.* два MSLN-BD и CD3-BD.

Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит два MSLN-BD и по крайней мере один CD3-BD, в котором оба указанных MSLN-BD и указанный CD3-BD функционально сцеплены друг с другом.

Термин «функционально сцепленный», используемый в настоящем документе, указывает на то, что две молекулы (*например*, полипептиды, домены, домены связывания) сцеплены таким образом, чтобы сохранять свою функциональную активность. Две молекулы могут быть «функционально сцепленными», если они сцеплены напрямую или опосредованно (*например*, через линкер, через фрагмент, через линкер с фрагментом). Термин «линкер» относится к пептидному или иному фрагменту, который необязательно расположен между доменами связывания или фрагментами антитела по настоящему изобретению. Для создания ковалентной связи между молекулами существует несколько стратегий. Сюда, в частности, можно отнести полипептидные связи между N- и C-концами белков или белковых доменов, связь через дисульфидные связи, а также связь через химические

перекрестносшивающие реагенты. В одном аспекте настоящего варианта осуществления линкер представляет собой пептидную связь, созданную с помощью рекомбинантных технологий или пептидного синтеза. Выбор линкера, подходящего для конкретного случая, в котором необходимо соединить две полипептидные цепи, зависит от различных параметров, включая, в частности, особенности двух полипептидных цепей (*например*, выполнение олигомеризации естественным путем), расстояние между соединяемыми N- и C-концами (если известно) и/или устойчивость линкера к протеолизу и окислению. Кроме того, линкер может содержать аминокислотные остатки, обеспечивающие гибкость.

В контексте настоящего изобретения термин «полипептидный линкер» относится к линкеру, состоящему из цепи аминокислотных остатков, сцепленных с помощью пептидных связей, которые соединяют два домена, каждый из которых сцеплен с одним концом линкера. Полипептидный линкер должен иметь длину, достаточную для сцепления двух молекул таким образом, чтобы они обеспечивали правильную конформацию относительно друг друга для сохранения требуемой активности. В частных вариантах осуществления полипептидный линкер имеет непрерывную цепь из 2–30 аминокислотных остатков (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных остатков). Более того, аминокислотные остатки, выбранные для включения в полипептидный линкер, должны обладать свойствами, не влияющими в значительной степени на активность полипептида. Таким образом, в целом линкерный пептид не должен обладать зарядом, не соответствующим активности полипептида или мешающим внутреннему фолдингу, образованию связей или другому взаимодействию с аминокислотными остатками в одном или нескольких мономерах, которые будут серьезно препятствовать связыванию доменов мономера рецептора. В частных вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой неструктурированный полипептид. Полезные линкеры включают в себя



глицин-сериновые (GS) линкеры. Под «глицин-сериновыми» («GS») линкерами подразумеваются полимер глицинов и серинов, расположенных последовательно (включая, например, (Gly-Ser)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub>, (GGGGS)<sub>n</sub> и (GGGS)<sub>n</sub>, где n – целое число, по крайней мере, равное одному), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, такие как связь для шейкерного калиевого канала, а также множество других гибких линкеров, очевидных для специалистов в данной области техники. Во-первых, глицин-сериновые полимеры являются предпочтительным вариантом, поскольку обе данные аминокислоты являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут быть использованы в качестве нейтральной связи между компонентами. Во-вторых, серин является гидрофильным и, следовательно, может растворять то, что может быть глобулярной глициновой цепью. В-третьих, аналогичные цепи показали эффективность при соединении субъединиц рекомбинантных белков, например, одноцепочечных антител.

Таким образом, мультиспецифическое антитело имеет формат, выбранный из любого подходящего мультиспецифического (*например*, по крайней мере биспецифического) формата, известного из уровня техники, который не содержит Fc-область (области) иммуноглобулина, включая, в частности, форматы на основе tandemного одноцепочечного диатела (Tandab, тандаб), линейного димерного одноцепочечного диатела (LD-scDb), циркулярного димерного одноцепочечного диатела (CD-scDb), tandemного одноцепочечного вариабельного фрагмента три-scFv, триотела (Fab-(scFv)<sub>2</sub>), Fab-Fv<sub>2</sub>, триотела, scDb-scFv, тетратела, ди-диатела, CODV, tandem-ди-scFv, tandem-три-scFv, Fab-(scFv)<sub>2</sub>, Fab-Fv<sub>2</sub>, или CODV, слитого с N- и/или C-концами домена гетеродимеризации, за исключением гетеродимерных доменов в кристаллизующемся фрагменте (Fc), и MATCH (см. WO 2016/0202457; Egan T. et al., MABS 9 (2017) 68-84) и DuoBodies (биспецифические IgG, подготовленные с помощью технологии Duobody) (MAbs. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212. doi: 10.1080/19420862.2016.1268307).

Наиболее подходящим является мультиспецифическое антитело, представляющее собой одноцепочечное диатело (scDb)-scFv или MATCH.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению не содержит областей CH1 и/или CL.

В другом варианте осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению имеет формат, выбранный из перечня, состоящего из scDb-scFv и триотела. Особенно подходящим для применения в данном случае является scDb-scFv, более конкретно – в котором один из указанного MSLN-BD и указанного CD3-BD представлены в форме scDb, а второй MSLN-BD представляет собой scFv, функционально сцепленный с указанным scDb.

Термин «диатела» относится к фрагментам антитела с двумя антигенсвязывающими сайтами, фрагменты которых содержат область VH, соединенную с областью VL в одной полипептидной цепи (VH–VL). С помощью линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами в одной цепи, домены принудительно спаривают с комплементарными доменами другой цепи для создания двух антигенсвязывающих сайтов. Диатела могут быть бивалентными или биспецифическими. Более подробно диатела описаны, например, в EP 404 097, WO 93/01161, в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003), и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Триотела и тетратела также описаны в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Биспецифическое scDb, более конкретно – биспецифическое мономерное scDb, которое, в частности, содержит два переменных домена тяжелой цепи (VH) или их фрагменты и два переменных домена легкой цепи (VL) или их фрагменты, соединенные линкерами L1, L2 и L3 в следующем порядке: VHA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VLA, VHA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VLA, VLA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VHA, VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA, VHB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VLB, VHB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VLB, VLB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VHB или VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB, в котором домены VLA и VHA совместно

образуют антигенсвязывающий сайт для первого антигена, а VLB и VHB – антигенсвязывающий сайт для второго антигена.

Линкер L1, в частности, представляет собой пептид из 2–10 аминокислот, более конкретно – из 3–7 аминокислот, еще более конкретно – из 5 аминокислот, а линкер L3, в частности, представляет собой пептид из 1–10 аминокислот, более конкретно – из 2–7 аминокислот, еще более конкретно – из 5 аминокислот. В частных вариантах осуществления линкер L1 и/или L3 содержит одну или две единицы из четырех (4) глициновых аминокислотных остатков и одного (1) серинового аминокислотного остатка (GGGGS)<sub>n</sub>, в котором n = 1 или 2, более конкретно – n = 1.

Средний линкер L2, в частности, представляет собой пептид из 10–40 аминокислот, более конкретно – из 15–30 аминокислот, еще более конкретно – из 20–25 аминокислот. В частных вариантах осуществления линкер L2 содержит одну или несколько единиц из четырех (4) глициновых аминокислотных остатков и одного (1) серинового аминокислотного остатка (GGGGS)<sub>n</sub>, в котором n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, более конкретно – n = 4.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой scDb-scFv. Термин «scDb-scFv» относится к формату антитела, в котором одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) слит с помощью гибкого Gly-Ser- линкера с одноцепочечным диателом (scDb). В одном варианте осуществления гибкий Gly-Ser линкер представляет собой пептид из 2–40 аминокислот, *например*, из 2–35, 2–30, 2–25, 2–20, 2–15, 2–10 аминокислот, более конкретно – из 10 аминокислот. В частных вариантах осуществления линкер содержит одну или несколько единиц из четырех (4) глициновых аминокислотных остатков и одного (1) серинового аминокислотного остатка (GGGGS)<sub>n</sub>, в котором n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, более конкретно – n = 2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению имеет формат MATCH, описанный в WO 2016/0202457; Egan T. et al., MABS 9 (2017) 68-84.

В частности, в настоящем варианте осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению имеет формат MATCH3 или MATCH4.

Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может быть получено с помощью любого удобного способа производства антител, известного из уровня техники (см., *например*, Fischer, N. & Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3–14, в отношении продуцирования биспецифических конструкций; Hornig, N. & Färber-Schwarz, A., Methods Mol. Biol. 907 (2012) 713–727, и WO 99/57150, в отношении биспецифических диател и тандемных одноцепочечных Fv-фрагментов). Конкретные примеры подходящих способов подготовки биспецифической конструкции по настоящему изобретению также включают в себя, в частности, технологии Genmab (см. Labrijn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110 (2013) 5145–5150) и Merus (см. de Kruif et al., Biotechnol. Bioeng. 106 (2010) 741–750). Из уровня техники также известны способы продуцирования биспецифических антител, содержащих Fc-область функционального антитела (см., *например*, Zhu et al., Cancer Lett. 86 (1994) 127–134); и Suresh et al., Methods Enzymol. 121 (1986) 210–228).

Данные способы обычно включают в себя генерацию моноклональных антител, например, путем слияния клеток миеломы с клетками селезенки мыши, которая была иммунизирована с помощью предпочтительного антигена с помощью гибридомной технологии (см., *например*, Yokoyama et al., Curr. Protoc. Immunol. глава 2, раздел 2.5, 2006) или с помощью инженерии рекомбинантных антител (клонирование репертуара или фагового/дрожжевого дисплея) (см., *например*, Chames & Baty, FEMS Microbiol. Letters 189 (2000) 1–8), а также комбинирование антигенсвязывающих доменов, их фрагментов или частей из двух или более разных моноклональных антител, чтобы создать биспецифические или мультиспецифические конструкции с помощью известных технологий клонирования молекул.

Мультиспецифические молекулы по настоящему изобретению могут быть подготовлены с помощью конъюгирования составных специфичностей связывания, используя способы, известные из уровня техники. Например, каждая специфичность связывания биспецифичной молекулы может быть сгенерирована отдельно, а затем конъюгирована с другой. Если специфичности связывания представляют собой белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать различные сопрягающие или перекрестносшивающие агенты. Примеры перекрестносшивающих агентов включают в себя белок А, карбодимид, N-сукцинимидил-5-ацетил-тиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)-циклогаксан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, M A et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Другие способы описаны в Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. № 78, 118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83), и Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Конъюгирующие агенты (SATA и сульфос-SMCC) можно получить в Pierce Chemical Co. (Рокфорд, 111).

Если специфичности связывания представляют собой антитела, они могут быть конъюгированы с помощью сульфгидрильной связи шарнирных областей С-концов двух тяжелых цепей. В частном варианте осуществления шарнирная область модифицирована таким образом, чтобы перед конъюгацией содержать нечетное количество сульфгидрильных остатков (например, один).

В качестве альтернативы две или более специфичности связывания могут быть закодированы в одном векторе, а также экспрессированы и собраны в одной клетке-хозяине. Данный способ особенно полезен, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок mAb X mAb, mAb X Fab, Fab X F (ab')<sub>2</sub> или лиганд X Fab. Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может представлять собой одноцепочечную

молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечное мультиспецифическое антитело, содержащее две связывающие детерминанты. Мультиспецифическое антитело может содержать по крайней мере две одноцепочечные молекулы. Способы подготовки мультиспецифических антител и молекул описаны, например, в патенте США № 5 260 203; патенте США № 5 455 030; патенте США № 4 881 175; патенте США № 5 132 405; патенте США № 5 091 513; патенте США № 5 476 786; патенте США № 5 013 653; патенте США № 5 258 498; и патенте США № 5 482 858.

Связывание мультиспецифических антител с их специфическими мишенями может быть подтверждено, например, с помощью иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммунного анализа (REA), флуоресцентного сортирования (FACS), биологического анализа (*например*, подавления роста) или вестерн-блоттинга. Каждый из данных способов анализа обычно обнаруживает присутствие представляющих интерес комплексов белок-антитело с помощью меченого реактива (*например*, антитела), специфического для представляющего интерес комплекса.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению, его фрагмент или домены связывания. Такие последовательности нуклеиновой кислоты можно оптимизировать с точки зрения экспрессии в клетках млекопитающих.

Термин «нуклеиновая кислота» используется в настоящем документе в качестве синонима термина «полинуклеотид (полинуклеотиды)» и относится к одному или нескольким дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Данный термин включает в себя нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные каркасные остатки или связи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, имеют такие же свойства связывания, что и эталонная нуклеиновая кислота, и

метаболизированы аналогично эталонным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают в себя, в частности, фосфоротриоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидилнуклеиновые кислоты (PNAs). Если не указано иное, определенная нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению также потенциально охватывает ее консервативно модифицированные варианты (*например*, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также точно указанную последовательность. В частности, как подробно будет указано ниже, замен вырожденных кодонов можно достигнуть, генерируя последовательности, в которых третья позиция одного или нескольких (или всех) выбранных кодонов заменена смешанными основаниями и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; и Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

В настоящем изобретении представлены практически очищенные молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды, содержащие сегменты или домены мультиспецифического антитела, описанного выше. При экспрессии из соответствующих экспрессирующих векторов полипептиды, закодированные данными молекулами нуклеиновых кислот, могут проявлять антигенсвязывающую способность или способности мультиспецифического антитела по настоящему изобретению.

Также в настоящем изобретении представлены полинуклеотиды, которые кодируют по крайней мере одну CDR область (обычно все три CDR области) доменов связывания мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, как указано в таблицах 1, 3 и 4. Из-за вырожденности кода различные последовательности нуклеиновых кислот будут кодировать каждую из аминокислотных последовательностей иммуноглобулина.

Полинуклеотидные последовательности можно получить с помощью твердофазного синтеза ДНК *de novo* или ПЦР мутагенеза существующей последовательности (*например*, последовательностей, описанных ниже в

разделе «Примеры»), кодирующей мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению, его фрагменты или домены связывания. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно выполнить с помощью способов, известных из уровня техники, например, с помощью фосфотриэфирного метода Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90; фосфодиэфирного метода Brown et al., Meth. Enzymol. 68: 109, 1979; диэтилфосфорамидитного метода Beaucage et al., Tetra. Lett., 22: 1859, 1981; и метода с использованием твердой подложки из патента США № 4 458 066. Введение мутаций в полинуклеотидную последовательность с помощью ПЦР можно выполнить, как описано, *например*, в PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification), H. A. Erlich (Ed.)), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; and Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

Также в настоящем изобретении представлены экспрессирующие векторы и клетки-хозяева для продуцирования мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, его фрагментов или доменов связывания.

Термин «вектор» относится к полинуклеотидной молекуле, способной переносить другой полинуклеотид, с которым она сцеплена. Один тип вектора представляет собой «плазмид», который относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которой могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут были лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны выполнять автономную репликацию в клетке-хозяине, в которую они вводятся (*например*, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (*например*, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть введены в



геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, тем самым, реплицированы вместе с геномом хозяина.

Более того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально сцеплены. В настоящем документе такие векторы называют «рекомбинантными экспрессирующими векторами» (или просто – «экспрессирующими векторами»). В общем случае в технологиях рекомбинантных ДНК экспрессирующие векторы по настоящему изобретению зачастую представлены в форме плазмидов. В настоящем описании термины «плазмид» и «вектор» являются взаимозаменяемыми, поскольку плазмид зачастую используется в форме вектора. Однако настоящее изобретение включает в себя другие формы экспрессирующих векторов, в т. ч. вирусные векторы (*например*, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы с дефективной репликацией), которые выполняют эквивалентные функции. В данном контексте термин «функционально сцепленный» относится к функциональным связям между двумя (или более) полинуклеотидными (*например*, ДНК) сегментами. Обычно он относится к функциональным связям регуляторной последовательности транскрипции с транскрибированной последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально сцеплена с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой экспрессионной системе. В общем случае промоторные транскрипционные регуляторные последовательности, функционально сцепленные с транскрибируемой последовательностью, физически граничат с транскрибируемой последовательностью, *т. е.* они являются цис-действующими. Однако некоторые транскрипционные регуляторные последовательности (*например*, энхансеры) необязательно должны физически граничить или располагаться в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, чью транскрипцию они усиливают.

Различные экспрессирующие векторы могут быть использованы для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи мультиспецифического антитела или связывающие фрагменты. Вирусные и невирусные экспрессирующие векторы можно использовать для продуцирования антител в клетке-хозяине млекопитающих. Невирусные векторы и системы включают в себя плазмиды, эписомные векторы, обычно с экспрессионной кассетой для экспрессии белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см., *например*, Harrington et al., Nat Genet. 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, являющиеся полезными с точки зрения экспрессии полинуклеотидов и полипептидов связывания с мезотелином в клетках млекопитающих (*например*, человека), включают в себя векторы pThioHis A, B и C, pcDNA3,1/His, pEBVHis A, B и C, (Invitrogen, San Diego, Calif.), MPS V, а также некоторые другие векторы, известные из уровня техники, которые используются для экспрессии других белков. Полезные вирусные векторы включают в себя векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторов на основе SV40, вирусов папилломы, вируса Эпштейна-Барр НВР, векторы на основе вируса осповакцины и вируса леса Семлики (Semliki Forest virus, SFV). См. Brent et al., *supra*; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., Cell 68: 143, 1992.

Выбор экспрессирующего вируса зависит от целевых клеток-хозяев, в которых должен быть экспрессирован вектор. Обычно экспрессирующие векторы содержат промоторные и другие регуляторные последовательности (*например*, энхансеры), функционально сцепленные с полинуклеотидами, кодирующими цепь или фрагмент мультиспецифического антитела. В одном варианте осуществления индуцируемый промотор используют для предотвращения экспрессии добавленных последовательностей, за исключением условий индуцирования. Индуцируемые промоторы включают в себя, *например*, арабинозу, lacZ, металлотioneиновый промотор или промотор теплового шока. Культуры трансформированных организмов могут

быть расширены в неиндуцируемых условиях (не при условиях индуцирования) без смещения популяции для кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. Помимо промоторов, другие регуляторные элементы также могут являться необходимыми или желательными с точки зрения эффективной экспрессии цепи мультиспецифического антитела или фрагмента. Данные элементы включают в себя иницирующий кодон ATG и соседний сайт связывания рибосомы или иные последовательности. Более того, эффективность экспрессии может быть улучшена путем включения энхансеров, соответствующих используемой клеточной системе (см., *например*, Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20: 125, 1994; и Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Например, энхансер SV40 или CMV можно использовать для увеличения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

Экспрессирующие векторы также могут обеспечивать положение последовательности сигнала секреции для формирования слитого белка с полипептидами, закодированными с помощью вставленного мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, его фрагментов или доменов связывания. Более того, встроенные последовательности мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, его фрагментов или доменов связывания являются сцепленными с сигнальными последовательностями перед встраиванием в вектор. Векторы, используемые для приема последовательностей, кодирующих домены связывания переменных доменов легких и тяжелых цепей мультиспецифического антитела, иногда также кодируют константные области или их части.

Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») относится к клетке, в которую был введен рекомбинантный экспрессирующий вирус. Следует иметь в виду, что данные термины могут относиться не только к указанной клетке, но и к потомству такой клетки. Поскольку определенные модификации могут быть внесены в последующие поколения в связи с мутацией или влиянием окружающей среды, такое потомство может

фактически не быть идентичным родительской клетке, но на них может распространяться термин «клетка-хозяин», используемый в настоящем документе.

Клетки-хозяева для экспрессии мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, его фрагментов или доменов связывания могут быть прокариотическими или эукариотическими. *E. coli* – прокариотическая клетка-хозяин, используемая для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие подходящие для использования микробные клетки-хозяева включают в себя бациллы, например, *сенную палочку (Bacillus subtilis)*, и другие энтеробактерии, например, сальмонеллы (*Salmonella*), серратию (*Serratia*) и различные виды синегнойной палочки (*Pseudomona*). В данных прокариотических хозяевах также можно создать экспрессирующие векторы, которые обычно содержат последовательности контроля экспрессии, совместимые с клетками-хозяевами (*например, с точкой начала репликации*). Более того, будет присутствовать любое количество разных известных промоторов, например, промоторная система лактозы, промоторная система триптофана (*trp*), промоторная система бета-лактамазы или промоторная система из фага лямбды. Промоторы обычно управляют экспрессией (необязательно с помощью операторной последовательности) и имеют последовательности сайта связывания рибосомы и т. д., для инициирования и завершения транскрипции и трансляции. Другие микробы, такие как дрожжи, также могут использоваться для экспрессии мезотелин-связывающих полипептидов по настоящему изобретению. Также можно использовать клетки насекомых в сочетании с бакуловирусными векторами.

В одном варианте осуществления клетки-хозяева млекопитающих используются для экспрессии и продуцирования (получения) мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, его фрагментов или доменов связывания. Например, они могут представлять собой линию гибридомных клеток, экспрессирующую гены эндогенного иммуноглобулина,

или линию клеток млекопитающих, экспрессирующую экзогенный экспрессирующий вирус. Сюда относятся нормальные моральные или нормальные или ненормальные immortalized клетки животных или человека. Например, было получено несколько подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая линии клеток CHO, различные линии клеток Cos, клетки HeLa, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование клеточной культуры тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов описано, *например*, в Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Экспрессирующие векторы для клеток-хозяев млекопитающих могут включать в себя последовательности контроля экспрессии, например, точку начала репликации, промотор и энхансер (см., *например*, Queen, et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986), и необходимые сайты для обработки информации, сайты связывания рибосомы, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования, а также последовательности терминаторов транскрипции. Данные экспрессирующие векторы обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, клеточно-типоспецифическими, стадийспецифическими и/или регулируемые или индуцибельными. Полезные промоторы включают в себя, в частности, металлотионеиновый промотор, конститутивный аденовирусный главный поздний промотор, промотор MMTV, индуцируемый дексаметазоном, промотор SV40, промотор MRP pol III, конститутивный промотор MPS V, промотор CMV, индуцируемый тетрациклином (*например*, немедленно-ранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV, а также сочетания промоторов и энхансеров, известные из уровня техники.

Способы введения экспрессирующих векторов, содержащих полинуклеотидные последовательности, которые представляют интерес, меняются в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекция

хлорида кальция обычно используется для прокариотических клеток, при этом лечение фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеток-хозяев (см. Sambrook, et al., supra). Другие способы включают в себя, *например*, электропорацию, лечение фосфатом кальция, липосомно-опосредованную трансформацию, инъекцию и микроинъекцию, баллистические методы, виросомы, иммунолипосомы, поликатионные конъюгаты нуклеиновой кислоты, депротеинизированную ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком вируса герпеса VP22 (Elliot и O'Hare, Cell 88:223, 1997), поглощение ДНК, усиленное агентами, а также трансдукцию *ex vivo*. Для продолжительного высокоэффективного продуцирования рекомбинантных белков зачастую предпочтительной может быть стабильная экспрессия. Например, линии клеток, которые стабильно экспрессируют мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению, его фрагменты или домены связывания, можно подготовить с помощью экспрессирующих векторов по настоящему изобретению, которые содержат вирусные точки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и селектируемый маркерный ген. После введения вектора клеткам можно дать вырасти в течение 1–2 суток в обогащенной среде до того, как они будут перемещены в селективную среду. Целью селектируемого маркера является придание резистентности к селекции, при этом его наличие обеспечивает рост клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности в селективной среде. Резистентные стабильно трансфицированные клетки могут размножаться с помощью технологий культивирования тканей, соответствующих типу клетки. Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ получения антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, в котором способ содержит этап культивирования клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом экспрессируется антитело по настоящему изобретению или его фрагмент.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу продуцирования мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, его домена связывания или фрагмента, при этом данный способ содержит этап культивирования клетки-хозяина, экспрессирующей нуклеиновую кислоту, кодирующую мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению, его домен связывания или фрагмент. В частности, настоящее изобретение относится к способу продуцирования мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, его домена связывания или фрагмента, данный способ содержит (i) предоставление последовательности нуклеиновой кислоты или двух последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению или его домен связывания, или вектора или двух векторов, кодирующих мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению или его домен связывания, экспрессирование указанной последовательности или последовательностей нуклеиновой кислоты, или указанного вектора или векторов, и сбор указанного мультиспецифического антитела или указанного домена связывания из экспрессионной системы, или (ii) предоставление клетки-хозяина или клеток-хозяев, экспрессирующих нуклеиновую кислоту, кодирующую мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению или его домен связывания, культивирование указанной клетки-хозяина или указанных клеток-хозяев; а также сбор указанного мультиспецифического антитела или указанного домена связывания из клеточной культуры.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители улучшают или стабилизируют композицию, или упрощают получение композиции. Фармацевтически приемлемые носители включают в себя растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические

вещества и замедляющие абсорбцию вещества, и аналогичные физиологически совместимые вещества.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть введена различными способами, известными из уровня техники. Путь и/или способ введения зависит от желаемых результатов. Введение может быть внутривенным, внутримышечным, внутривнутрибрюшинным или подкожным, или может выполняться рядом с мишенью. Фармацевтически приемлемый носитель должен быть приемлемым для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (*например*, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное вещество, *т. е.* мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению, может быть покрыто материалом для защиты вещества от воздействия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать это вещество.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть подготовлены в соответствии со способами, широко используемыми и известными из уровня техники. См., *например*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; и Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Предпочтительно, чтобы фармацевтические композиции производились в соответствии с правилами GMP. Обычно в фармацевтических композициях по настоящему изобретению используется терапевтически эффективная доза или эффективная доза мультиспецифического антитела по настоящему изобретению. Мультиспецифические антитела по настоящему изобретению вводят в фармацевтически приемлемые лекарственные формы с помощью стандартных способов, известных из уровня техники. Схемы приема регулируются таким образом, чтобы достичь оптимального ответа (*например*, терапевтического ответа). Например, можно вводить одноразовую дозу, несколько отдельных доз (в течение определенного времени) или дозу, пропорционально



уменьшенную или увеличенную в соответствии с терапевтической ситуацией. С точки зрения простоты введения и однородности дозирования наиболее предпочтительным является создание композиции для парентерального введения в единичной лекарственной форме. Единичная лекарственная форма, используемая в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, подходящих в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного вещества, рассчитанное с точки зрения достижения желаемого терапевтического эффекта с требуемым фармацевтическим носителем.

Фактические уровни дозирования активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут быть изменены для получения количества активного ингредиента, которое является эффективным с точки зрения достижения желательного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без токсического воздействия на пациента. Выбранный уровень дозирования зависит от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению или их эфиров, солей или амидов, путь введения, время введения, скорость экскреции конкретных используемых соединений, продолжительность лечения, другие лекарственные препараты, соединения и/или вещества, используемые в сочетании с конкретными композициями, возраст, пол, массу тела, состояние, общее состояние здоровья, медицинский анамнез пациента и т. д.

Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению обычно вводится несколько раз. Интервалы между единичными дозировками могут составлять одну неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть неодинаковыми и зависеть от измеренного уровня мультиспецифического антитела по настоящему изобретению в крови пациента. В качестве альтернативы мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может быть введено в виде состава с замедленным высвобождением, в результате чего периодичность введения может быть увеличена. Дозирование

и частота зависят от периода полужизни антитела у пациента. В общем случае гуманизированные антитела демонстрируют больший период полужизни, чем химерные антитела и антитела, не являющиеся человеческими. Дозирование и частота введения могут различаться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении относительно низкую дозу вводят с увеличенным интервалом в течение длительного времени. Некоторые пациенты продолжают проходить лечение до конца жизни. При терапевтическом применении иногда требуется относительно высокая доза с меньшими интервалами до замедления болезни или выздоровления, предпочтительно до того, как пациент начнет демонстрировать частичное или полное уменьшение интенсивности симптомов заболевания. После этого пациент сможет перейти на профилактический режим.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В подходящем варианте осуществления настоящего изобретения предложено мультиспецифическое антитело или фармацевтическая композиция для применения в лечении пролиферативного заболевания, в частности рака, у нуждающегося в этом субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено мультиспецифическое антитело или фармацевтическая композиция для применения в производстве лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания, в частности рака.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции для лечения пролиферативного заболевания, в частности рака, у нуждающегося в этом субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции в

производстве лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания, в частности рака, у нуждающегося в этом субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, содержащему введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по настоящему изобретению. В подходящем варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пролиферативного заболевания, в частности рака, у субъекта, содержащему введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по настоящему изобретению.

Термин «субъект» включает в себя человека и нечеловекоподобных животных. Нечеловекоподобные животные включают в себя всех позвоночных, *например*, млекопитающих и немлекопитающих, в т. ч. нечеловекообразных приматов, овец, собак, коров, цыплят, амфибий и рептилий. Если не указано иное, термины «пациент» и «субъект» являются взаимозаменяемыми.

Термины «лечение», «лечить», «вылеченный» и т. д., используемые в настоящем документе, относятся к достижению желательного фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения от заболевания и/или нежелательного явления, характерного для заболевания, или замедления прогрессирования заболевания. Термин «лечение», используемый в настоящем документе, относится к любому лечению заболевания у млекопитающих (*например*, у людей) и включает в себя: (a) подавление заболевания, *т. е.* остановку его развития; и (b) избавление от заболевания, *т. е.* регрессию заболевания.

Термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к количеству агента, введение которого млекопитающему или другому субъекту для лечения заболевания является достаточным для излечения от такого заболевания. «Терапевтически

эффективное количество» зависит от агента, заболевания и его степени тяжести, возраста, массы тела и т. д. субъекта, проходящего лечение.

В одном варианте осуществления пролиферативное заболевание представляет собой рак. Термин «рак» относится к заболеванию, для которого характерен быстрый и неконтролируемый рост аберрантных клеток. Клетки рака могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Термины «опухоль» и «рак» являются взаимозаменяемыми, *например*, оба термина охватывают солидный рак или опухоль, *например*, диффузные или циркулирующие опухоли. Термин «рак» или «опухоль», используемый в настоящем документе, включает в себя предзлокачественные и злокачественные рак и опухоли. Термин «рак» используется в настоящем документе для обозначения широкого спектра опухолей, включая все солидные опухоли и опухоли жидких тканей (гематологические злокачественные опухоли). Примерами таких опухолей являются, в частности: доброкачественные или особенно – злокачественные опухоли, солидные опухоли, рак головного мозга, рак почки, рак печени, рак надпочечников, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желудка (*например*, опухоли желудка), рак пищевода, рак яичников, рак шейки матки, рак кишечника, рак прямой кишки, рак простаты, рак поджелудочной железы, рак легких (*например*, немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого), рак влагалища, рак щитовидной железы, меланома (*например*, нерезектабельная или метастатическая меланома), почечноклеточный рак, саркома, глиобластома, множественная миелома или рак желудочно-кишечного тракта, особенно – рак толстой кишки или колоректальная аденома, опухоль шеи и головы, рак эндометрия, синдром Каудена, болезнь Лермитта-Дюкло, синдром Банаяна-Зонана, увеличение предстательной железы, неоплазия, особенно – эпителиального характера, предпочтительно – карцинома молочной железы или плоскоклеточная карцинома, хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз (*например*, положительный по филадельфийской хромосоме хронический миелоидный лейкоз), острый

лимфобластный лейкоз (*например*, положительный по филадельфийской хромосоме острый лимфобластный лейкоз), неходжкинская лимфома, плазмноклеточная миелома, ходжкинская лимфома, лейкемия и любое их сочетание. В предпочтительном варианте осуществления рак выбирается из группы, включающей в себя мезотелиому, рак поджелудочной железы и рак яичников.

Мультиспецифическое антитело или композиция по настоящему изобретению подавляет рост солидных опухолей, а также опухолей жидких тканей. В другом варианте осуществления пролиферативное заболевание представляет собой солидную опухоль. Термин «солидная опухоль», в частности, относится к раку молочной железы, раку яичников, раку кишечника, раку прямой кишки, раку предстательной железы, раку желудка (*например*, опухоли желудка), раку шейки матки, раку легких (*например*, немелкоклеточному раку легкого и мелкоклеточному раку легкого), а также опухоли шеи и головы. Кроме того, в зависимости от типа опухоли и конкретных используемых комбинаций может быть достигнуто уменьшение объема опухоли. Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению или композиция по настоящему изобретению также подходит для предотвращения метастазирования опухолей и роста или развития микрометастаз у субъекта, болеющего раком.

**Перечень последовательностей (мутации обозначены в соответствии с системой нумерации AНo, CDRs обозначены в соответствии с системой Numab)**

**Таблица 1. Примеры MSLN доменов связывания с низкой аффинностью по настоящему изобретению**

| SEQ ID NO: | Область антитела                                             | Последовательность                                                                                                                |
|------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | HCDR1 <sub>54-01-G02</sub>                                   | GFSLSSYAMG                                                                                                                        |
| 2          | HCDR2 <sub>54-01-G02</sub>                                   | YISTINNTYYASWAKG                                                                                                                  |
| 3          | HCDR3 <sub>54-01-G02</sub>                                   | REIRSGWVDYGFSI                                                                                                                    |
| 4          | LCDR1 <sub>54-01-G02</sub>                                   | QASQNIYSNLA                                                                                                                       |
| 5          | LCDR2 <sub>54-01-G02</sub>                                   | DASDLAS                                                                                                                           |
| 6          | LCDR3 <sub>54-01-G02</sub>                                   | QQVRSSSDIDNP                                                                                                                      |
| 7          | VH <sub>54-01-G02-sc01</sub> (PRO1783)                       | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMGWVRQAPGKG<br>LEWIGYISTINNTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLRAEDT<br>AVYYCAREIRSGWVDYGFSIWGQGTLVTVSS  |
| 8          | VH <sub>54-01-G02-sc01_N66A</sub> (54-01-G02-sc03) (PRO2197) | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMGWVRQAPGKG<br>LEWIGYISTIANNTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLRAEDT<br>AVYYCAREIRSGWVDYGFSIWGQGTLVTVSS |
| 9          | VL <sub>54-01-G02-sc01</sub> (PRO1783 и PRO2197)             | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYSNLAWYQQKPGKAPKL<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVRS<br>SSDIDNPFGTGTVTLG              |
| 10         | HCDR2 <sub>54-01-G02 N66A</sub>                              | YISTIANNTYYASWAKG                                                                                                                 |
| 11         | HCDR1 <sub>54-32-A07</sub>                                   | GFSLSSYAMG                                                                                                                        |
| 12         | HCDR2 <sub>54-32-A07</sub>                                   | YISKIGTTYASWAKG                                                                                                                   |
| 13         | HCDR3 <sub>54-32-A07</sub>                                   | RGSSSGGYLDDGFDP                                                                                                                   |
| 14         | LCDR1 <sub>54-32-A07</sub>                                   | QASQSIISNYLA                                                                                                                      |
| 15         | LCDR2 <sub>54-32-A07</sub>                                   | DASDLAS                                                                                                                           |

|    |                                                          |                                                                                                                                    |
|----|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16 | LCDR3 54-32-A07                                          | QQVYDSNNVENV                                                                                                                       |
| 17 | VH 54-32-A07-sc02 (PRO1925)                              | QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGL<br>EYIGYISKIGTTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA<br>VYFCARGSSSGGYLDDGFDPPWGQGT LTVSS |
| 18 | VL 54-32-A07-sc02 (PRO1925)                              | ALQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYD<br>SNNVENVFGTGTKVTVLG            |
| 19 | VH 54-32-A07-sc06 (PRO2306)                              | QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGL<br>EYIGYISKIGTTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA<br>VYFCARGSSSGGYLDDGFDPPWGQGT LTVSS |
| 20 | VH 54-32-A07-sc06_(L12R, V103T,<br>L144Q)                | QSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGL<br>EYIGYISKIGTTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA<br>TYFCARGSSSGGYLDDGFDPPWGQGTQVTVSS |
| 21 | VL 54-32-A07-sc06_(S14R, T22K,<br>T87R) (PRO2306)        | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYD<br>SNNVENVFGTGTKVTVLG            |
| 22 | VH 54-32-A07-sc09_(G51C)<br>(PRO2309)                    | QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKCL<br>EYIGYISKIGTTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA<br>VYFCARGSSSGGYLDDGFDPPWGQGT LTVSS |
| 23 | VH 54-32-A07-sc09_(L12R, G51C,<br>V103T, L144Q)          | QSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKCL<br>EYIGYISKIGTTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA<br>TYFCARGSSSGGYLDDGFDPPWGQGTQVTVSS |
| 24 | VL 54-32-A07-sc09_(S14R, T22K,<br>T87R, T141C) (PRO2309) | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYD<br>SNNVENVFGCGTKVTVLG            |
| 25 | HCDR1 54-21-H03                                          | GFSFSTTYMC                                                                                                                         |
| 26 | HCDR2 54-21-H03                                          | CTNTASSVRTYYATWAKG                                                                                                                 |
| 27 | HCDR3 54-21-H03                                          | RDMGFADYALNL                                                                                                                       |
| 28 | LCDR1 54-21-H03                                          | QASESIYSSLA                                                                                                                        |

|    |                                                            |                                                                                                                                   |
|----|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 29 | LCDR2 <sub>54-21-H03</sub>                                 | LASTLAS                                                                                                                           |
| 30 | LCDR3 <sub>54-21-H03</sub>                                 | QSTDYTTSTHRNS                                                                                                                     |
| 31 | VH <sub>54-21-H03-sc01</sub> (PRO1922)                     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSTTYIMCWVRQAPGKG<br>LEWIGCTNTASSVRTYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLR<br>EDTAVYYCARDMGFADYALNLWGQGTLLTVSS  |
| 32 | VH <sub>54-21-H03-sc01</sub> (L12R, V103T,<br>L144Q)       | EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSFSTTYIMCWVRQAPGK<br>GLEWIGCTNTASSVRTYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLR<br>AEDTATYYCARDMGFADYALNLWGQGTQVTVSS |
| 33 | VL <sub>54-21-H03-sc01</sub> (PRO1922)                     | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESIYSSLAWYQQKPGKAPKLL<br>IYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSTDYTT<br>STHRNSFGTGTKVTVLG           |
| 34 | VH <sub>54-21-H03-sc01</sub> (G51C)                        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSTTYIMCWVRQAPGKC<br>LEWIGCTNTASSVRTYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLR<br>EDTAVYYCARDMGFADYALNLWGQGTLLTVSS  |
| 35 | VH <sub>54-21-H03-sc01</sub> (L12R, G51C,<br>V103T, L144Q) | EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSFSTTYIMCWVRQAPGK<br>CLEWIGCTNTASSVRTYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLR<br>AEDTATYYCARDMGFADYALNLWGQGTQVTVSS |
| 36 | VL <sub>54-21-H03-sc01</sub> (G141C)                       | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESIYSSLAWYQQKPGKAPKLL<br>IYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSTDYTT<br>STHRNSFGCGTKVTVLG           |

**Таблица 2. Примеры эталонных MSLN доменов связывания**

| SEQ ID NO: | Наименование | Последовательность |
|------------|--------------|--------------------|
| 37         | HCDR1        | GISVSNDYYMC        |
| 38         | HCDR2        | CISTYIGNTHYASWAKG  |
| 39         | HCDR3        | KNAGYPGYRYAIDL     |
| 40         | LCDR1        | QASESIGNYLA        |



|    |                                           |                                                                                                                                        |
|----|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 41 | LCDR2                                     | SASTLAS                                                                                                                                |
| 42 | LCDR3                                     | QSTDYGDSYI                                                                                                                             |
| 43 | VH <sub>54-22-H03-sc01</sub><br>(PRO1795) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGISVSNDYYMCWVRQAPGK<br>GLEWIGCISTYIGNTHYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAE<br>DTAVYYCAKNAGYPGYRYAIDLWGQGT LVT VSS |
| 44 | VL <sub>54-22-H03-sc01</sub><br>(PRO1795) | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASESIGNYLAWYQQKPGKAPKL<br>LIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSTDY<br>DSYIFGTGTVLGL                      |

**Таблица 3. Примеры CD3 доменов связывания по настоящему изобретению**

| SEQ ID NO: | Наименование                               | Последовательность                                                                                                                 |
|------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 45         | HCDR1                                      | GFSLSSYDMS                                                                                                                         |
| 46         | HCDR2                                      | ASYASGPTYYASWAKG                                                                                                                   |
| 47         | HCDR3                                      | RGGWTGTSHSNI                                                                                                                       |
| 48         | LCDR1                                      | QSSQSVFSNNYLA                                                                                                                      |
| 49         | LCDR2                                      | SASTLAS                                                                                                                            |
| 50         | LCDR3                                      | LGSYACSSADCYV                                                                                                                      |
| 51         | VH <sub>28-21-D09 sc04</sub>               | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGL<br>AWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDT<br>ATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGT LVT VSS |
| 140        | VH <sub>28-21-D09 sc04_(N94C)</sub>        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGL<br>AWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMCSLRAEDT<br>ATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGT LVT VSS |
| 141        | VH <sub>28-21-D09 sc04_(L12R, L144Q)</sub> | EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGL<br>AWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDT<br>ATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTQVT VSS  |

|     |                                                   |                                                                                                                                 |
|-----|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 142 | VH <sub>28-21-D09 sc04</sub> _(L12R, N94C, L144Q) | EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGL<br>AWIGASYASGPTYYSWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMCSLRAEDT<br>ATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTQVTVSS |
| 52  | VL <sub>28-21-D09 sc04</sub>                      | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSP<br>KRLIYASSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGSY<br>ACSSADCYVFGTGTKVTVLG       |

**Таблица 4. Примеры доменов связывания с человеческим сывороточным альбумином (hSA) по настоящему изобретению**

| SEQ ID NO:                                                                   | Наименование                                        | Последовательность                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Домен антитела к человеческому сывороточному альбумину 19-01-H04-sc03</i> |                                                     |                                                                                                                                    |
| 53                                                                           | HCDR1                                               | GFSLSSNAMG                                                                                                                         |
| 54                                                                           | HCDR2                                               | IISVGGFTYYASWAKG                                                                                                                   |
| 55                                                                           | HCDR3                                               | RDRHGGDSSGAFYL                                                                                                                     |
| 56                                                                           | LCDR1                                               | QSSESVYSNNQLS                                                                                                                      |
| 57                                                                           | LCDR2                                               | DASDLAS                                                                                                                            |
| 58                                                                           | LCDR3                                               | AGGFSSSSDTA                                                                                                                        |
| 59                                                                           | VH <sub>19-01-H04-sc03</sub><br>(PRO325)            | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKGL<br>EYIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA<br>TYFCARDRHGGDSSGAFYLWGQGTLVTVSS |
| 60                                                                           | VL <sub>19-01-H04-sc03</sub><br>(PRO325)            | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSESVYSNNQLSWYQQKPGQPP<br>KLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAGG<br>FSSSSDTAFGGGGTKLTVLG           |
| 61                                                                           | VH <sub>19-01-H04-sc03</sub> (G51C)<br>(PRO325_Cys) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKCL<br>EYIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA<br>TYFCARDRHGGDSSGAFYLWGQGTLVTVSS |

|                                                                              |                                                      |                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 62                                                                           | VL <sub>19-01-H04-sc03</sub> (G141C)<br>(PRO325_Cys) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSESVYSNNQLSWYQQKPGQPP<br>KLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAGG<br>FSSSSDTAFGCGTKLTVLG         |
| <i>Домен антитела к человеческому сывороточному альбумину 23-13-A01-sc03</i> |                                                      |                                                                                                                                 |
| 63                                                                           | HCDR1                                                | GFSFSSSYWIC                                                                                                                     |
| 64                                                                           | HCDR2                                                | CVFTGDGTTYASWAKG                                                                                                                |
| 65                                                                           | HCDR3                                                | RPVSVYYYGMDL                                                                                                                    |
| 66                                                                           | LCDR1                                                | QASQIISRSA                                                                                                                      |
| 67                                                                           | LCDR2                                                | QASKLAS                                                                                                                         |
| 68                                                                           | LCDR3                                                | QCTYIDSNFGA                                                                                                                     |
| 69                                                                           | VH <sub>23-13-A01-sc03</sub><br>(PRO459)             | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYWICWVRQAPGKG<br>LEWVGCVFTGDGTTYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLRA<br>EDTATYFCARPVSVYYYGMDLWGQGTLVTVSS |
| 70                                                                           | VL <sub>23-13-A01-sc03</sub><br>(PRO459)             | DVVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQIISRSAWYQQKPGQPPKLL<br>IYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQCTYIDS<br>NFGAFGGGTKLTVLG            |
| 71                                                                           | VH <sub>23-13-A01-sc03</sub> (G51C)<br>(PRO459_Cys)  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYWICWVRQAPGKC<br>LEWVGCVFTGDGTTYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLRA<br>EDTATYFCARPVSVYYYGMDLWGQGTLVTVSS |
| 72                                                                           | VL <sub>23-13-A01-sc03</sub> (G141C)<br>(PRO459_Cys) | DVVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQIISRSAWYQQKPGQPPKLL<br>IYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQCTYIDS<br>NFGAFGCGTKLTVLG            |
| <i>Домен антитела к человеческому сывороточному альбумину 19-04-A10</i>      |                                                      |                                                                                                                                 |
| 73                                                                           | HCDR1                                                | GFSLSSYAMN                                                                                                                      |
| 74                                                                           | HCDR2                                                | HINAGDIAYYATWAKG                                                                                                                |
| 75                                                                           | HCDR3                                                | RGAGGFSTGPFKL                                                                                                                   |
| 76                                                                           | LCDR1                                                | QASESINSRLA                                                                                                                     |
| 77                                                                           | LCDR2                                                | DASDLTS                                                                                                                         |

|     |                                                             |                                                                                                                                           |
|-----|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 78  | LCDR3                                                       | QGYGGSSTTT                                                                                                                                |
| 79  | VH <sub>19-04-A10-sc02</sub><br>(PRO2155)                   | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKGL<br>EWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDT<br>AVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGT LVTVSS         |
| 143 | VH <sub>19-04-A10-sc02</sub> _(L12R, V103T,<br>L144Q)       | EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKG<br>LEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAED<br>TATYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGT <b>Q</b> VTVSS |
| 80  | VL <sub>19-04-A10-sc02</sub><br>(PRO2155)                   | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLL<br>IYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQGYGGS<br>STTTFGGGTKLTVLG                    |
| 144 | VL <sub>19-04-A10-sc02</sub> _(S95C)                        | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLL<br>IYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS CLQPEDFATYYCQGYGGS<br>STTTFGGGTKLTVLG                    |
| 81  | VH <sub>19-04-A10-sc06</sub> _(G51C)<br>(PRO2317)           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKCL<br>EWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDT<br>AVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGT LVTVSS         |
| 145 | VH <sub>19-04-A10-sc06</sub> _(L12R, G51C,<br>V103T, L144Q) | EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKC<br>LEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAED<br>TATYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGT <b>Q</b> VTVSS |
| 82  | VL <sub>19-04-A10-sc06</sub> _(G141C)<br>(PRO2317)          | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLL<br>IYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQGYGGS<br>STTTFGCGTKLTVLG                    |
| 146 | VL <sub>19-04-A10-sc06</sub> _(S95C, G141C)                 | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLL<br>IYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS CLQPEDFATYYCQGYGGS<br>STTTFGCGTKLTVLG                    |

Таблица 5. Примеры мультиспецифических молекул по настоящему изобретению

| SEQ ID NO:                                            | Наименование                    | Последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Конструкты biMSLNнизкая аффинность x CD3 x hSA</b> |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>PRO2000 (MATCH4)</b>                               |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 83                                                    | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2000</sub> | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYSNLAWYQQKPGKAPKLL<br>IYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVRSSS<br>DIDNPFGTGKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGG<br>GLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMGWVRQAPGKGLEWIGYISTIN<br>NTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAREIRS<br>GWVDYGFSIWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG<br>GSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYAS<br>WAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHS<br>NIWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS<br>GFSFSSSYWICWVRQAPGKCLEWVGCVFTGDGTTYASWAKGRFT<br>ISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARPVSVYYYGMDLWGQGT<br>LVTVSS |
| 84                                                    | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2000</sub> | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYSNLAWYQQKPGKAPKLL<br>IYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVRSSS<br>DIDNPFGTGKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGG<br>GLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMGWVRQAPGKGLEWIGYISTIN<br>NTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAREIRS<br>GWVDYGFSIWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSDVVM TQSPSSLSASV<br>GDRVTITCQASQIISRSAWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQCTYIDSNFGAFGCGTKLTVLG<br>GGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQK                                                                                                           |

|                         |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                         |                                 | PGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<br>LGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>PRO2100 (MATCH4)</b> |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 85                      | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2100</sub> | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQNIYSNLAWYQQKPGKAPKLL<br>IYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVRSSS<br>DIDNPFGTGKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGG<br>GLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMGWVRQAPGKGLEWIGYISTIA<br>NTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAREIRS<br>GWVDYGFSIWGGTGLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG<br>GSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYAS<br>WAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHS<br>NIWGQGTGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS<br>GFSFSSSYWICWVRQAPGKCLEWVGCVFTGDGTTYASWAKGRFT<br>ISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARPVSVYYYGMDLWGQGT<br>LTVSS |
| 86                      | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2100</sub> | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQNIYSNLAWYQQKPGKAPKLL<br>IYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVRSSS<br>DIDNPFGTGKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGG<br>GLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMGWVRQAPGKGLEWIGYISTIA<br>NTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAREIRS<br>GWVDYGFSIWGGTGLVTVSSGGGGSGGGGSDVVM TQSPSSLSASV<br>GDRVITTCQASQIISRSAWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFS<br>SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQCTYIDSNFGAFGCGTKLTVLG<br>GGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSVFSNNYLAWFQQK<br>PGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<br>LGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                            |
| <b>PRO2323 (MATCH4)</b> |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 87                      | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2323</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVITIKCQASQSI SNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGT LVTVSSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP<br>GGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYY<br>ASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA<br>ASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTI<br>SRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGT<br>LVTVSS                                                                                 |
| 88               | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2323</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGT LVTVSSGGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKP<br>GQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL<br>GSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG |
| PRO2417 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 89               | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2417</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGT LVTVSSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP<br>GGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYY                                                                                                                                                                                           |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | ASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGT LVT VSSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQP GGS<br>RLSCAASGFSLS SYAMNWVRQAPGKC LEWIGHINAGDIAYYATWA<br>KGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGP FKL<br>WGQGT LVT VSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 90               | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2417</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGS SQLVESG<br>GGLVQP GGSRLSCAVSGFSLS SYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFD PWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTITCQASESIN SRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSGGSGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYL<br>AWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE<br>DFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                               |
| PRO2424 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 91               | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2424</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGS SQLVESG<br>GGLVQP GGSRLSCAVSGFSLS SYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFD PWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP<br>GGSRLSCAASGFSLS SYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYY<br>ASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMCSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGT LVT VSSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQP GGS<br>RLSCAASGFSLS SYAMNWVRQAPGKC LEWIGHINAGDIAYYATWA<br>KGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGP FKL<br>WGQGT LVT VSS |



|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 92               | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2424</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISCLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSGGSGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYL<br>AWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE<br>DFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                |
| PRO2434 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 93               | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2434</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP<br>GGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTY<br>ASWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWA<br>KGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKL<br>WGQGTLVTVSS |
| 94               | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2434</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGSSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | GGYLDDGFDPPWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTTTCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCQSSQSVFSNNYLAWFQQKP<br>GQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL<br>GSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| PRO2436 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 95               | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2436</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPPWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP<br>GGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTY<br>ASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA<br>ASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTI<br>SRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGT<br>LVTVSS |
| 96               | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2436</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPPWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTTTCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCQSSQSVFSNNYL                                                                                                      |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | AWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE<br>DFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| PRO2559 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 97               | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2559</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP<br>GGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYY<br>ASWAKGRFTISRDNKNTVYLMCSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWA<br>KGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKL<br>WGQGTLLTVSS |
| 98               | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2559</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISCLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKP<br>GQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCL<br>GSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                          |
| PRO2560 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 99               | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2560</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGT LVTVSSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP<br>GGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYY<br>ASWAKGRFTISRDNKNTVYLMCSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA<br>ASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTI<br>SRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGT<br>LVTVSS                                                                                          |
| 100              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2560</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGT LVTVSSGGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISCLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSGGSGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYL<br>AWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE<br>DFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG |
| PRO2562 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 101              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2562</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGT LVTVSSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP<br>GGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYY                                                                                                                                                                                                  |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | ASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMCSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGT LVT VSSGGGSGGGSGGGSGGEVQLVESGGGLVQP GGSL<br>RLSCAASGFSLS SYAMNWVRQAPGKC LEWIGHINAGDIAYYATWA<br>KGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGP FKL<br>WGQGT LVT VSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 102              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2562</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSQSQ LVE SG<br>GGLVQP GGSLRLSCAVSGFSLS SYAMGWVRQAPGKC LEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFD PWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTITCQASESIN SRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISCLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSGGSGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYL<br>AWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE<br>DFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                                  |
| PRO2563 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 103              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2563</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSQSQ LVE SG<br>GGLVQP GGSLRLSCAVSGFSLS SYAMGWVRQAPGKC LEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFD PWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP<br>GGSLRLSCAASGFSLS SYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYY<br>ASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGT LVT VSSGGGSGGGSGGGSGGEVQLVESGGGLVQP GGSL<br>RLSCAASGFSLS SYAMNWVRQAPGKC LEWIGHINAGDIAYYATWA<br>KGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGP FKL<br>WGQGT LVT VSS |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 104              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2563</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKP<br>GQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL<br>GSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                                  |
| PRO2564 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 105              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2564</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSSQSQLVESGGGLVQP<br>GGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKGLEIYIGYISKIGTTYAS<br>WAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSSGGYLD<br>DGFDPWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQPGG<br>SLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATW<br>AKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFK<br>LWGQGT LVTVSS |
| 106              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2564</sub> | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPK<br>RLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYAC<br>SSADCYVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES<br>GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASY<br>ASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCAR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | GGWTGTSHSNIWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGS AFELTQSPSSLSAS<br>VGDRV TITCQASESIN SRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSR<br>FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG<br>GGSGSGSGSGSGALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSI SNYLA<br>WYQQKPGKPPKFLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPED<br>FATYYCQQVYDSNNVENVFGTGTKVTVLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| PRO2565 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 107              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2565</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRV TI KCQASQSI SNYLA WYQQKPGKPPK F<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCA VSGFSLSSYAMGWVRQAPGKC LEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLD DGFDPWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSSQSQLVESGGGLVQP<br>GGSLRLSCA VSGFSLSSYAMGWVRQAPGKG LEYIGYISKIGTTYAS<br>WAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSSGGYLD<br>DGFDPWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQPGG<br>SLRLSCAASGFSLSYAMNWRQAPGKC LEWIGHINAGDIAYYATW<br>AKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFK<br>LWGQGT LVT VSS |
| 108              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2565</sub> | DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCQSSQSVFSNNYLA WYQQKPGQSPK<br>RLIYSA STLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYAC<br>SSADCYVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES<br>GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASY<br>ASGPTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCAR<br>GGWTGTSHSNIWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSA FELTQSPSSLSAS<br>VGDRV TITCQASESIN SRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSR<br>FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG<br>GGSGGSALQMTQSPSSLSARVGDRV TI KCQASQSI SNYLA WYQQK                                                                                                                   |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | GKPPKFLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYC<br>QQVYDSNNVENVFGTGTKVTVLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| PRO2566 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 109              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2566</sub> | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLI<br>YDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGYGGSST<br>TTFGTGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV<br>QPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKGLEWIGHINAGDIAY<br>YATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFS<br>TGPFKLWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWA<br>KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIW<br>GQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA<br>VSGFSLSSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIGTTYASWAKGRFTIS<br>KDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSSGGYLDDGFD PWGQ<br>GTLVTVSS |
| 110              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2566</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDDGFD PWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSALQMTQSPSSLSAR<br>VGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKFLIYDASDLASGVPSR<br>FSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDSNNVENVFGCGTKVT<br>VLGGGSGGSGGSGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFS<br>NNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>LQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                  |
| PRO2567 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 111              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2567</sub> | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLI<br>YDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGYGGSST                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |



|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | <p>TTFGTGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV<br/>         QPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKGLEWIGHINAGDIAY<br/>         YATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFS<br/>         TGPFKLWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL<br/>         RLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTY YASWA<br/>         KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIW<br/>         GQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGSGQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA<br/>         VSGFSLSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIGTTY YASWAKGRFTIS<br/>         KDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSSGGYLDDGFD PWGQ<br/>         GTLVT VSS</p>                                                                                               |
| 112              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2567</sub> | <p>ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQ SISNYLAWYQQKPGKPPKF<br/>         LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQVYDS<br/>         NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGS SQLVESG<br/>         GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br/>         TTY YASWAKGRFTISKDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br/>         GGYLDDGFD PWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSALQMTQSPSSLSAR<br/>         VGDRVTIKCQASQ SISNYLAWYQQKPGKPPKFLIYDASDLASGVPSR<br/>         FSGSGSGRDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQVYDSNNVENVFGCGTKVT<br/>         VLGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWF<br/>         QQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAT<br/>         YYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG</p> |
| PRO2569 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 113              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2569</sub> | <p>ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQ SISNYLAWYQQKPGKPPKF<br/>         LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQVYDS<br/>         NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGS SQLVESG<br/>         GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br/>         TTY YASWAKGRFTISKDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br/>         GGYLDDGFD PWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP<br/>         GGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTY Y</p>                                                                                                                                                                                                                                        |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | ASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGT LVT VSSGGGSGGGSGGGSGGEVQLVESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGFSLS SYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWA<br>KGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKL<br>WGQGT LVT VSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 114              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2569</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSI SNYLA WYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFS GSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGS SQLVESG<br>GGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLS SYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGSSS<br>GGYLDGFD PWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTITCQASESINSLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSGGSGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYL<br>AWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPE<br>DFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                                   |
| PRO2660 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 115              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2660</sub> | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESIYSSLAWYQQKPGKAPKLLI<br>YLASTLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSTDYTT<br>THRNSFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG<br>GLVQPGGSLRLSCAASGFSFSTTYMCWVRQAPGKGLEWIGCTNTA<br>SSVRTYYATWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAR<br>DMGFADYALNLWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV<br>QPGGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTY<br>YASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGT<br>SHSNIWGQGT LVT VSSGGGSGGGSGGGSGGEVQLVESGGGLVQPGGS<br>LRLSCAASGFSLS SYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATW<br>AKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFK<br>LWGQGT LVT VSS |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 116              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2660</sub> | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESIYSSLAWYQQKPGKAPKLLI<br>YLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSTDYTTT<br>THRNSFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG<br>GLVQPGGSLRLSCAASGFSFSTTYIMCWVRQAPGKGLEWIGCTNTA<br>SSVRTYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR<br>DMGFADYALNLWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSAS<br>VGDRVITTCQASESINSLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSR<br>FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG<br>GGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSVFSNNYLAWFQQK<br>PGQSPKRLIYASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC<br>LGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                         |
| PRO2741 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 117              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2741</sub> | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESIYSSLAWYQQKPGKAPKLLI<br>YLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSTDYTTT<br>THRNSFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG<br>GRVQPGGSLRLSCAASGFSFSTTYIMCWVRQAPGKGLEWIGCTNT<br>ASSVRTYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCA<br>RDMGFADYALNLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGR<br>VQPGGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPT<br>YYASWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARGGWTG<br>TSHSNIWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGRVQPG<br>GSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYAT<br>WAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARGAGGFSTGPF<br>KLWGQGTQVTVSS |
| 118              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2741</sub> | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESIYSSLAWYQQKPGKAPKLLI<br>YLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSTDYTTT<br>THRNSFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG<br>GRVQPGGSLRLSCAASGFSFSTTYIMCWVRQAPGKGLEWIGCTNT<br>ASSVRTYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | RDMGFADYALNLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSASFELTQSPSSLS<br>ASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVP<br>SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTV<br>LGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQ<br>QKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY<br>YCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| PRO2744 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 119              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2744</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGRVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGSSS<br>GGYLLDDGFDPWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGRVQP<br>GGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTY<br>ASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMCSLRAEDTATYFCARGGWTGTS<br>HSNIWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGRVQPGGS<br>LRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATW<br>AKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGAGGFSTGPFK<br>LWGQGTQVTVSS |
| 120              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2744</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESG<br>GGRVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGSSS<br>GGYLLDDGFDPWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV<br>GDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTISCLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLGG<br>GSGGSGGSGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYL                                                                                                           |

|                  |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                 | AWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE<br>DFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| PRO2745 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 121              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2745</sub> | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLI<br>YDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGYGGSST<br>TTFGTGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGRV<br>QPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKGLEWIGHINAGDIAY<br>YATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGAGGFS<br>TGPFKLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGRVQPGGSL<br>RLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWA<br>KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIW<br>GQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQSQLVESGGGRVQPGGSLRLSC<br>AVSGFSLSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIGTTYASWAKGRFTI<br>SKDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGSSSGGYLDDGFDPWGQ<br>GTQVTVSS |
| 122              | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2745</sub> | ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br>LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDS<br>NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVESG<br>GGRVQPGGSLRLSCAVSGFSLSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br>TTYASWAKGRFTISKDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGSSS<br>GGYLDDGFDPWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSALQMTQSPSSLSAR<br>VGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKFLIYDASDLASGVPSR<br>FSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYDSNNVENVFGCGTKVT<br>VLGGGSGGSGGSGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFS<br>NNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>LQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG                 |
| PRO2746 (MATCH4) |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 123              | ЦЕПЬ CHAIN_1 <sub>PRO2746</sub> | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLI<br>YDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGYGGSST                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

|     |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                 | <p> TTFGTGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGRV<br/> QPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKGLEWIGHINAGDIAY<br/> YATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGAGGFS<br/> TGPFKLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGRVQPGGSL<br/> RLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYSWA<br/> KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIW<br/> GQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQSQLVESGGGRVQPGGSLRLSC<br/> AVSGFSLSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIGTTYASWAKGRFTI<br/> SKDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGSSSGGYLDDGFDPWGQ<br/> GTQVTVSS </p>                                                                                          |
| 124 | ЦЕПЬ CHAIN_2 <sub>PRO2746</sub> | <p> ALQMTQSPSSLSARVGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKF<br/> LIYDASDLASGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDS<br/> NNVENVFGCGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSQSQLVESG<br/> GGRVQPGGSLRLSCAVSGFSLSYAMGWVRQAPGKCLEYIGYISKIG<br/> TTYASWAKGRFTISKDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGSSS<br/> GGYLDDGFDPWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSALQMTQSPSSLSAR<br/> VGDRVTIKCQASQSSISNYLAWYQQKPGKPPKFLIYDASDLASGVPSR<br/> FSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDSNNVENVFGCGTKVT<br/> VLGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWF<br/> QQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT<br/> YYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG </p> |

Таблица 6. Примеры эталонных мультиспецифических молекул

| SEQ ID NO:                                                                                 | Наименование | Последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Конструкты из примера 4: эталонные антитела к <math>MSLN_{низкая} KDXCD3xhSA</math></b> |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>PRO1872 (scMATCH3)</b>                                                                  |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 125                                                                                        | scDb-scFv    | DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQIISRS AWYQQKPGQPPKLLI<br>YQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQCTYIDSN<br>FGAFGCGTKLTVLGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<br>SLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTY YASWAKGRFTISR D<br>NSKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGT LVT V<br>SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQS<br>SQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIY SASTLASGVPSRFSGSGSGTD<br>FTLTISLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLGGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYWICWVRQAPGKCL<br>EWVGCVFTGDGTTY YASWAKGRFTISR DNSKNTVY LQMNSLRAED<br>TATYFCARPVSVYYYGMDLWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSDIQMT<br>QSPSSLSASVGDRVTITCQASESIGNYLAWYQQKPGKAPKLLIY SAS<br>TLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSTDYGDSYIFG<br>TGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG<br>SLRLSCAASGISVNDYYMCWVRQAPGKGLEWIGCISTYIGNTHYA<br>SWAKGRFTISR DNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKNAGYPGYR<br>Y AIDLWGQGT LVT VSS |

Таблица 7. Другие последовательности, относящиеся к настоящему изобретению

| SEQ ID NO:                            | Наименование                                  | Последовательность                                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Линкеры</i>                        |                                               |                                                                                                                                                                                          |
| 126                                   | Линкер                                        | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS                                                                                                                                                                     |
| 127                                   | Единица последовательности линкера            | GGGS                                                                                                                                                                                     |
| 128                                   | Генерическая последовательность линкера       | (GmS) <sub>n</sub> , где m выбирается из значений 2, 3 и 4, а n – выбирается из значений 2, 3, 4, 5 и 6                                                                                  |
| <i>Последовательности VH и VL</i>     |                                               |                                                                                                                                                                                          |
| 129                                   | VH3                                           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <b>GFSFS</b> ANYYP <b>PC</b> WVRQAPGKGL<br>EWIG <b>CIYGGSSDITYDANWTK</b> GRFTISRDN <b>SKNTVYLQMN</b> SLRAEDT<br>AVYYCARS <b>AWYSGWGGDL</b> WGQGT <b>LVTVSS</b> |
| 130                                   | VH4                                           | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKV <b>SGFSFSNSY</b> WICWIRQPPGKGLE<br>WIG <b>CTFVGSSDSTYYANWAK</b> GRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTA<br>VYYCAR <b>HPSDAVYGYANNL</b> WGQGT <b>LVTVSS</b>                  |
| 131                                   | Vkappa1                                       | DIQMTQSPSSLSASVGDRV <b>TITCQASQSINNVL</b> AWYQQKPGKAPKLL<br>IY <b>RASTLAS</b> GVPSRFSGSGSGTDFTLT <b>IS</b> SLQPEDFATYYC <b>QSSYGNYG</b><br>DFGTG <b>TKVTVLG</b>                          |
| <i>Последовательности Vlambda FR4</i> |                                               |                                                                                                                                                                                          |
| 132                                   | FR4_Sk17 на основе V-лямбда зародышевого типа | FGTGT <b>TKVTVLG</b>                                                                                                                                                                     |
| 133                                   | FR4_Sk12 на основе V-лямбда зародышевого типа | FGGGT <b>KLTVLG</b>                                                                                                                                                                      |



|     |                                                   |             |
|-----|---------------------------------------------------|-------------|
| 134 | FR4_1 на основе V-лямбда<br>зародышевого типа     | FGGGTQLIILG |
| 135 | FR4_2 на основе V-лямбда<br>зародышевого типа     | FGEGTELTVLG |
| 136 | FR4_3 на основе V-лямбда<br>зародышевого типа     | FGSGTKVTVLG |
| 137 | FR4_4 на основе V-лямбда<br>зародышевого типа     | FGGGTQLTVLG |
| 138 | FR4_5 на основе V-лямбда<br>зародышевого типа     | FGGGTQLTALG |
| 139 | FR4_G141C на основе V-лямбда<br>зародышевого типа | FGCGTKVTVLG |

При наличии расхождений в настоящей заявке между текстом описания (например, таблицами 1–7) и перечнем последовательностей, преимущественную силу имеет текст описания.

Следует отметить, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть объединены друг с другом в один вариант осуществления. С другой стороны, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены по отдельности или в любой подходящей комбинации. Настоящее изобретение охватывает все сочетания вариантов осуществления, относящихся к нему, при этом в настоящем документе они раскрыты так, как если бы каждая комбинация была раскрыта отдельно в явном виде. Кроме того, настоящее изобретение охватывает все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов, при этом они раскрыты в настоящем документе так, как если бы каждая такая подкомбинация была раскрыта отдельно в явном виде.

Объем изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Напротив, после ознакомления с настоящим документом специалистам в данной области техники станут очевидны различные модификации изобретения. Прилагаемая формула изобретения распространяется на все такие модификации.

Насколько это возможно в рамках соответствующего патентного законодательства, все патенты, заявки, публикации, способы испытаний, литература и другие материалы, упомянутые в настоящем документе, включены в него посредством ссылки.

Следующие примеры иллюстрируют вышеописанное изобретение, но никак не ограничивают его объем. Другие модели испытаний, известные специалистам в соответствующей области техники, также могут определять полезные эффекты заявленного изобретения.

## Примеры

### **Пример 1: генерация и определение фармакодинамических характеристик молекул антител к мезотелину:**

На первом этапе необходимо идентифицировать фрагменты антител к мезотелину, имеющие среднюю–низкую аффинность связывания с мезотелином. Фрагменты антител к мезотелину должны подходить для применения в форматах мультиспецифических антител, более конкретно – в форматах антител MATCH3 и MATCH4.

### **Идентификация, выбор и получение доменов связывания антител к MSLN по настоящему изобретению**

Идентификацию, выбор, гуманизацию и получение гуманизированных доменов связывания одноцепочечных Fv-фрагментов антител к MSLN (мезотелину) по настоящему изобретению выполняли аналогично доменам связывания scFv антител к CD3, как описано в патентной заявке РСТ/EP2018/064630, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Из нескольких идентифицированных моноклональных антител с желательными свойствами, более конкретно с желательной аффинностью, молекулы scFv получали в соответствии со следующей процедурой.

### **Гуманизация и экспрессия:**

Антитела кроликов гуманизировали путем энграфтмента определяющей комплементарность области на  $\lambda$ -кэпированном каркасе Fv-фрагмента Vk1/VH3 и необязательного энграфтмента специфических каркасных остатков кроликов. Каждый одноцепочечный Fv-фрагмент имел ориентацию N-конец–VL–пептидный линкер–VH–С-конец (пептидный линкер: (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>).

Рекомбинантные аминокислотные последовательности синтезировали *de novo*, а экспрессию конструкторов scFv выполняли в клетках CHO-S с

помощью набора для временной трансфекции CHOgro (Mirus). Культуры собирали через 5–7 суток (доля жизнеспособных клеток < 70%) после экспрессии при +37 °C путем центрифугирования, а белки очищали от осветленного супернатанта клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии белка L или A с последующим (при необходимости) этапом очистки методом эксклюзионной хроматографии (SEC) с помощью колонки Superdex S200.

### Контроль качества:

Для контроля качества произведенного материала использовали стандартные аналитические методы, например, эксклюзионная ВЭЖХ (SE-HPLC), ультрафиолетовый метод UV280 и электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE).

### *SE-HPLC*

Образцы для анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ (SE-HPLC) пропускали через колонку Shodex<sup>TM</sup> (Showa Denko, #: 554–1740) KW402,5–4F (для анализа одноцепочечных Fv-фрагментов) или колонку Shodex<sup>TM</sup> (Showa Denko, #: 554–1741) KW403–4F (анализ белка MATCH) с подвижным буфером (Shodex<sup>TM</sup> KW402,5–4F: 250 ммоль NaCl, 50 ммоль NaOAc (#: A 1045), pH 6,0; Shodex<sup>TM</sup> KW403–4F: 35 ммоль NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (#: A 3905), 15 ммоль Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (#: A1372), 300 ммоль NaCl, pH 6,0) при расходе 0,35 мл/мин. Элюированный белок был обнаружен на основании поглощения при  $\lambda = 280$  нм.

### *SDS-PAGE*

Идентичность и разрушение белка оценивали с помощью SDS-PAGE, загружая денатурированные белки на готовые гели MiniPROTEAN TGX<sup>TM</sup> (Bio-Rad Laboratories, #: 4569036) и окрашивая подвергнутые электрофорезу белки с помощью раствора кумасси бриллиантового синего. Стандарт молекулярной массы: BioRad Precision<sup>TM</sup> Plus (#: 161-03/04).

Производственные данные о полученных молекулах одноцепочечных Fv-фрагментов обобщены в таблице 8.

### **Определение фармакодинамических характеристик scFv антител к мезотелину PRO1783, PRO1925, PRO2306, PRO2309 (низкая аффинность) и PRO1922**

scFv гуманизированных антител к мезотелину PRO1783 оценивали с точки зрения его первичных фармакодинамических свойств, включая определение кинетики связывания и аффинности с рекомбинантным мезотелином человека и макаки-крабода методом поверхностного плазмонного резонанса, оценку связывания плазматической мембраны с мезотелином человека и *synomolgus monkey* (макака-крабода), экспрессирующим линии клеток, с помощью конкуретного метода ИФА, и оценку блокады мезотелина/муцина 16 с помощью конкуретного метода ИФА. Кроме того, одноцепочечные Fv-фрагменты гуманизированных антител к мезотелину PRO1922, PRO1925, PRO2306 и PRO2309 оценивали с точки зрения первичных фармакодинамических свойств, включая определение кинетики связывания и аффинности с рекомбинантным мезотелином человека методом поверхностного плазмонного резонанса, оценку связывания плазматической мембраны с мезотелином человека, экспрессирующим линии клеток с помощью конкуретного метода ИФА, и оценку блокады мезотелина/муцина 16 с помощью конкуретного метода ИФА (PRO1922 и PRO1925). Результаты обобщены в таблицах 9–13.

#### Аффинность к MSLN человека и *synomolgus monkey* при SPR

Аффинность scFv PRO1783 (полученного из моноклонального антитела 54-01-G02) к рекомбинантному мезотелину человека и *synomolgus monkey* (макака-крабода) определяли методом поверхностного плазмонного резонанса на устройстве T200 (Biacore, GE Healthcare). В данном эксперименте рекомбинантный мезотелин человека и макака-крабода (приобретенный в Peprotech и Sino Biological, соответственно) иммобилизовали на разных

проточных кюветах сенсорного чипа CM5 с помощью стандартной процедуры иммобилизации по аминокгруппе. Затем scFv антитела PRO1783 вводили в проточные кюветы на 5 мин с концентрациями 90–0,12 нмоль, после чего белок диссоциировал в течение 12 мин. Константы скоростей диссоциации ( $k_d$ ) и ассоциации ( $k_a$ ), а также равновесная константа диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали с помощью программного обеспечения для оценки Biacore T200 (GE Healthcare) с помощью модели связывания Лэнгмюра «один к одному». Аффинность scFv PRO1922 и PRO1925 оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса, как указано выше, при концентрациях 15–0,12 нмоль. Аффинности scFv PRO2306 и PRO2309 оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса, как указано выше, при концентрациях 90–0,35 нмоль. Как показано в таблице 9, PRO1783 связан с рекомбинантным мезотелином человека при использовании метода поверхностного плазмонного резонанса с аффинностью в нижнем наномолярном диапазоне ( $K_D = 2,91$  нмоль). PRO1922, PRO1925, PRO2306 и PRO2309 связаны с рекомбинантным мезотелином человека при использовании метода поверхностного плазмонного резонанса с аффинностью в верхнем субнаномолярном диапазоне. Измерение методом поверхностного плазмонного резонанса также продемонстрировало связывание PRO1783 с рекомбинантным мезотелином макака-крабоеда, хотя и с меньшей аффинностью ( $K_D = 30,06$  нмоль, таблица 10).

#### Связывание с линиями клеток, экспрессирующими мезотелин, с помощью конкуретного метода ИФА

*Связывание с клетками, экспрессирующими мезотелин человека с высоким уровнем (линия клеток H226)*

Связывание scFv антител к мезотелину PRO1783 с плазмомембранным мезотелином оценивали с помощью конкуретного метода ИФА (cELISA) в клетках рака H226. Вкратце, 20 000 клеток NCI-H226, экспрессирующих мезотелин, или HEK293T (мезотелин-отрицательных) распределяли на 96-

луночном плоскодонном планшете, обработанном тканевой культурой. На следующий день планшеты промывали три раза в режиме перелива с помощью 450 мкл промывочного буфера (забуференный фосфатом физиологический раствор, 0,2 % бычьего сывороточного альбумина) для каждой лунки, на каждом шаге серийного разведения добавляли 50 мкл PRO1783 и эталонного антитела к мезотелину (аматуксимаба), после чего планшеты инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре (RT) с осторожным перемешиванием. После 3 циклов промывки с помощью 450 мкл промывочного буфера в каждую лунку добавляли 50 мкл белка L, сопряженного с пероксидазой хрена, или антитела к IgG человека, сопряженного с пероксидазой хрена. После инкубации на качающемся смесителе при комнатной температуре в течение 1 ч планшеты промывали три раза с помощью 450 мкл промывочного буфера (для каждой лунки), а затем добавляли 50 мкл тетраметилбензидина (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, KPL). Через 10 мин развития ферментативную реакцию останавливали путем добавления в каждую лунку 50 мкл HCl (1 моль) и считывали результаты для планшета при 450 нм (при использовании 690 нм в качестве эталонной длины волны).

Результаты эксперимента по оценке связывания плазматической мембраны PRO1783 с линией клеток H226, экспрессирующей высокие уровни мезотелина, представлены в таблице 11. Концентрация  $EC_{50}$  для связывания PRO1783 с линией клеток H226 была определена при концентрации 1,44 нмоль, что примерно в 6 раз хуже по сравнению со значением, полученным для эталонного антитела аматуксимаба (по сравнению с относительными значениями концентрации  $EC_{50}$ , таблица 11). Значения концентрации  $EC_{50}$  для связывания PRO1925, PRO2306 и PRO2309 с клетками H226 были примерно равны значениям для PRO1783. Значения концентрации  $EC_{50}$  для связывания PRO1922 с клетками H226 были примерно равны значениям для аматуксимаба. Связывание аматуксимаба, PRO1783, PRO1922, PRO1925, PRO2306 и PRO2309 обнаружено не было, когда мезотелин-отрицательные

клетки HEK293T проверяли с помощью конкуретного метода ИФА (данные не показаны). Кривые «концентрация-эффект» для PRO1783, PRO1922, PRO1925, PRO2306, PRO2309 и аматуксимаба при использовании конкуретного метода ИФА и линии клеток H226 представлены на Фиг. 1.

Связывание с клетками, экспрессирующими MSLN макака-крабоведа (рекомбинантная линия клеток CHO)

Перекрестную реактивность scFv антител к мезотелину с мезотелином макака-крабоведа PRO1783 проверяли конкуретным методом ИФА с помощью рекомбинантной клеточной линии CHO, экспрессирующей мезотелин макака-крабоведа. 20 000 клеток CHO, экспрессирующих мезотелин макака-крабоведа, или клеток CHO-K1 (мезотелин-отрицательные клетки макака-крабоведа) распределяли на 96-луночном плоскодонном планшете, обработанном тканевой культурой. На следующий день планшеты промывали и выполняли серийное разведение PRO1783 и эталонного антитела к мезотелину (аматуксимаба), как описано в протоколе конкуретного метода ИФА, с помощью линии клеток H226. После инкубации в течение 1,5 ч при комнатной температуре с осторожным перемешиванием планшеты снова промывали и добавляли белок L, сопряженный с пероксидазой хрена, или антитело к IgG человека, сопряженное с пероксидазой хрена, для обнаружения связывания PRO1783 и аматуксимаба соответственно. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре на качающемся смесителе промывали планшеты и добавляли в каждую лунку тетраметилбензидин. Через 10 мин развития ферментативную реакцию останавливали путем добавления в каждую лунку 50 мкл HCl (1 моль) и считывали результаты для планшета при 450 нм (при использовании 690 нм в качестве эталонной длины волны).

Результаты конкуретного метода ИФА при использовании линии клеток CHO, экспрессирующей мезотелин макака-крабоведа, представлены в таблице 12. Концентрация EC<sub>50</sub> PRO1783 для связывания с плазмомембранным



мезотелином макака-крабоведа была определена при концентрации 12 нмоль, что явно ниже эталонного антитела аматуксимаба (относительная концентрация  $EC_{50} = 0,03$ ). С другой стороны, по сравнению со связыванием с плазмомембранным мезотелином человека очевидна повышенная полумаксимальная связывающая концентрация PRO1783, что соответствует результатам анализа методом поверхностного плазмонного резонанса, демонстрирующим сниженную аффинность PRO1783 с рекомбинантным белком (мезотелином) макака-крабоведа. Кривые «концентрация-эффект» для PRO1783 и аматуксимаба при использовании конкуретного метода ИФА и линии клеток CHO, экспрессирующей мезотелин макака-крабоведа, представлены на фиг. 2. Связывание аматуксимаба и PRO1783 не было обнаружено при использовании клеток дикого типа CHO-K1 в конкуретном методе ИФА (данные не показаны).

#### Нейтрализация взаимодействия MSLN /MUC16 с помощью конкуретного метода ИФА

Эффективность scFv антител к мезотелину PRO1783, PRO1922 и PRO1925 с точки зрения блокировки взаимодействия MSLN /MUC16 оценивали с помощью конкуретного метода ИФА. Планшеты для метода ИФА покрывали путем добавления 50 мкл забуференного фосфатом физиологического раствора, содержащего 1 мкг/мл MUC16 на ночь при +4 °C. На следующий день планшеты промывали три раза в режиме переполнения с помощью 450 мкл промывочного буфера (для каждой лунки), а также добавляли в каждую лунку 300 мкл блокирующего буфера и инкубировали на качающемся смесителе на 1 ч при комнатной температуре. Затем биотинилированный мезотелин разбавляли в блокирующем буфере до достижения конечной концентрации, равной 1 нг/мл. Затем PRO1783, PRO1922, PRO1925 и аматуксимаб титровали в биотинилированном мезотелин-содержащем блокирующем буфере и инкубировали в течение 1 ч

при комнатной температуре на качающемся смесителе. Планшеты для метода ИФА промывали 3 раза в режиме перелива с помощью 450 мкл промывочного буфера (для каждой лунки) и добавляли в планшеты для метода ИФА по 50 мкл для каждой концентрации на кривой титрования PRO1783, PRO1922, PRO1925 и аматуксимаба в двух параллельных опытах. Планшеты инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. После трех циклов промывки с помощью 450 мкл промывочного буфера (для каждой лунки) в каждую лунку планшета для метода ИФА добавляли 50 мкл поли-HRP40-стрептавидина (10 нг/мл). После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре планшеты промывали три раза с помощью 450 мкл промывочного буфера и давали развиваться в течение 5–10 мин после добавления 50 мкл тетраметилбензидина. В конце ферментативную реакцию останавливали путем добавления 50 мкл HCl (1 моль) и считывали результаты для планшета при 450 нм (при использовании 690 нм в качестве эталонной длины волны).

Результаты конкурентного метода ИФА представлены в таблице 13. Концентрация  $IC_{50}$  для блокировки взаимодействия MSLN /MUC16 человека с помощью PRO1783 была обнаружена при концентрации 0,5 нмоль, что ниже эталонного антитела аматуксимаба, представленного в виде значения относительной концентрации  $IC_{50}$ . Таким образом, с точки зрения нейтрализации взаимодействия MSLN /MUC16 человека PRO1783 является менее эффективным, чем эталонное антитело (аматуксимаб). PRO1922 и PRO1925 могли блокировать взаимодействие MSLN /MUC16 человека при значительно меньшей концентрации  $IC_{50}$ , чем у PRO1783. Кривые «концентрация-эффект» PRO1783, PRO1922, PRO1925 и аматуксимаба при использовании конкурентного метода ИФА представлены на фиг. 3.

## **Генерация и определение фармакодинамических характеристик эталонной молекулы антитела к мезотелину PRO1795:**

Домен связывания антитела к мезотелину PRO1795 с высокой аффинностью связывания с мезотелином используют в качестве эталонного домена связывания.

Идентификацию, выбор, гуманизацию и получение гуманизированного эталонного домена связывания антител к мезотелину PRO1795 выполняли аналогично доменам связывания антител к мезотелину по настоящему изобретению и молекулам антител к CD3, как описано в настоящем документе.

Кроме того, PRO1795 оценивали с точки зрения его первичных фармакодинамических свойств, включая определение кинетики связывания и аффинности с рекомбинантным мезотелином человека и макаки-крабоеда методом поверхностного плазмонного резонанса, оценку связывания плазматической мембраны с мезотелином человека и макаки-крабоеда, экспрессирующим линии клеток, с помощью конкуретного метода ИФА, и оценку блокады MSLN /MUC16 с помощью конкуретного метода ИФА. Результаты обобщены в таблицах 9–13.

Таблица 8. Производство scFv

| ID<br>(идентификационный номер) белка | Наименование   | Титр после захвата [мг/л] | Очищение    | Окончательный титр [мкг белка/мл, экспрессия] | Чистота SE-HPLC [% мономера] | nDSF: рассеяние в начале [°C] | nDSF: Тначало [°C] | nDSF: Тсред.1 [°C] |
|---------------------------------------|----------------|---------------------------|-------------|-----------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| PRO1783                               | 54-01-G02-sc01 | 78,5                      | Белок L/SEC | 11,3                                          | 97,2                         | НП                            | 59,0               | 65,2               |
| PRO2197                               | 54-01-G02-sc03 | 38,2                      | Белок L     | 30,0                                          | 99,2                         | НП                            | НП                 | НП                 |
| PRO1925                               | 54-32-A07-sc02 | 34,8                      | Белок А     | 26,3                                          | 94,7                         | НП                            | 53,7               | 58,5               |
| PRO1922                               | 54-21-H03-sc01 | НП                        | Белок L     | 22,2                                          | 98,7                         | 64,9                          | 60,8               | 69,9               |
| PRO2306                               | 54-32-A07-sc06 | 26,4                      | Белок L     | 23,9                                          | 97,9                         | 61,0                          | 51,8               | 61,7               |
| PRO2309                               | 54-32-A07-sc09 | 16                        | Белок L     | 14,7                                          | 90,3                         | 63,7                          | 53,4               | 62,3               |

\* чистота после захвата аффинности; SE-HPLC не выполняли

SEC: эксклюзионная хроматография

НП: неприменимо

**Таблица 9** Кинетика связывания и аффинность scFv антител к мезотелину PRO1783, PRO1922, PRO1925, PRO2306, PRO2309 и эталонного scFv антител к мезотелину PRO1795 к MSLN человека в SPR

| ID клона       | ID белка | Каркас | Стратегия трансплантации | Аффинность к MSLN человека при использовании SPR |                    |          |                                                                     |
|----------------|----------|--------|--------------------------|--------------------------------------------------|--------------------|----------|---------------------------------------------------------------------|
|                |          |        |                          | $k_a$                                            | $k_d$              | $K_D$    | Уровень связывания, приведенный к теоретическому значению $R_{max}$ |
|                |          |        |                          | [моль <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> ]            | [с <sup>-1</sup> ] | [моль]   | [%]                                                                 |
| 54-01-G02-sc01 | PRO1783  | VH3    | CDR                      | 7,80E+05                                         | 2,27E-03           | 2,91E-09 | 27,9                                                                |
| 54-22-H03-sc01 | PRO1795  | VH3    | CDR                      | 5,68E+05                                         | 1,83E-04           | 3,21E-10 | 36,2                                                                |
| 54-32-A07-sc02 | PRO1925  | VH3    | CDR                      | 1,63E+06                                         | 7,94E-04           | 4,88E-10 | 25,17                                                               |
| 54-21-H03-sc01 | PRO1922  | VH3    | CDR                      | 7,35E+05                                         | 1,30E-04           | 1,77E-10 | 26,77                                                               |
| 54-32-A07-sc06 | PRO2306  | VH3    | CDR                      | 2,72E+06                                         | 8,73E-04           | 3,22E-10 | 20,82                                                               |
| 54-32-A07-sc09 | PRO2309  | VH3    | CDR                      | 3,11E+06                                         | 1,38E-03           | 4,44E-10 | 20,49                                                               |

**Таблица 10:** Кинетика связывания и аффинность scFv антител к MSLN\_PRO1783 и эталонного scFv антител к мезотелину PRO1795 к MSLN макака-крабоведа при SPR

| Идент. номер клона | Идент. номер белка | Каркас | Стратегия трансплантации | Аффинность к MSLN макака-крабоведа при SPR |                    |          |                                                                     |
|--------------------|--------------------|--------|--------------------------|--------------------------------------------|--------------------|----------|---------------------------------------------------------------------|
|                    |                    |        |                          | $k_a$                                      | $k_d$              | $K_D$    | Уровень связывания, приведенный к теоретическому значению $R_{max}$ |
|                    |                    |        |                          | [моль <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> ]      | [с <sup>-1</sup> ] | [моль]   | [%]                                                                 |
| 54-01-G02-sc01     | PRO1783            | VH3    | CDR                      | 1,72E+06                                   | 5,27E-02           | 3,06E-08 | 17,4                                                                |
| 54-22-H03-sc01     | PRO1795            | VH3    | CDR                      | 1,02E+06                                   | 1,10E-03           | 1,08E-09 | 30,9                                                                |

**Таблица 11: Связывание плазматической мембраны scFv антител к MSLN PRO1783, PRO1922, PRO1925, PRO2306, PRO2309 и эталонного scFv антител к MSLN PRO1795 с линией клеток H226, экспрессирующей высокие уровни мезотелина человека**

| ID клона                                    | ID белка | Каркас | Стратегия трансплантации | Концентрация EC <sub>50</sub> [нмоль] | Связывание плазматической мембраны с клетками H226 при ИФА                                                            |                                                                                                       |
|---------------------------------------------|----------|--------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                             |          |        |                          |                                       | Отн. концентрация EC <sub>50</sub> (концентрация EC <sub>50</sub> , аматуксимаб/концентрация EC <sub>50</sub> , scFv) | Отн. максимальное связывание (OD <sub>450–690</sub> нм, scFv / OD <sub>450–690</sub> нм, аматуксимаб) |
| 54-01-G02-sc01                              | PRO1783  | VH3    | CDR                      | 1,44                                  | 0,16                                                                                                                  | 0,57                                                                                                  |
| 54-22-H03-sc01                              | PRO1795  | VH3    | CDR                      | 0,25                                  | 0,98                                                                                                                  | 0,71                                                                                                  |
| 54-21-H03-sc01                              | PRO1922  | VH3    | CDR                      | 0,29                                  | 0,52                                                                                                                  | 0,61                                                                                                  |
| 54-32-A07-sc02                              | PRO1925  | VH3    | CDR                      | 1,01                                  | 0,11                                                                                                                  | 0,58                                                                                                  |
| PRO1925-S14R-T87R-T22K (54-32-A07-sc06)     | PRO2306  | VH3    | CDR                      | 3,05                                  | 0,026                                                                                                                 | 0,55                                                                                                  |
| PRO1925-S14R-T87R-T22K-DIS (54-32-A07-sc09) | PRO2309  | VH3    | CDR                      | 1,13                                  | 0,07                                                                                                                  | 0,78                                                                                                  |

**Таблица 12: Связывание плазматической мембраны scFv антител к MSLN PRO1783 и эталонного scFv антител к мезотелину PRO1795 с линией клеток CHO, экспрессирующей MSLN макака-крабоведа**

| ID клона       | ID белка | Каркас | Стратегия трансплантации | Концентрация EC <sub>50</sub> [нмоль] | Связывание плазматической мембраны с клетками CHO, экспрессирующими MSLN макака-крабоведа                             |                                                                                                       |
|----------------|----------|--------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                |          |        |                          |                                       | Отн. концентрация EC <sub>50</sub> (концентрация EC <sub>50</sub> , аматуксимаб/концентрация EC <sub>50</sub> , scFv) | Отн. максимальное связывание (OD <sub>450–690</sub> нм, scFv / OD <sub>450–690</sub> нм, аматуксимаб) |
| 54-01-G02-sc01 | PRO1783  | VH3    | CDR                      | 12,00                                 | 0,03                                                                                                                  | 0,89                                                                                                  |
| 54-22-H03-sc01 | PRO1795  | VH3    | CDR                      | 0,76                                  | 0,7                                                                                                                   | 0,81                                                                                                  |

**Таблица 13: Блокада взаимодействия MSLN /MUC16 человека с помощью scFv антител к MSLN PRO1783, PRO1922, PRO1925 и эталонного scFv антител к MSLN PRO1795 при ИФА**

| Идент. номер клона | Идент. номер белка | Каркас | Стратегия трансплантации | Концентрация IC <sub>50</sub> [нмоль] | Блокада взаимодействия MSLN /MUC16 при ИФА                                                                            |                                                                    |
|--------------------|--------------------|--------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
|                    |                    |        |                          |                                       | Отн. концентрация IC <sub>50</sub> (концентрация IC <sub>50</sub> , аматуксимаб/концентрация IC <sub>50</sub> , scFv) | Максимальное ингибирование при максимальной концентрации пробы [%] |
| 54-01-G02-sc01     | PRO1783            | VH3    | CDR                      | 0,50                                  | 0,03                                                                                                                  | 99,2                                                               |
| 54-22-H03-sc01     | PRO1795            | VH3    | CDR                      | 0,02                                  | 0,87                                                                                                                  | 99,0                                                               |
| 54-21-H03-sc01     | PRO1922            | VH3    | CDR                      | 0,05                                  | 0,29                                                                                                                  | 99,3                                                               |
| 54-32-A07-sc02     | PRO1925            | VH3    | CDR                      | 0,14                                  | 0,11                                                                                                                  | 99,2                                                               |

Картирование эпитопов клона IgG кролика для антитела к MSLN 54-01-G02 (предшествующий клон с низкой аффинностью домена scFv антител к мезотелину PRO1783):

### **Связывание с вариантами мезотелина человека/мыши при помощи ИФА**

Для точного определения области связывания выбранных IgG кролика для антител к мезотелину уровень связывания с клетками HEK293T, временно трансфицированными с семью вариантами человека/мыши (с меткой V5) из внеклеточного домена (ECD) мезотелина, оценивали с помощью конкурентного метода ИФА (фиг. 4). Планшеты покрывали 25 000 клетками (для каждой лунки в плоскодонном 96-луночном планшете, обработанном поли-D-лизином). На следующий день клетки трансфицировали с соответствующими конструкциями и инкубировали при +37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Через 24 ч клетки промывали 450 мкл промывочного буфера (забуференного фосфатом физиологического раствора, 0,2 % бычьего сывороточного альбумина) и добавляли образцы (серийное разведение, 250 нг/мл антител к rIgG или метке V5) в течение 1,5 ч при комнатной температуре (RT) с осторожным перемешиванием. После 3 циклов промывки с помощью 450 мкл промывочного буфера в каждую лунку добавляли 50 мкл антител к IgG козла и кролика, сопряженных с пероксидазой хрена. После инкубации на качающемся смесителе при комнатной температуре в течение 1 ч планшеты промывали три раза с помощью 450 мкл промывочного буфера (для каждой лунки), а затем добавляли 50 мкл тетраметилбензидина (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, KPL, каталожный номер: 53-00-00). Через 10 мин развития ферментативную реакцию останавливали путем добавления в каждую лунку 50 мкл HCl (1 моль) и считывали результаты для планшета при 450 нм (при использовании 690 нм в качестве эталонной длины волны). Рассчитывали уровень связывания относительно связывания антитела к V5. Явное уменьшение уровня связывания rIgG со специфическим вариантом по сравнению с эталонным антителом (к метке V5) указывает локализацию эпитопа rIgG в сегменте



мезотелина человека, замененного на соответствующую последовательность для мыши.

Когда клоны IgG кролика для антитела к мезотелину 54-01-G02 (предшествующий клон с низкой аффинностью домена scFv к мезотелину PRO1783) проверяли с помощью конкурентного метода ИФА, было выявлено уменьшение связывания с химерным вариантом человека/мыши V1 (наиболее удаленная область внеклеточного домена мезотелина человека) (уменьшение до 65 % связывания относительно эталонного антитела к V5, таблица 14), при этом связывание 54-01-G02 со всеми остальными вариантами было выше 90 %. Эти данные указывают на то, что область мезотелина человека V1 представляет собой важную область для связывания 54-01-G02. Однако поскольку 54-01-G02 может по-прежнему связываться с мезотелином человека даже при отсутствии области V1, другие области внеклеточного домена мезотелина человека участвуют в связывании 54-01-G02 (таблица 14). Что касается IgG кролика 5422-N03 (предшествующий клон домена одноцепочечных Fv-фрагментов антител к мезотелину с высокой аффинностью PRO1795), область связывания не может быть идентифицирована с помощью конкурентного метода ИФА, используя химерные варианты человека/мыши для внеклеточного домена мезотелина человека (данные не показаны).

**Таблица 14: Общие сведения о связывании с клетками HEK293T клона IgG кролика 54-01-G02, трансфицированных с помощью вариантов MSLN человека/мыши**

Варианты трансфекции для ИФА – концентрация проверенных rIgG: 250 нг/мл

|           | h/mMSL<br>N -V1                             | h/mMSLN<br>-V2 | h/mMSLN<br>-V3 | h/mMSLN<br>-V4 | h/mMSLN<br>-V5 | h/mMSLN<br>-V6 | h/mMSLN<br>-V7 |
|-----------|---------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ID клона  | Связывание (%) [относительно антитела к V5] |                |                |                |                |                |                |
| 54-01-G02 | 65,0                                        | 93,7           | 98,8           | 93,3           | 101,0          | 101,3          | 104,0          |

**Пример 2: Генерация и испытание молекул антител к CD3:**

Идентификацию, выбор, гуманизацию, получение и определение характеристик гуманизированных доменов связывания антител к CD3 28-21-D09 sc04 выполняли, как описано в патентной заявке PCT/EP2018/064630, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

**Пример 3: Генерация и испытание молекул антител к hSA:**

Идентификацию, выбор, гуманизацию, получение и определение характеристик гуманизированных доменов связывания антител к hSA 19-01-H04-sc03 и 23-13-A01-sc03 выполняли, как описано в патентной заявке EP19206959.9, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Идентификацию, выбор, гуманизацию, а также получение и определение характеристик гуманизированного домена связывания антител к hSA 19-04-A10-sc02 (PRO2155) выполняли аналогично тому, как указано в патентной заявке EP19206959.9. Определение характеристик scFv антител к человеческому сывороточному альбумину PRO2155 кратко описано ниже.

**Определение характеристик scFv антител к hSA 19-04-A10-sc02 (PRO2155)***Аффинность связывания и межвидовая перекрестная реактивность*

Кинетику связывания (включая аффинность) выбранного домена 19-04-A10-sc02 с человеческим сывороточным альбумином (hSA, Sigma-Aldrich A3782) определяли методом SPR на устройстве T200 (Biacore, Cytiva) при уровнях pH 7,4 и pH 5,5. Молекулы человеческого сывороточного альбумина были ковалентно иммобилизованы с поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5, Biacore, Cytiva), серию титрований каждой молекулы hSA вводили в качестве анализируемого вещества. После каждого цикла введения анализируемого вещества повторно генерировали каждый канал

потока на сенсорном чипе (глицин, pH 2,0), а также вводили новую концентрацию молекулы одноцепочечного Fv-фрагмента. Кинетику связывания с hSA измеряли с помощью многоциклового кинетического анализа, с одиннадцатью концентрациями от 0,044 до 45 нмоль (1:2), разбавленными в соответствующем подвижном буфере (забуференном фосфатом физиологическом растворе 0,05 % Tween-20 или забуференном фосфатом физиологическом растворе 0,05 % Tween-20, pH 5,5). Кажущиеся константы скоростей диссоциации ( $k_d$ ) и ассоциации ( $k_a$ ), а также кажущуюся равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали с помощью программного обеспечения для анализа Biacore (программное обеспечение для оценки Biacore, версия 3.2, Cytiva) с помощью модели связывания Лэнгмюра «один к одному», при этом качество подгонки контролировали на основании относительного значения Chi2. Уровень связывания рассчитывали как связывание с максимальной стабильностью, достигнутое и приведенное к теоретическому значению  $R_{max}$ .

Кинетику связывания выбранного scFv также определяли для сывороточного альбумина макака-крабоеда (cSA, Molecular Innovations CYSA) и для сывороточного альбумина мыши (mSA, Sigma-Aldrich A3559), как описано выше, с той разницей, что вместо человеческого сывороточного альбумина использовали сывороточный альбумин макака-крабоеда или мыши. Общие сведения о кинетике связывания с сывороточным альбумином человека, мыши и макака-крабоеда при уровнях pH 5,5 и pH 7,4 приведены в таблице 15.

**Таблица 15: Общие сведения об измеренных значениях аффинности к hSA, cSA и mSA для молекулы scFv, связывающейся с сывороточным альбумином PRO2155 (домен 19-04-A10-sc02)**

| ID белка | Описание белка | Уровень pH во время испытания | Антиген | $k_a$ (1/моль-с) | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (моль) |
|----------|----------------|-------------------------------|---------|------------------|-------------|--------------|
| PRO2155  | 19-04-A10-sc02 | pH 5,5                        | cSA     | 9,1E+05          | 2,1E-03     | 2,3E-09      |
| PRO2155  | 19-04-A10-sc02 | pH 5,5                        | hSA     | 9,0E+05          | 3,0E-03     | 3,3E-09      |
| PRO2155  | 19-04-A10-sc02 | pH 5,5                        | mSA     | 7,8E+04          | 2,0E-04     | 2,5E-09*     |

|         |                |        |     |         |         |          |
|---------|----------------|--------|-----|---------|---------|----------|
| PRO2155 | 19-04-A10-sc02 | pH 7,4 | cSA | 5,8E+05 | 9,1E-04 | 1,6E-09  |
| PRO2155 | 19-04-A10-sc02 | pH 7,4 | hSA | 5,5E+05 | 1,2E-03 | 2,2E-09  |
| PRO2155 | 19-04-A10-sc02 | pH 7,4 | mSA | 3,2E+04 | 2,9E-04 | 9,0E-09* |

\* двухфазное связывание было скорректировано с учетом общей коррекции при подгонке 1:1, приводящей к меньшим максимальным ответам

### *Определение биофизических характеристик*

Домены HSA19-04-A10-sc02 (PRO2155) и 19-04-A10-sc06 (домен sc02 с дисульфидом VL-VH, VL-T141C/VH-G51C, система нумерации АНо; PRO2317) подвергали четырехнедельному исследованию стабильности, в котором scFv получали в водном растворе (50 ммоль NaClP, 150 ммоль NaCl, pH 6,4) при 10 мг/мл, которые хранили при температурах  $< -80^{\circ}\text{C}$ ,  $+4^{\circ}\text{C}$  и  $+40^{\circ}\text{C}$  в течение четырех недель. Фракции мономеров и олигомеров в составе оценивали с помощью площадей пика эксклюзионной ВЭЖХ в разные моменты исследования. В таблице 16 приведены общие сведения о содержании мономеров (в %) и потерь мономеров (в %) относительно дня 0. Изменения концентрации белка проверяли во время исследования с помощью спектрометрии UV-Vis при длине волны 280 нм. Поскольку ни для одного из образцов заметных потерь содержания белка относительно дня 0 обнаружено не было, данные не показаны. Термостабильность анализировали с помощью нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (NanoTemper), определяющей начало ( $T_{\text{начало}}$ ) и середину разворачивания ( $T_{\text{сер.}}$ ). Результаты дифференциальной сканирующей флуориметрии представлены в таблице 16.

**Таблица 16: Четырехнедельное исследование стабильности доменов антител к hSA 19-04-A10-sc02 и 19-04-A10-sc06**

| ID белка | Наименование   | Температура [°C] | Концентрация [мг/мл] | Содержание мономера [%] |        |        |         |         | Потери мономеров [%] |        |         | Тсер. [°C] |      |
|----------|----------------|------------------|----------------------|-------------------------|--------|--------|---------|---------|----------------------|--------|---------|------------|------|
|          |                |                  |                      | День 0                  | День 1 | День 7 | День 14 | День 28 | День 1               | День 7 | День 14 | День 28    |      |
| PRO2155  | 19-04-A10-sc02 | -80              | 10,4                 | 99,4                    | НИ     | НИ     | НИ      | 99,5    | НИ                   | НИ     | НИ      | -0,1       | 75,3 |
|          |                | 4,0              |                      | 99,4                    | 99,4   | НИ     | НИ      | 99,1    | 0,1                  | НИ     | НИ      | 0,3        |      |
|          |                | 40,0             |                      | 99,4                    | 98,6   | НИ     | НИ      | 89,1    | -0,8                 | НИ     | НИ      | 10,4       |      |
| PRO2317  | 19-04-A10-sc06 | 40,0             | 10,5                 | 99,2                    | 98,8   | 98,7   | 98,6    | 98,4    | 0,4                  | 0,6    | 0,7     | 0,9        | 78,4 |

НИ: не измерялось

**Пример 4: Генерация и определение фармакодинамических характеристик мультиспецифических конструкторов по настоящему изобретению (конструкторы biMSLN<sub>низкая аффинность</sub> x CD3 x hSA):**

**Архитектура молекулы**

MATCH – формат, изобретенный компанией Numab, который состоит исключительно из переменных доменов, соединенных с помощью разных линкеров для обеспечения специфического спаривания совместимых пар доменов (Egan TJ *et al.*, Novel multi-specific heterodimeric antibody format allowing modular assembly of variable domain fragments. MABS 9 (2017) 68-84). В частности, данный формат отлично подходит для удобного скрининга различных комбинаций антигенсвязывающих доменов для обеспечения оптимальной кооперативности. MATCH можно рекомбинантно экспрессировать из клеток млекопитающих. Для очищения можно использовать стандартный этап аффинной хроматографии.

Архитектура молекул MATCH представлена на фиг. 5. Формат MATCH4 требует, чтобы димерные субъединицы состояли из ядра из 2 пар разделенных переменных доменов, каждая из которых представляет собой соответствующую субъединицу, имеющую 2 домена VL или 2 домена VH, расположенных в тандеме, что обеспечивает управление гетеродимеризацией двух цепей белков. Тандемные переменные домены, сформированные димером в соответствующих цепях MATCH4, организованы во встречно-параллельной ориентации N-конец-С-конец, как и их соответствующая цепь. Обе цепи совместно экспрессируются в клетках млекопитающих в полностью функциональные тетраспецифические молекулы. Стандартные глицин-сериновые линкеры между переменными доменами были использованы для их соединения в соответствии с фиг. 5. Обычно в молекулах MATCH использовали разные длины линкеров (см. перечень последовательностей молекул MATCH в

таблице 5). Кроме того, встречно-параллельный формат MATCH4 может быть использован для введения дисульфидного мостика в один из ядерных доменов, как указано на фиг. 5. Соответствующий формат MATCH3 (не показан) сконструирован и организован аналогичным образом, за исключением того, что только один домен связывания одноцепочечных Fv-фрагментов прикреплен к ядру двух пар разделенных переменных доменов (вместо двух доменов связывания одноцепочечных Fv-фрагментов, как в случае с форматом MATCH4).

Аналогично форматам MATCH4 и MATCH3 формат scMATCH3 состоит только из переменных доменов, соединенных с помощью разных линкеров, как показано на фиг. 5 (справа). Однако в данном формате разделенные переменные домены расположены в одной пептидной цепи (sc), которые собираются в полностью функциональные триспецифические молекулы, как показано на фиг. 5 (справа). Как и в формате MATCH4 и MATCH3, молекулы scMATCH3 могут быть рекомбинантно экспрессированы в клетках млекопитающих, при этом для их очищения можно использовать стандартный этап аффинной хроматографии.

Объединяя два-три антитела кроликов, гуманизированных с помощью  $\lambda$ -экспрессированного каркаса Fv-фрагмента, были созданы встречно-параллельные тетраспецифические молекулы MATCH4 по настоящему изобретению и эталонные триспецифические молекулы scMATCH3, имеющие только один домен MSLN-BD с высокой аффинностью, как указано в таблице 17.

## **Производство**

Экспрессию конструкторов MATCHN выполняли в клетках CHO-S с помощью набора для временной трансфекции CHOgro (Mirus). Культуры собирали через 5–7 суток (доля жизнеспособных клеток < 70 %) после экспрессии при +37 °C путем центрифугирования, а белки очищали от осветленного супернатанта клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии белка L или A с

последующим (при необходимости) этапом очистки методом эксклюзионной хроматографии (SEC) с помощью колонки Superdex S200 в 50 ммоль фосфатно-цитратного буфера с 300 ммоль сукрозы при уровне pH 6,5. Содержание мономеров во фракциях после эксклюзионной хроматографии оценивали методом эксклюзионной ВЭЖХ, при этом были объединены фракции с содержанием мономеров > 95 %. Для контроля качества произведенного материала использовали стандартные аналитические методы, например, эксклюзионную ВЭЖХ (SE-HPLC), ультрафиолетовый метод UV<sub>280</sub> и электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Производственные данные о полученных молекулах обобщены в таблице 18.

### **Определение фармакодинамических характеристик мультиспецифических антител**

В следующем разделе описано определение характеристик иллюстративных примеров мультиспецифических молекул, которые являются моновалентными или бивалентными для мезотелина человека, моновалентными для CD3ε человека и моновалентными для человеческого сывороточного альбумина (hSA). Бивалентные антитела к мезотелину PRO2000, PRO2100, PRO2562, PRO2566, PRO2567 и PRO2660 (т. е. biMSLN<sub>низкая</sub>CD3<sub>х</sub>hSA) и моновалентное антитело к мезотелину PRO1872 (т. е. MSLN<sub>низкая</sub>CD3<sub>х</sub>hSA) проверяли с помощью SPR для оценки их кинетики связывания и аффинности к рекомбинантному мезотелину и CD3ε человека с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса.

#### Аффинность к MSLNчеловека при SPR

Аффинность мультиспецифических антител к мезотелину к рекомбинантному мезотелину человека определяли с помощью метода SPR на устройстве T200



(Biacore, GE Healthcare). В данном эксперименте рекомбинантный мезотелин человека (приобретенный в Reprotech) был иммобилизован на сенсорном чипе CM5, как показано выше. Мультиспецифические антитела вводили в проточные кюветы, а кинетику связывания и равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали, как указано выше.

Аффинность мультиспецифических антител к мезотелину к рекомбинантному мезотелину человека при отсутствии авидности определяли с помощью метода SPR на устройстве T200 (Biacore, GE Healthcare). В данном эксперименте запатентованный каркас антител к IgG кролика (PRO2679) был иммобилизован на сенсорном чипе CM5, как указано выше. Мультиспецифические антитела захватывали в соответствующих проточных кюветах путем введения в течение 20 секунд. Затем рекомбинантный мезотелин человека (приобретенный в компании Reprotech) вводили в проточные кюветы, а кинетику связывания и равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали, как указано выше.

Как показано в таблице 19, моновалентное антитело к мезотелину PRO1872 было связано с рекомбинантным мезотелином человека с помощью метода SPR с аффинностью связывания в субнанолярном диапазоне ( $K_D = 0,187$  нмоль). Аналогичная аффинность связывания к мезотелину человека была обнаружена для соответствующего scFv антител к мезотелину PRO1795 ( $K_D = 0,321$  нмоль, домен 54-22-H03-sc01, данные не показаны). Бивалентное антитело к мезотелину PRO2000 продемонстрировало аффинность связывания к рекомбинантному мезотелину человека в нижнем нанолярном диапазоне ( $K_D = 1,06$  нмоль), что превосходит аффинность связывания к scFv соответствующих антител к мезотелину PRO1783 ( $K_D = 2,91$  нмоль, домен 54-01-G02-sc01, таблица 9). В данном анализе PRO2562, PRO2566 и PRO2567 продемонстрировали очень похожую аффинность к мезотелину человека со значениями  $K_D$  в нижнем нанолярном диапазоне от 1,39 до 1,52 нмоль.

### Аффинность к CD3ε человека при SPR

Аффинность мультиспецифических антител к мезотелину к рекомбинантному CD3ε человека определяли с помощью метода SPR на устройстве T200 (Biacore, GE Healthcare). В данном эксперименте рекомбинантный белок CD3ε человека (Sino Biological) был иммобилизован на сенсорном чипе CM5 (GE healthcare) по аминогруппе. Серийное разведение мультиспецифических антител к мезотелину в буфере HBS-T+ (10 ммоль HEPES, 150 ммоль NaCl и 0,05 % Tween 20, pH 7,4) выполняли в проточных кюветах при расходе 30 мкл/мин в течение 5 мин. Диссоциация антител от CD3ε на чипе CM5 проходила в течение 12 мин. После каждого цикла введения поверхности регенерировали с помощью одного введения 10 ммоль глицина и HCl, уровень pH 2. Кажущиеся константы скоростей диссоциации ( $k_d$ ) и ассоциации ( $k_a$ ), а также кажущуюся равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали с помощью программного обеспечения для анализа Biacore (программное обеспечение для оценки (BIAevaluation, GE Healthcare) с помощью модели связывания Лэнгмюра «один к одному», при этом качество подгонки контролировали на основании значения Chi2 и значения U, которое являлось мерой качества подгонки кривой. Поскольку при подгонке с помощью модели связывания Лэнгмюра «один к одному» качество подгонки кривых было неоптимальным, константу  $K_D$  дополнительно рассчитывали с использованием двухуровневой модели реакции. Данная модель описывает связывание анализируемого вещества с иммобилизованным лигандом в отношении 1:1, после которого выполняется конформационное изменение, стабилизирующее комплекс.

Как показано в таблице 20, моновалентные антитела к мезотелину PRO1872 и PRO2000 для CD3ε и имеющие один домен антител к CD3 (28-21-D09-sc04) были связаны с рекомбинантным CD3ε человека при использовании метода поверхностного плазмонного резонанса с одинаковой аффинностью связывания в наномолярном диапазоне (PRO1872,  $K_D = 12,1$  нмоль; PRO2000,  $K_D$

= 20,0 нмоль). PRO2562, PRO2566, PRO2567 и PRO2660 показали немного лучшую аффинность к рекомбинантному CD3ε человека при константе  $K_D$  в нижнем наномолярном диапазоне от 2,97 до 6,45 нмоль.

Аффинность к человеческому сывороточному альбумину при уровне pH 5,5 при использовании метода поверхностного плазмонного резонанса

Кинетику связывания с человеческим сывороточным альбумином (hSA, Sigma Aldrich, каталожный номер: A3782) оценивали с помощью метода SPR на устройстве T200 (Biacore, GE Healthcare). Человеческий сывороточный альбумин был иммобилизован на сенсорном чипе (сенсорном чипе CM5, GE healthcare) по аминокислотной группе. Серийное разведение мультиспецифических антител к мезотелину в диапазоне от 0,7 до 180 нмоль, разбавленных в подвижном буфере (забуференном фосфате физиологического раствора – Tween20) при уровне pH 5,5, выполняли в проточных кюветах в течение 5 мин. Время диссоциации было установлено равным 12 мин. Кажущиеся константы скоростей диссоциации ( $k_d$ ) и ассоциации ( $k_a$ ), а также кажущуюся равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали с помощью модели связывания Лэнгмюра «один к одному», как указано выше.

Как показано в таблице 21, антитела к мезотелину PRO1872 (домен антител к человеческому сывороточному альбумину: 23-13-A01-sc02) были связаны с рекомбинантным hSA с помощью метода SPR с аффинностью связывания в субнаномолярном диапазоне ( $K_D = 0,175$  нмоль). PRO2562, PRO2566, PRO2567 и PRO2660 показали немного меньшую аффинность к рекомбинантному человеческому сывороточному альбумину при константе  $K_D$  в нижнем наномолярном диапазоне от 5,71 до 8,80 нмоль.

Таблица 17: Архитектура молекул MATCH4 и эталонные молекулы scMATCH3

| PRO ID  | Формат | Домен 1             | Специ-<br>фичность 1 | Домен 2                           | Специ-<br>фичность 2 | Домен 3                  | Специ-<br>фичность 3 | Домен 4             | Специфичность 4 |
|---------|--------|---------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| PRO2000 | MATCH4 | 54-01-G02-sc01      | MSLN                 | 23-13-A01-sc02, VL-G141C/VH-G51C* | hSA                  | 28-21-D09-sc04           | CD3                  | 54-01-G02-sc01      | MSLN            |
| PRO2100 | MATCH4 | 54-01-G02-sc01 N66A | MSLN                 | 23-13-A01-sc02, VL-G141C/VH-G51C* | hSA                  | 28-21-D09-sc04           | CD3                  | 54-01-G02-sc01 N66A | MSLN            |
| PRO2323 | MATCH4 | 54-32-A07-sc06      | MSLN                 | 19-04-A10-sc06                    | hSA                  | 28-21-D09-sc04           | CD3                  | 54-32-A07-sc06      | MSLN            |
| PRO2417 | MATCH4 | 54-32-A07-sc06      | MSLN                 | 19-04-A10-sc06                    | hSA                  | 28-21-D09-sc04           | CD3                  | 54-32-A07-sc06      | MSLN            |
| PRO2424 | MATCH4 | 54-32-A07-sc06      | MSLN                 | 19-04-A10-sc06, VL-S95C*          | hSA                  | 28-21-D09-sc04, VH-N94C* | CD3                  | 54-32-A07-sc06      | MSLN            |
| PRO2434 | MATCH4 | 54-32-A07-sc06      | MSLN                 | 19-04-A10-sc06                    | hSA                  | 28-21-D09-sc04           | CD3                  | 54-32-A07-sc06      | MSLN            |
| PRO2436 | MATCH4 | 54-32-A07-sc06      | MSLN                 | 19-04-A10-sc06                    | hSA                  | 28-21-D09-sc04           | CD3                  | 54-32-A07-sc06      | MSLN            |
| PRO2559 | MATCH4 | 54-32-A07-sc06      | MSLN                 | 19-04-A10-sc06, VL-S95C*          | hSA                  | 28-21-D09-sc04, VH-N94C* | CD3                  | 54-32-A07-sc06      | MSLN            |
| PRO2560 | MATCH4 | 54-32-A07-sc06      | MSLN                 | 19-04-A10-sc06, VL-S95C*          | hSA                  | 28-21-D09-sc04, VH-N94C* | CD3                  | 54-32-A07-sc06      | MSLN            |
| PRO2562 | MATCH4 | 54-32-A07-sc09      | MSLN                 | 19-04-A10-sc06, VL-S95C*          | hSA                  | 28-21-D09-sc04, VH-N94C* | CD3                  | 54-32-A07-sc09      | MSLN            |

|             |        |                                                     |      |                                                                   |      |                                                      |      |                                                     |      |
|-------------|--------|-----------------------------------------------------|------|-------------------------------------------------------------------|------|------------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------------|------|
| PRO256<br>3 | MATCH4 | 54-32-<br>A07-sc09                                  | MSLN | 19-04-A10-<br>sc06                                                | hSA  | 28-21-D09-<br>sc04                                   | CD3  | 54-32-<br>A07-sc09                                  | MSLN |
| PRO256<br>4 | MATCH4 | 28-21-<br>D09-sc04                                  | CD3  | 19-04-A10-<br>sc06                                                | hSA  | 54-32-A07-<br>sc06                                   | MSLN | 54-32-<br>A07-sc09                                  | MSLN |
| PRO256<br>5 | MATCH4 | 28-21-<br>D09-sc04                                  | CD3  | 19-04-A10-<br>sc06                                                | hSA  | 54-32-A07-<br>sc06                                   | MSLN | 54-32-<br>A07-sc09                                  | MSLN |
| PRO256<br>6 | MATCH4 | 54-32-<br>A07-sc09                                  | MSLN | 54-32-A07-<br>sc09                                                | MSLN | 28-21-D09-<br>sc04                                   | CD3  | 19-04-<br>A10-sc02                                  | hSA  |
| PRO256<br>7 | MATCH4 | 54-32-<br>A07-sc09                                  | MSLN | 54-32-A07-<br>sc09                                                | MSLN | 28-21-D09-<br>sc04                                   | CD3  | 19-04-<br>A10-sc02                                  | hSA  |
| PRO256<br>9 | MATCH4 | 54-32-<br>A07-sc09                                  | MSLN | 19-04-A10-<br>sc06                                                | hSA  | 28-21-D09-<br>sc04                                   | CD3  | 54-32-<br>A07-sc09                                  | MSLN |
| PRO266<br>0 | MATCH4 | 54-21-<br>H03-sc01                                  | MSLN | 19-04-A10-<br>sc06                                                | hSA  | 28-21-D09-<br>sc04                                   | CD3  | 54-21-<br>H03-sc01                                  | MSLN |
| PRO274<br>1 | MATCH4 | 54-21-<br>H03-sc01,<br>VH-L12R,<br>V103T,<br>L144Q* | MSLN | 19-04-A10-<br>sc06, VH-<br>L12R,<br>V103T,<br>L144Q*              | hSA  | 28-21-D09-<br>sc04, VH-<br>L12R,<br>L144Q*           | CD3  | 54-21-<br>H03-sc01,<br>VH-L12R,<br>V103T,<br>L144Q* | MSLN |
| PRO274<br>4 | MATCH4 | 54-32-<br>A07-sc09,<br>VH-L12R,<br>V103T,<br>L144Q* | MSLN | 19-04-A10-<br>sc06, VL-<br>S95C/VH-<br>L12R,<br>V103T,<br>L144Q * | hSA  | 28-21-D09-<br>sc04, VH-<br>L12R,<br>N94C,<br>L144Q * | CD3  | 54-32-<br>A07-sc09,<br>VH-L12R,<br>V103T,<br>L144Q* | MSLN |
| PRO274<br>5 | MATCH4 | 54-32-<br>A07-sc09,<br>VH-L12R,<br>V103T,<br>L144Q* | MSLN | 54-32-A07-<br>sc09, VH-<br>L12R,<br>V103T,<br>L144Q*              | MSLN | 28-21-D09-<br>sc04, VH-<br>L12R,<br>L144Q*           | CD3  | 19-04-<br>A10-sc02,<br>VH-L12R,<br>V103T,<br>L144Q* | hSA  |
| PRO274<br>6 | MATCH4 | 54-32-<br>A07-sc09,<br>VH-L12R,                     | MSLN | 54-32-A07-<br>sc09, VH-<br>L12R,                                  | MSLN | 28-21-D09-<br>sc04, VH-<br>L12R,<br>L144Q*           | CD3  | 19-04-<br>A10-sc02,<br>VH-L12R,                     | hSA  |

|             |              |                                        |     |                                                                   |     |                    |      |                        |    |
|-------------|--------------|----------------------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------|-----|--------------------|------|------------------------|----|
| PRO187<br>2 | scMATCH<br>3 | V103T,<br>L144Q*<br>28-21-<br>D09-sc04 | CD3 | V103T,<br>L144Q*<br>23-13-A01-<br>sc02, VL-<br>G141C/VH<br>-G51C* | hSA | 54-22-H03-<br>sc01 | MSLN | V103T,<br>L144Q*<br>НП | НП |
|-------------|--------------|----------------------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------|-----|--------------------|------|------------------------|----|

\*Система нумерации АНО

**Таблица 18. Производство молекул MATCH4**

| ID белка | Титр после захвата<br>[мг/л] | Этап очистки | Окончательный титр<br>[мг/л] | Чистота при SE-HPLC<br>[% мономеров] |
|----------|------------------------------|--------------|------------------------------|--------------------------------------|
| PRO2000  | 21,3                         | SEC          | 10,7                         | 97,9                                 |
| PRO2100  | 17,6                         | НП           | 15,6                         | 97,1                                 |
| PRO2562  | 13,0                         |              | 5,9                          | 96,8                                 |
| PRO2660  | 28,8                         | SEC          | 16,0                         | 98,1                                 |
| PRO2566  | 14,0                         | SEC          | 2,5                          | 95,9                                 |
| PRO2567  | 22,6                         | SEC          | 3,5                          | 97,4                                 |
| PRO2741  | 23,4                         | SEC          | 6,0                          | 97,8                                 |
| PRO2745  | 9,4                          | SEC          | 1,2                          | 97,4                                 |
| PRO2746  | 10,7                         | SEC          | 2,6                          | 98,3                                 |
| PRO2563  | 22,6                         | SEC          | 7,1                          | 96,5                                 |
| PRO2564  | 17,8                         | SEC          | 6,0                          | 97,8                                 |
| PRO2565  | 21,8                         | SEC          | 7,0                          | 96,9                                 |
| PRO2569  | 22,4                         | SEC          | 4,9                          | 97,4                                 |
| PRO2323  | 33,4                         | SEC          | 5,8                          | 99,1                                 |
| PRO2434  | 27,8                         | SEC          | 5,2                          | 98,6                                 |
| PRO2436  | 17,5                         | SEC          | 1,3                          | 96,8                                 |
| PRO2424  | 22,2                         | SEC          | 11,5                         | 99,1                                 |
| PRO2559  | 32,2                         | SEC          | 9,0                          | 97,9                                 |
| PRO2560  | 18,8                         | SEC          | 6,2                          | 96,8                                 |

SEC: эксклюзионная хроматография; НП: неприменимо

**Таблица 19: Кинетика связывания и аффинность к MSLN человека методом SPR для иллюстративных примеров мультиспецифических антител к мезотелину**

| PRO ID  | Формат   | Домен антитела к мезотелину | Аффинность к мезотелину человека при использовании метода поверхностного плазмонного резонанса |                                      |                          | Уровень связывания, приведенный к теоретическому значению R <sub>max</sub> |
|---------|----------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
|         |          |                             | k <sub>a</sub><br>[моль <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> ]                                        | k <sub>d</sub><br>[с <sup>-1</sup> ] | K <sub>D</sub><br>[моль] |                                                                            |
| PRO1872 | scMATCH3 | 54-22-H03-sc01              | 2,65E+05                                                                                       | 4,96E-05                             | 1,87E-10                 | 25,3                                                                       |
| PRO2000 | MATCH4   | 54-01-G02-sc01              | 3,98E+05                                                                                       | 4,21E-04                             | 1,06E-09                 | 10,5                                                                       |
| PRO2562 | MATCH4   | 54-32-A07-sc09              | 4,10E+05                                                                                       | 5,71E-04                             | 1,39E-09                 | 38,8                                                                       |
| PRO2566 | MATCH4   | 54-32-A07-sc09              | 4,00E+05                                                                                       | 6,08E-04                             | 1,52E-09                 | 39,2                                                                       |
| PRO2567 | MATCH4   | 54-32-A07-sc09              | 4,11E+05                                                                                       | 5,78E-04                             | 1,41E-09                 | 39,8                                                                       |
| PRO2660 | MATCH4   | 54-21-H03-sc01              | не измерялось                                                                                  |                                      |                          |                                                                            |

**Таблица 20: Кинетика связывания и аффинность к CD3ε человека методом SPR для иллюстративных примеров мультиспецифических антител к мезотелину**

| PRO ID  | Формат   | Домен антитела к мезотелину | Аффинность к CD3ε человека методом SPR                    |                                        |                          | Уровень связывания, приведенный к теоретическому значению R <sub>max</sub> |
|---------|----------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
|         |          |                             | k <sub>a</sub> *<br>[моль <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> ] | k <sub>d</sub> *<br>[с <sup>-1</sup> ] | K <sub>D</sub><br>[моль] |                                                                            |
| PRO1872 | scMATCH3 | 54-22-H03-sc01              | 2,93<br>E+05                                              | 5,08<br>E-03                           | 1,21E-08                 | 28,7                                                                       |
| PRO2000 | MATCH4   | 54-01-G02-sc01              | 1,17<br>E+05                                              | 3,91<br>E-03                           | 2,00E-08                 | 27,6                                                                       |

|         |        |                |          |
|---------|--------|----------------|----------|
| PRO2562 | MATCH4 | 54-32-A07-sc09 | 6,45E-09 |
| PRO2566 | MATCH4 | 54-32-A07-sc09 | 2,97E-09 |
| PRO2567 | MATCH4 | 54-32-A07-sc09 | 4,78E-09 |
| PRO2660 | MATCH4 | 54-21-H03-sc01 | 5,71E-09 |

\* $k_a$  и  $k_d$  относятся к  $k_{a1}$  и  $k_{d1}$  из двухуровневой модели подгонки, при этом  $k_{a2}$  и  $k_{d2}$ , а также  $K_D1$  и  $K_D2$  пропущены для ясности

**Таблица 21: Кинетика связывания и аффинность к hSA при pH 5,5 методом SPR для иллюстративных примеров мультиспецифических антител к мезотелину**

| PRO ID  | Формат   | Домен антитела<br>к мезотелину | Аффинность к hSA при pH 5,5 методом SPR        |                             |                 | Уровень связывания,<br>приведенный к<br>теоретическому<br>значению Rmax |
|---------|----------|--------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|
|         |          |                                | $k_a$<br>[моль <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> ] | $k_d$<br>[с <sup>-1</sup> ] | $K_D$<br>[моль] |                                                                         |
| PRO1872 | scMATCH3 | 54-22-H03-sc01                 | 3,66E+05                                       | 6,39E-05                    | 1,75E-10        | 71,2                                                                    |
| PRO2562 | MATCH4   | 54-32-A07-sc09                 | 2,31E+05                                       | 1,49E-03                    | 6,45E-09        | 57,98                                                                   |
| PRO2566 | MATCH4   | 54-32-A07-sc09                 | 5,79E+05                                       | 3,99E-03                    | 6,89E-09        | 58,18                                                                   |
| PRO2567 | MATCH4   | 54-32-A07-sc09                 | 5,15E+05                                       | 4,53E-03                    | 8,80E-09        | 58,24                                                                   |
| PRO2660 | MATCH4   | 54-21-H03-sc01                 | 2,80E+05                                       | 1,60E-03                    | 5,71E-09        | 51,78                                                                   |
| PRO2000 | MATCH4   | 54-01-G02-sc01                 | не измерялось                                  |                             |                 |                                                                         |



## Определение биофизических характеристик иллюстративных примеров молекул MATCH4

*Стабильность при хранении и температура плавления, определенные с помощью нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (nDSF)*

Молекулы MATCH4 подвергали 28-дневному исследованию стабильности, в котором молекулы получали в водном буферном растворе (50 ммоль фосфатно-цитратного буфера с 300 ммоль сукрозы при уровне pH 6,5) при 1 мг/мл, которые хранили при температурах  $< -80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 28 суток. Фракцию мономеров и олигомеров в составе оценивали с помощью площадей пика эксклюзионной ВЭЖХ в разные моменты исследования. В таблице 22 приведены общие сведения о содержании мономеров (в %) и потерь мономеров (в %) относительно дня 0. Изменения концентрации белка проверяли во время исследования с помощью спектрометрии UV-Vis при длине волны 280 нм и показаны в таблице 23. Термостабильность анализировали с помощью нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (NanoTemper), определяющей начало ( $T_{\text{начало}}$ ) и середину разворачивания ( $T_{\text{сер.}}$ ), а также температуру в начале рассеяния. Полученные значения  $T_{\text{сер.}}$ , включая среднеквадратическое отклонение (SD) вторых/третьих измерений, представлены в таблице 24.

Все четыре молекулы MATCH4 имеют хорошие показатели стабильности и лишь небольшие потери содержания мономеров или содержания белков после инкубации в течение 28 суток. Заметных изменений содержания мономеров при температурах  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а также при многократном замораживании-оттаивании (5 раз), которое выполняли для образца на день 28 ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) перед измерением методом эксклюзионной ВЭЖХ/ультрафиолетовым методом, обнаружено не было.

**Таблица 22: Оценка стабильности при хранении молекул MATCH4 при 1 мг/мл (28 суток), изменение содержания мономеров, определенное методом SE-HPLC (эксклюзионной ВЭЖХ)**

| ID белка | Температура [°C] | Концентрация [мг/мл] | Содержание мономеров [%] |        |        |         |         |          | Потери содержания мономеров [%] |        |         |         |          |
|----------|------------------|----------------------|--------------------------|--------|--------|---------|---------|----------|---------------------------------|--------|---------|---------|----------|
|          |                  |                      | День 0                   | День 1 | День 7 | День 14 | День 21 | День 28* | День 1                          | День 7 | День 14 | День 21 | День 28* |
| PRO2562  | –80              | 1,00                 | 96,78                    | НП     | НП     | НП      | НП      | 97,16    | НП                              | НП     | НП      | НП      | -0,39    |
| PRO2562  | 4                | 1,00                 | 96,78                    | 96,90  | 97,04  | НП      | 97,23   | 97,00    | -0,12                           | -0,27  | НП      | -0,46   | -0,23    |
| PRO2562  | 40               | 1,00                 | 96,78                    | 96,61  | 96,69  | НП      | 96,10   | 95,42    | 0,18                            | 0,09   | НП      | 0,70    | 1,41     |
| PRO2566  | –80              | 0,95                 | 95,33                    | НП     | НП     | НП      | НП      | 96,54    | НП                              | НП     | НП      | НП      | -1,27    |
| PRO2566  | 4                | 0,95                 | 95,33                    | 95,62  | 95,69  | НП      | 96,34   | 96,17    | -0,30                           | -0,38  | НП      | -1,06   | -0,88    |
| PRO2566  | 40               | 0,95                 | 95,33                    | 95,29  | 93,60  | НП      | 91,41   | 89,37    | 0,04                            | 1,81   | НП      | 4,11    | 6,25     |
| PRO2567  | –80              | 1,01                 | 97,24                    | НП     | НП     | НП      | НП      | 98,01    | НП                              | НП     | НП      | НП      | -0,79    |
| PRO2567  | 4                | 1,01                 | 97,24                    | 97,45  | 97,61  | НП      | 97,87   | 97,82    | -0,22                           | -0,38  | НП      | -0,65   | -0,60    |
| PRO2567  | 40               | 1,01                 | 97,24                    | 97,09  | 96,16  | НП      | 95,18   | 94,04    | 0,15                            | 1,11   | НП      | 2,12    | 3,29     |
| PRO2660  | –80              | 0,93                 | 98,89                    | НП     | НП     | НП      | НП      | 99,21    | НП                              | НП     | НП      | НП      | -0,32    |
| PRO2660  | 4                | 0,93                 | 98,89                    | 99,16  | 99,15  | 99,02   | НП      | 98,68    | -0,27                           | -0,26  | -0,13   | НП      | 0,21     |
| PRO2660  | 40               | 0,93                 | 98,89                    | 99,25  | 97,57  | 97,15   | НП      | 95,90    | -0,36                           | 1,33   | 1,76    | НП      | 3,02     |

\* 5 циклов замораживания-оттаивания выполняли на образцах, которые хранили при –80 °C в течение 28 суток перед измерением, а низкомолекулярные соединения в образцах при +40 °C не были введены, поскольку пики нельзя было восстановить из свертки (полупик)

**Таблица 23: оценка стабильности при хранении молекул MATCH4 при 1 мг/мл (28 суток), изменение содержания белков, определенное UV (ультрафиолетовым методом) (280 нм)**

| ID белка | Температура [°C] | Концентрация белков [мг/мл] |        |        |         |         |         | Потеря содержания [%] |        |         |         |         |
|----------|------------------|-----------------------------|--------|--------|---------|---------|---------|-----------------------|--------|---------|---------|---------|
|          |                  | День 0                      | День 1 | День 7 | День 14 | День 21 | День 28 | День 1                | День 7 | День 14 | День 21 | День 28 |
| PRO2562  | –80              | 1,00                        | НП     | НП     | НП      | НП      | 0,97    | НП                    | НП     | НП      | НП      | 2,20    |
| PRO2562  | 4                | 1,00                        | НП     | 0,93   | НП      | 0,94    | 1,00    | НП                    | 6,60   | НП      | 6,10    | 0,10    |
| PRO2562  | 40               | 1,00                        | НП     | 0,96   | НП      | 0,98    | 1,05    | НП                    | 3,50   | НП      | 2,10    | –5,10   |
| PRO2566  | –80              | 0,95                        | НП     | НП     | НП      | НП      | 0,95    | НП                    | НП     | НП      | НП      | –0,50   |
| PRO2566  | 4                | 0,95                        | НП     | 0,89   | НП      | 0,92    | 0,92    | НП                    | 5,60   | НП      | 3,00    | 2,40    |
| PRO2566  | 40               | 0,95                        | НП     | 0,90   | НП      | 0,94    | 0,97    | НП                    | 4,60   | НП      | 0,70    | –2,00   |
| PRO2567  | –80              | 1,01                        | НП     | НП     | НП      | НП      | 0,98    | НП                    | НП     | НП      | НП      | 2,40    |
| PRO2567  | 4                | 1,01                        | НП     | 0,95   | НП      | 0,94    | 1,01    | НП                    | 6,10   | НП      | 6,40    | 0,20    |
| PRO2567  | 40               | 1,01                        | НП     | 0,93   | НП      | 0,94    | 1,03    | НП                    | 7,50   | НП      | 6,80    | –2,10   |
| PRO2660  | –80              | 0,93                        | НП     | НП     | НП      | НП      | 0,85    | НП                    | НП     | НП      | НП      | 8,69    |
| PRO2660  | 4                | 0,93                        | 0,93   | 1,08   | 0,96    | НП      | 1,05    | 0,12                  | –16,32 | –3,40   | НП      | –12,68  |
| PRO2660  | 40               | 0,93                        | 0,95   | 0,95   | 0,96    | НП      | 0,92    | –1,94                 | –2,88  | –3,17   | НП      | 1,12    |

**Таблица 24: Результаты использования нанодифференциальной сканирующей флуориметрии для молекул MATCH4**

| ID белка | Начало рассеяния [°C] | SD (рассеяние) | Tначало [°C] | SD (Tначало) | Tсред.1 [°C] | SD (Tсред.1) | Tсред.2 [°C] | SD (Tсред.2) |
|----------|-----------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| PRO2562  | 63,5                  | 0,1            | 51,0         | 0,2          | 61,8         | 0,0          | –            | –            |
| PRO2660  | 65,6                  | 0,1            | 48,8         | 1,1          | 63,3         | 0,8          | 70,2         | 0,5          |
| PRO2566  | 62,5                  | 0,1            | 52,9         | 0,3          | 59,9         | 0,1          | –            | –            |
| PRO2567  | 62,2                  | 0,1            | 52,9         | 0,2          | 59,9         | 0,0          | –            | –            |

### **Пример 5: Определение плотности мезотелина на поверхности клеток целевых линий клеток:**

#### **Введение**

Одной из целей является сравнение способности мультиспецифических молекул (моновалентных или бивалентных для связывания с мезотелином) нацеливаться на линии клеток, демонстрирующие разные уровни мезотелина на поверхности их клеток. Это позволило количественно определить экспрессию плазмомембранного мезотелина на разных линиях клеток.

#### **Способ**

Способность связывания антител (ABC) на линиях клеток рака, экспрессирующих разные уровни мезотелина, и на здоровых мезотелиальных тканях была оценена методом проточной цитометрии (FC) с помощью набора антител к IgG человека Quantum Simply Cellular (Bangs Laboratories). 1 мг антитела антител к мезотелину (7D9,3, Genentech) конъюгировали с помощью красителя Alexa Fluor 488, используя набор для быстрой конъюгации Lightning-Link (Expedeon) в соответствии с инструкциями производителя. Значения плотности рецепторов представлены в виде способности связывания антител (ABC). Значения ABC были получены на основе градуировочных кривых, построенных с помощью гранул Quantum Simply Cellular для антител к IgG человека (Bangs Laboratories, Inc.). Данные гранулы состоят из четырех популяций в микросферах, каждая из которых конъюгирована с разным количеством молекул антител к IgG человека в грануле. На первом этапе увеличение концентраций антител к мезотелину, меченых с помощью красителя Alexa Fluor 488, проверяли на популяции в грануле с наибольшим количеством сайтов связывания для определения насыщающей концентрации антител, которое было использовано во время количественного определения, как указано в протоколе производителя. После этого гранулы и контрольные образцы

окрашивали согласно инструкциям производителя с помощью соответствующей насыщающей концентрации антител к мезотелину, меченных с помощью красителя Alexa Fluor 488, и проверяли в тот же день и при тех же настройках фотоэлектронного умножителя, что и контрольные образцы. Для расчета значений ABC анализировали средние геометрические значения для четырех популяций в гранулах Quantum Simply Cellular с помощью программного обеспечения NovoExpress (ACEA Biosciences). Шаблон для анализа электронных таблиц QuickCal v. 2.3 Excel (Bangs Laboratories, Inc) использовали для создания градуировочной кривой с помощью линейной регрессии. Типичные значения R-квадрат:  $\geq 0,99$ . Значения ABC для антител к мезотелину, меченых с помощью красителя Alexa Fluor 488, интерполировали на основе градуировочной кривой.

## Результаты

Плотность мезотелина на плазматической мембране трех линий клеток рака (H226, H292 и клеток рака поджелудочной железы человека) и одной линии клеток, полученной из здоровой мезотелиальной ткани (MeT-5A; (ATCC® CRL-9444™); поставщик: ATCC), определяли с помощью гранул Quantum Simply Cellular. Полученные данные представлены в таблице 25. Высочайший уровень экспрессии продемонстрировали клетки H226, после них следовала линия клеток рака поджелудочной железы человека, экспрессия которой была в 4 раза меньше. Сопоставимый уровень экспрессии мезотелина был обнаружен на линиях клеток H292 и MeT-5A (в 8–10 раз ниже экспрессии на поверхности клеток H226).

**Таблица 25: плотность мезотелина на клетках рака представлена в виде средней способности связывания антител (ABC) для каждой линии клеток и была количественно оценена методом проточной цитометрии**

| Линия клеток                              | Плотность мезотелина<br>(способность связывания<br>антител) |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| H226                                      | 41858                                                       |
| H292                                      | 4660                                                        |
| Клетки рака поджелудочной железы человека | 12825                                                       |
| Met-5A                                    | 5503                                                        |

## **Пример 6: Реакция цитотоксичности (элиминация клеток-мишеней с помощью Т-клеток):**

### **Введение**

Для оценки способности biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA к выборочному направлению Т-клеток на элиминацию клеток, экспрессирующих мезотелин, по сравнению с MSLN<sub>низкая</sub> KDXCD3xhSA, анализ цитотоксичности с помощью линий клеток, экспрессирующих разные уровни плотности мезотелина на их поверхности, выполняли в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови человека. Дополнительно в данном анализе также оценивали влияние присутствия растворимого мезотелина на эффективность молекул. Одновременное связывание с мезотелином на клетках рака и CD3ε с помощью триспецифических молекул MSLN<sub>низкая</sub> KDXCD3xhSA приводит к сшиванию CD3ε на Т-клетках и активирует сигнальный каскад, который запускает активацию Т-клеток (повышение регуляции CD69, секреция цитокинов) и высвобождение протеазосодержащих вакуолей, что в конечном итоге приводит к уничтожению клеток-мишеней.

### **Способы**

#### **Фракционирование клеток крови**

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из свежей крови здоровых добровольцев с помощью среды для фракционирования лимфоцитов Lymphoprep (Stemcell technologies) в соответствии с инструкциями производителя. В данной серии экспериментов использовали кровь трех разных доноров (донор №1, донор №2 и донор №3). Свойства крови отдельных доноров значительно различались, в частности, с точки зрения количества и реактивности содержащихся в ней Т-клеток CD8+. Таким образом, эффективность уничтожения Т-клеток CD8+, полученных из данных образцов крови, сильно различалась. Это привело к получению разных

уровней эффективности уничтожения и эффективности активации Т-клеток CD8<sup>+</sup> в отношении одной контрольной молекулы в присутствии одной клетки-мишени, как указано в примерах, раскрытых в настоящем документе.

Вкратце, кровь разбавляли в отношении 1:2 с помощью буфера для выделения PBMC (PBS, 2 % FCS (фетальной телячьей сыворотки), 2 ммоль ЭДТА (этилендиаминтетраацетата)) и подавали в пробирки Leucosep, содержащие рекомендованное количество среды Lymphoprep. Пробирки LeucoSep центрифугировали в течение 30 мин с ускорением 800 x g без перерыва при комнатной температуре. Затем клеточный слой, содержащий PBMC, собирали и дважды промывали с помощью буфера для выделения мононуклеарных клеток периферической крови человека, а эритроциты лизировали с помощью лизирующего буфера для эритроцитов в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем выделенные клетки человека промывали один раз с помощью соответствующего буфера для выделения и один раз с помощью среды для количественного определения (RPMI-1640, 10 % фетальной телячьей сыворотки). После удаления тромбоцитов выделенные мононуклеарные клетки периферической крови перерастворяли в среде для количественного определения при плотности  $3 \times 10^6$  жизнеспособных клеток на мл.

#### Анализ цитотоксичности *in vitro* на основе проточной цитометрии (FC) и активация Т-клеток CD8<sup>+</sup>:

Три линии клеток рака, клетки H226 (с высокой плотностью мезотелина), клетки рака поджелудочной железы человека (со средней плотностью мезотелина) и клетки H292 (с низкой плотностью мезотелина), а также линия клеток MeT-5A, полученная из здоровой мезотелиальной ткани (с низкой плотностью мезотелина), использовали в качестве клеток-мишеней. 5 000 жизнеспособных клеток-мишеней, предварительно помеченных с помощью RKN67 и разбавленных в 75 мкл среды для количественного

определения (RPMI-1640, 10 % фетальной телячьей сыворотки) добавляли в 96-луночные планшеты. В применимых случаях использовали аналитический буфер, содержащий 50, 100 или 500 нг/мл растворимого мезотелина. 25 мкл контрольных белков с 6-кратной концентрацией разбавляли в среде для количественного определения и добавляли в соответствующие лунки. В каждую лунку добавляли 150 000 жизнеспособных эффекторных клеток, разбавленных в 50 мкл среды для количественного определения (соотношение Е:Т равно 30:1), а содержимое планшетов перемешивали на качающемся смесителе при комнатной температуре перед их инкубацией при +37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>. Через 40 ч клетки трипсинизировали, перерастворяли в окрашивающем буфере (PBS, 2 % BCS (бычьей сыворотки), 2 ммоль ЭДТА) и трансфицировали в планшеты с несвязывающей поверхностью.

Клетки окрашивали для разных маркеров, например, CD69, CD8, CD4, CD11c и Annexin-V. В рамках анализа внимание было сфокусировано на апоптических и мертвых клетках-мишенях и активированных Т-клетках CD8+. Клетки-мишени идентифицировали по зеленой флуоресценции (PKH67), а их жизнеспособность анализировали с помощью набора Annexin-V APC. Эффекторные клетки (клетки CD8+) идентифицировали на основании обнаружения CD8 на их поверхности (анти-CD8 PerCP-Cy5,5). Активация Т-клеток CD8+ была окончательно обнаружена путем количественного определения экспрессии CD69 (анти-CD69 PE). CD4 использовали для различения Т-клеток CD8+ и CD4+. CD11c использовали для окрашивания моноцитов и дендритных клеток, а также для улучшения гейтинга клеток-мишеней. Для всех маркеров, за исключением Annexin-V, клетки инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и осторожном перемешивании. Клетки промывали один раз окрашивающим буфером, один раз – связывающим буфером Annexin, при этом окрашивание с помощью Annexin-V выполняли в течение 30 мин при комнатной температуре с перемешиванием. Клетки



промывали один раз связывающим буфером Annexin-V, а анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Novocyte.

Процент лизиса специфических клеток-мишеней рассчитывали с помощью следующего уравнения:

$$\text{Специфический лизис клеток – мишеней [в \%]} = \left[ 1 - \frac{\text{жизнеспособность клеток – мишеней в образце}}{\text{средняя жизнеспособность контрольных образцов}} \right] \times 100$$

Процент активированных Т-клеток CD8+ соответствует отношению Т-клеток CD69+ CD8+.

#### Цитотоксичность на основании высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH):

Высвобождение лактатдегидрогеназы из цитозоля является признаком гибели клеток. Колориметрический анализ высвобождения лактатдегидрогеназы (Roche) использовали для проверки цитотоксичности, опосредованной представляющими интерес молекулами. Две линии клеток рака, клетки H226 (с высокой плотностью мезотелина) и клетки OVCAR-3 (со средней плотностью мезотелина), а также линию клеток MeT-5A, полученную из здоровой мезотелиальной ткани (с низкой плотностью мезотелина), использовали в качестве клеток-мишеней. 10 000 жизнеспособных клеток-мишеней добавляли в 96-луночные планшеты в соответствии с инструкциями и оставл на ночь. На следующий день в каждую лунку с человеческим сывороточным альбумином, содержащим буферный раствор, добавляли 300 000 жизнеспособных эффекторных клеток (соотношение Е:Т равно 30:1). Соответствующие молекулы, представленные на фигурах, добавляли с помощью 5-кратного разведения, начиная с 50 нмоль. В применимых случаях в лунки добавляли окончательную концентрацию 0 нг/мл растворимого мезотелина, 50 нг/мл растворимого мезотелина и 500 нг/мл растворимого мезотелина. После 40 ч

супернатанты удаляли для анализа высвобождения лактатдегидрогеназы, а клетки окрашивали для маркеров Т-клеток, включая активацию.

Процент специфического лизиса рассчитывали следующим образом:

1. Из всех значений OD вычитали среднее фоновое значение OD
2. Рассчитывали % цитотоксичности =  $((\text{образец} - \text{спонтанное уничтожение}) / (\text{максимальное уничтожение} - \text{спонтанное уничтожение})) * 100$

*Примечание:* спонтанное уничтожение: среднее значение OD эффе́ктора + клетки-мишени без обработки (необработанные);

*Примечание:* максимальное уничтожение: среднее значение OD для клетки-мишени, обработанной с помощью 1 % тритона в течение 40 ч.

## Результаты

Цитотоксический потенциал и влияние на активацию Т-клеток CD8+ молекул MATCH PRO2000 (MATCH-4: biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA) и PRO1872 (scMATCH-3: MSLN<sub>низкая</sub> KDXCD3xhSA) оценивали с помощью анализа цитотоксичности на основании проточной цитометрии. Данные, полученные при использовании линии клеток H226 с высокими уровнями экспрессии мезотелина и клеток Met-5A с низкими уровнями экспрессии мезотелина, полученных из здоровой ткани, представлены в таблицах 26 и 27, а кривые «концентрация-эффект» для молекул MATCH – на фиг. 6. Обе молекулы являются высокоэффективными в клетках H226 с высокими уровнями экспрессии мезотелина. Бивалентная молекула PRO2000, нацеленная на мезотелин, в 75 раз эффективнее моновалентной молекулы PRO1872, нацеленной на мезотелин. Наоборот, в клетках Met-5A, экспрессирующих низкие уровни мезотелина, эффективность уничтожения клеток-мишеней молекулы PRO1872, связывающей моновалентный мезотелин, оказалась в 16 раз выше значения для PRO2000. В клетках с высокими уровнями экспрессии PRO2000 имеет эффективность уничтожения (концентрация EC<sub>50</sub>) 0,07 пмоль, а PRO1872 – 5,31 пмоль, при этом в клетках Met-5A, PRO2000 продемонстрировал концентрацию

EC<sub>50</sub>, равную 144,70 пмоль, в PRO1872 – 8,88 пмоль. Аналогичные данные были получены для активации Т-клеток CD8+ при соответствующих условиях.

Кроме того, цитотоксическую активность и влияние на активацию Т-клеток CD8+ PRO2000 и PRO1872 проверяли на двух других линиях клеток-мишеней рака, экспрессирующих средние и низкие уровни мезотелина: на клетках рака поджелудочной железы человека и клетках H292, соответственно (таблица 27 и фиг. 7). Как и ранее, в клетках с низкой экспрессией мезотелина молекула PRO1872 оказалась более эффективной, чем бивалентная молекула PRO2000, нацеленная на мезотелин. В клетках рака поджелудочной железы человека со средней плотностью мезотелина PRO2000 и PRO1872, напротив, имеют одинаковую эффективность. В клетках рака поджелудочной железы человека PRO2000 имеет эффективность уничтожения, равную 40,75 пмоль, а PRO1872 – 30,26 пмоль, при этом в клетках H292 с низкими уровнями экспрессии мезотелина PRO2000 имел концентрацию EC<sub>50</sub>, равную 652,2 пмоль, а PRO1872 – 91,03 пмоль. Аналогичные данные были получены для активации Т-клеток CD8+ в соответствующих условиях, за исключением того, что в присутствии клеток рака поджелудочной железы человека PRO2000 в 4 раза эффективнее, чем PRO1872.

В нескольких исследованиях концентрация сыворотки в растворимом мезотелине у больных раком составляла несколько сотен нг/мл. Таким образом, было оценено влияние присутствия растворимого мезотелина на эффективность молекул с точки зрения уничтожения клеток-мишеней.

Цитотоксический потенциал и влияние на активацию Т-клеток CD8+ молекул MATCH PRO2000 и PRO1872 сравнивали с помощью клеток H226 с высокими уровнями экспрессии мезотелина при отсутствии растворимого мезотелина, в присутствии 50 нг/мл растворимого мезотелина или в присутствии 500 нг/мл растворимого мезотелина. Полученные данные представлены в таблицах 28 и 29, а кривые «концентрация-эффект» для молекул – на фиг. 8. Растворимый мезотелин оказывал отрицательное воздействие на эффективность

обеих молекул, зависящее от дозы. Бивалентная молекула PRO2000, нацеленная на мезотелин и имеющая меньшую моновалентную аффинность связывания к мезотелину по сравнению с PRO1872, продемонстрировала снижение эффективности уничтожения в 17 раз в присутствии 500 нг/мл растворимого мезотелина по сравнению с эффективностью при отсутствии растворимого мезотелина. Моновалентные молекулы PRO1872, нацеленные на мезотелин, с лучшей моновалентной аффинностью к мезотелину показали уменьшение эффективности в 106 раз в присутствии 500 нг/мл растворимого мезотелина по сравнению с эффективностью при отсутствии растворимого мезотелина. Аналогичные данные были получены для активации Т-клеток CD8<sup>+</sup> в соответствующих условиях.

Дополнительно для демонстрации того, что обе молекулы имеют эквивалентную эффективность с точки зрения уничтожения клеток-мишеней, определяли характеристики варианта PRO2000 (PRO2100). Во избежание гликозилирования потенциальный сайт гликозилирования в PRO2100 был мутирован.

Цитотоксический потенциал молекул MATCH4 PRO2000 и PRO2100 сравнивали с помощью анализа цитотоксичности на основе проточной цитометрии в присутствии клеток H226 с высокими уровнями экспрессии мезотелина и мезотелиальных клеток с низкими уровнями экспрессии мезотелина, MeT-5A. Также был включен PRO1872. Полученные данные представлены в таблице 30, а кривые «концентрация-эффект» – на фиг. 9. Ни одна из проверенных молекул не продемонстрировала уничтожение клеток Met-5A с низкими уровнями экспрессии мезотелина. В присутствии клеток-мишеней H226 PRO2000 и PRO2100 имели очень похожую эффективность уничтожения при отсутствии или в присутствии растворимого мезотелина. При отсутствии растворимого мезотелина эффективность составила 0,7 пмоль (для PRO2000) и 1,54 пмоль (для PRO2100). В присутствии 100 нг/мл растворимого мезотелина эффективность изменилась в 2 раза (3,56 пмоль) – для PRO2100 и в 5 раз

(3,45 пмоль) – для PRO2000. При отсутствии растворимого мезотелина, напротив, молекула с лучшей моновалентной аффинностью к мезотелину (PRO1872) оказалась в 10 и 20 раз менее эффективной, чем PRO2100 и PRO2000 соответственно (концентрация  $EC_{50}$  PRO1872 = 13,38 пмоль). Кроме того, PRO1872 оказался в 10 раз менее эффективным в присутствии 100 нг/мл растворимого мезотелина.

На основании вышеуказанных данных цитотоксический потенциал дополнительных иллюстративных примеров молекул MATCH PRO2567, PRO2566, PRO2562 и PRO2660 (MATCH-4: biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA) оценивали с помощью высвобождения лактатдегидрогеназы, как указано в разделе «Способы». Во время проверки PRO2567, PRO2566 и PRO2562 данные молекулы продемонстрировали повышенную эффективность и имели аналогичные кривые «доза-эффект» по сравнению с PRO2660 в клетках H226 с высокими уровнями экспрессии мезотелина (фиг. 10). Небольшое снижение эффективности данных молекул было выявлено в клетках OVCAR-3 со средними уровнями экспрессии, также небольшое снижение активности было обнаружено при использовании клеток Met-5A в качестве мишеней с низкими уровнями экспрессии мезотелина (фиг. 10). Эти данные представлены в общем виде на фиг. 11, где приведены значения концентрации  $EC_{50}$  для всех экспериментов, включая сравнение с PRO1872 (в качестве эталона). Было обнаружено, что при использовании клеток H226 в качестве мишеней значения концентрации  $EC_{50}$  PRO2567, PRO2566, PRO2562 и PRO2660 ниже, чем у PRO1872 (фиг. 11A). Похожие тенденции были обнаружены для PRO2567, PRO2566 и PRO2562 в клетках OVCAR-3 (фиг. 11B). При проверке диапазона активности путем расчета  $x$ -кратной разницы между средними значениями концентрации  $EC_{50}$  Met-5A и средними значениями концентрации  $EC_{50}$  H226, было обнаружено, что диапазон активности для PRO2567, PRO2566 и PRO2562 значительно больше, чем для PRO1872 (см. таблицу 31).

Изменения эффективности и кривых «доза-эффект» для основных молекул проверяли в присутствии 50 и 500 нг/мл растворимого мезотелина (фиг. 12). Было обнаружено, что молекулы MATCH4 biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA сохраняют эффективность в присутствии растворимого мезотелина. Например, PRO2566 и PRO2567 сохраняют эффективность в присутствии растворимого мезотелина по сравнению с PRO1872 даже при высоких концентрациях растворимого мезотелина (х-кратное изменение эффективности от 0 до 500 нг/мл: в 14,2 и 23,8 раза по сравнению с 78,2 раза; см. таблицу 32). На фиг. 13 в общем виде показана разность абсолютных значений концентрации EC<sub>50</sub>. Если на значения концентрации EC<sub>50</sub> PRO2566 и PRO2567 добавление растворимого мезотелина практически не влияет, то на значения концентрации EC<sub>50</sub> моновалентного PRO1872 добавление растворимого мезотелина влияет достаточно сильно. Хотя PRO2660 кажется более восприимчивым к растворимому мезотелину, он остается менее восприимчивым, чем PRO1872. Эти данные показывают, что формат MATCH4 biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA отлично подходит для сохранения достаточной противоопухолевой эффективности в присутствии растворимого мезотелина.

### **Пример 7: Связывание с клетками-мишенями молекул MATCH**

#### **Введение**

Для подтверждения данных о цитотоксичности, полученных с помощью клеток-мишеней, экспрессирующих различные уровни плотности мезотелина на поверхности клеток (H226, клеток рака поджелудочной железы, H292, OVCAR-3 и MeT-5A), связывание клеток молекул MATCH по крайней мере с двумя из этих линий клеток оценивали методом проточной цитометрии. Иллюстративные примеры молекул MATCH4 PRO2000, PRO2100, PRO2562, PRO2566, PRO2567 и PRO2660 проверяли для подтверждения того, что обе молекулы имеют

аналогичные свойства связывания. Для сравнения использовали scMATCH3 PRO1872.

### **Способ**

Клетки промывали два раза с помощью 100 мкл PBS и инкубировали с помощью 5-кратного серийного разведения PRO1872, PRO2000, PRO2100, PRO2562, PRO2566, PRO2567 или PRO2660 в окрашивающем буфере (PBS, 2 % термоинактивированной BCS (бычьей сыворотки), 2 ммоль ЭДТА) в диапазоне от 50 000 до 0,005 пмоль. Клетки промывали два раза с помощью окрашивающего буфера, а связывание молекул MATCH4 визуализировали с помощью белка L-PE (2 мкг/мл). Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре на качающемся смесителе, промывали два раза с помощью окрашивающего буфера, центрифугировали в течение 5 мин с ускорением 200 g и перерастворяли в конечном объеме (50 мкл окрашивающего буфера). Сигнал PE о 20 000 событий в каждой лунке анализировали методом проточной цитометрии, используя проточный цитометр Novocyte, после чего данные анализировали с помощью программного обеспечения NovoExpress (ACEA Biosciences). Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) для молекул MATCH корректировали для неспецифического связывания путем вычитания фонового значения (нулевой концентрации антитела). Данные о  $\Delta$ MFI анализировали с помощью 4-параметрической логистической кривой, построенной с помощью программного обеспечения для анализа данных GraphPad Prism (программного обеспечения GraphPad), также рассчитывали концентрацию представляющих интерес молекул, необходимую для достижения 50 % связывания клеток-мишеней (концентрация EC<sub>50</sub>).

### **Результаты**

Связывание PRO2000, PRO2100 и PRO1872 с разными линиями клеток было оценено с помощью метода проточной цитометрии. Концентрация, при которой

наблюдалась полумаксимальная связывающая концентрация ( $EC_{50}$ ), и достигнутые максимальные значения связывания (средняя интенсивность флуоресценции) представлены в таблице 33, а соответствующие кривые титрования – на фиг. 14 (A-D). Для PRO2000 и PRO2100 были получены сопоставимые данные о связывании со всеми проверенными линиями клеток. PRO2000 и PRO2100 (по сравнению с PRO1872) продемонстрировали увеличение связывания с клетками рака H226 (с высокими уровнями экспрессии мезотелина) в 3 раза, увеличение связывания с клетками рака поджелудочной железы человека (со средними уровнями экспрессии мезотелина) и уменьшение связывания с клетками рака H292 (с низкими уровнями экспрессии мезотелина) в 2 раза. Эти данные коррелируют с данными, полученными во время анализа цитотоксичности. Максимальное связывание, наблюдаемое для каждой проверенной молекулы, подтверждает ранжирование линий клеток с точки зрения экспрессии мезотелина на поверхности клетки.

Более того, связывание клеток молекул MATCH4 PRO2567, PRO2566, PRO2562 и PRO2660 (biMSLNxCD3xhSA) с разными линиями клеток оценивали, как указано выше. Концентрация, при которой наблюдалась полумаксимальная связывающая концентрация ( $EC_{50}$ ), и достигнутые максимальные значения связывания (MFI) представлены в таблице 34, а соответствующие кривые титрования – на фиг. 14 (E-G). Основные молекулы MATCH4 PRO2567, PRO2566 и PRO2562 продемонстрировали концентрацию  $EC_{50}$  связывания с клетками H226 с высокими уровнями экспрессии мезотелина, что сопоставимо со значениями для PRO2000 и PRO2100 (см. таблицы 33 и 34). Также наблюдалась сниженная концентрация  $EC_{50}$  связывания всех молекул MATCH4 (PRO2567, PRO2566, PRO2562 и PRO2660) при оценке связывания с клетками OVCAR-3 со средними уровнями экспрессии мезотелина. Снижение связывания ( $EC_{50}$ ) бивалентных молекул MATCH4 обусловлено более низкими уровнями экспрессии мезотелина в клетках OVCAR-3 (о чем свидетельствуют полученные максимальные значения средней интенсивности флуоресценции),



уменьшающими влияние avidности на силу связывания. Для клеток Met-5A с низкими уровнями экспрессии мезотелина были получены меньшие максимальные значения связывания, чем для клеток H226 и OVCAR-3, при этом значения концентрации  $EC_{50}$  были примерно в 5 -раз ниже значений концентрации  $EC_{50}$  для связывания с клетками H226. Аналогичный результат был получен для PRO2000 и PRO2100. Можно предположить, что мезотелин в клетках Met-5A локально концентрируется в мембранных микродоменах, что приводит к прочному и зависящему от avidности связыванию молекул MATCH4, и, следовательно, к низким значениям концентрации  $EC_{50}$ , при этом максимальные значения средней интенсивности флуоресценции остаются низкими из-за общей низкой экспрессии мезотелина в данных клетках.

Таким образом, связывание ( $EC_{50}$ ) основных молекул MATCH4 PRO2567, PRO2566, PRO2562 сопоставимо с показателями связывания клеток для PRO2000 и PRO2100. В ходе анализа цитотоксичности также было выявлено уменьшение силы связывания с клетками OVCAR-3 со средними уровнями экспрессии мезотелина (возможно, из-за потери avidности), при этом для молекул MATCH4 была обнаружена меньшая эффективность уничтожения клеток OVCAR-3 по сравнению с уничтожением клеток H226 с высокими уровнями экспрессии мезотелина.

**Таблица 26: Эффективность уничтожения клеток-мишеней и активации Т-клеток CD8+ в присутствии клеток H226 и Met-5A**

| Линия клеток-мишеней | Уничтожение клеток-мишеней            |                              |                                       |                              | Активация Т-клеток CD8+               |                            |                                       |                            |
|----------------------|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
|                      | H226                                  |                              | Met-5A                                |                              | H226                                  |                            | Met-5A                                |                            |
| ID PRO               | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное уничтожение (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное уничтожение (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальная активация (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальная активация (%) |
| PRO2000              | 0,07                                  | 87,68                        | 144,70                                | 54,65                        | НП                                    | 95,8                       | 544,20                                | 51,0                       |
| PRO1872              | 5,31                                  | 93,64                        | 8,88                                  | 47,87                        | 0,09                                  | 88,9                       | 10,89                                 | 59,9                       |

**Таблица 27: Эффективность уничтожения клеток-мишеней и активации Т-клеток CD8+ в присутствии клеток H292 и клеток рака поджелудочной железы**

| Линия клеток-мишеней | Уничтожение клеток-мишеней            |                              |                                           |                              | Активация Т-клеток CD8+               |                            |                                           |                            |
|----------------------|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|----------------------------|
|                      | H292                                  |                              | Клетки рака поджелудочной железы человека |                              | H292                                  |                            | Клетки рака поджелудочной железы человека |                            |
| ID PRO               | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное уничтожение (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль)     | Максимальное уничтожение (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальная активация (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль)     | Максимальная активация (%) |
| PRO2000              | 652,20                                | 89,77                        | 40,75                                     | 79,82                        | 114,50                                | 53,9                       | 12,24                                     | 70,9                       |
| PRO1872              | 91,03                                 | 91,97                        | 30,26                                     | 83,48                        | 34,06                                 | 61,7                       | 47,18                                     | 76,3                       |

**Таблица 28: Эффективность уничтожения клеток-мишеней H226 при отсутствии или в присутствии растворимого мезотелина**

| Концентрация мезотелина | Мезотелин отсутствует                  |                              | 50 нг/мл                               |                              | 500 нг/мл                              |                              |
|-------------------------|----------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|
| ID PRO                  | Концен-трация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное уничтожение (%) | Концен-трация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное уничтожение (%) | Концен-трация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное уничтожение (%) |
| PRO2000                 | 9,73                                   | 93,75                        | 31,21                                  | 94,86                        | 165,30                                 | 92,05                        |
| PRO1872                 | 43,89                                  | 95,65                        | 636,50                                 | 95,99                        | 4653,00                                | 97,65                        |

**Таблица 29: Эффективность активации Т-клеток CD8+ в присутствии клеток-мишеней H226 и при отсутствии или в присутствии растворимого мезотелина**

| Концентрация мезотелина | Мезотелин отсутствует                 |                            | 50 нг/мл                              |                            | 500 нг/мл                             |                            |
|-------------------------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| ID PRO                  | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальная активация (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальная активация (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальная активация (%) |
| PRO2000                 | 1,986                                 | 84,73                      | 7,849                                 | 83,03                      | 42,43                                 | 86,86                      |
| PRO1872                 | 22,86                                 | 83,02                      | 199,8                                 | 79,04                      | 1115                                  | 81,39                      |

**Таблица 30: эффективность уничтожения клеток-мишеней при отсутствии или в присутствии растворимого мезотелина**

| Линия клеток-мишеней                 | H226                                  |                              |                                       |                              | Met-5A                                |                              |                                       |                              |
|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| Концентрация растворимого мезотелина | Растворимый мезотелин отсутствует     |                              | 100 нг/мл                             |                              | Растворимый мезотелин отсутствует     |                              | 100 нг/мл                             |                              |
| ID PRO                               | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное уничтожение (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное уничтожение (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное уничтожение (%) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное уничтожение (%) |
| PRO2000                              | 0,70                                  | 49,44                        | 3,45                                  | 58,49                        | Лизис отсутствует                     |                              | Лизис отсутствует                     |                              |
| PRO2100                              | 1,54                                  | 46,34                        | 3,56                                  | 58,92                        | Лизис отсутствует                     |                              | Лизис отсутствует                     |                              |
| PRO1872                              | 13,38                                 | 54                           | 129,80                                | 60,66                        | Лизис отсутствует                     |                              | Лизис отсутствует                     |                              |

**Таблица 31: Общие сведения об эффективности уничтожения клеток PRO2561, PRO2566, PRO2567, PRO2660 и PRO1872 для клеток-мишеней, экспрессирующих разные уровни мезотелина**

| Среднее значение                                 | PRO2660 | PRO2567  | PRO2566  | PRO2562 | PRO1872 |
|--------------------------------------------------|---------|----------|----------|---------|---------|
| Концентрация EC <sub>50</sub> для H226 (нмоль)   | 0,02851 | 0,003459 | 0,006095 | 0,01339 | 0,1203  |
| Концентрация EC <sub>50</sub> для Met-5A (нмоль) | 0,04852 | 0,09865  | 2,656    | 1,536   | 0,1381  |
| Диапазон на основании кратной разницы            | 1,7     | 28,5     | 435,8    | 114,7   | 1,1     |

**Таблица 32: Общие сведения об эффективности уничтожения клеток PRO2561, PRO2566, PRO2567, PRO2660 и PRO1872 в присутствии разных уровней растворимого мезотелина**

|         | Разность 0–50<br>нг/мл | Разность 0–500<br>нг/мл |
|---------|------------------------|-------------------------|
| PRO2566 | 3,1                    | 14,2                    |
| PRO2567 | 3,2                    | 23,8                    |
| PRO2662 | 5,8                    | 37,6                    |
| PRO2660 | 12,0                   | 85,1                    |
| PRO1872 | 8,5                    | 78,2                    |

**Таблица 33: Связывание PRO2000, PRO2100 и PRO1872 с клетками H226, H292, Met-5A и клетками рака поджелудочной железы человека**

|         | H226                                             |                                     | H292                                             |                                     | Met-5A                                           |                                     | Клетки рака поджелудочной<br>железы человека  |                                  |
|---------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|
| ID PRO  | Концен-<br>трация<br>EC <sub>50</sub><br>(пмоль) | Максимальное<br>связывание<br>(MFI) | Концен-<br>трация<br>EC <sub>50</sub><br>(пмоль) | Максимальное<br>связывание<br>(MFI) | Концен-<br>трация<br>EC <sub>50</sub><br>(пмоль) | Максимальное<br>связывание<br>(MFI) | Концен-<br>трация EC <sub>50</sub><br>(пмоль) | Максимальное<br>связывание (MFI) |
| PRO2000 | 658,6                                            | 362311                              | 1027,0                                           | 6964                                | 128,2                                            | 7949                                | 1476,0                                        | 17478                            |
| PRO2100 | 524,0                                            | 363091                              | 1301,0                                           | 6253                                | 62,8                                             | 7479                                | 1011,0                                        | 18029                            |
| PRO1872 | 1571,0                                           | 467461                              | 708,6                                            | 12168                               | 194,3                                            | 11190                               | 2157,0                                        | 33329                            |

**Таблица 34: Связывание основных молекул MATCH4 PRO2567, PRO2566, PRO2562 и PRO2660 с клетками H226, OVCAR-3 и Met-5A**

| ID PRO  | H226                                     |                               | OVCAR-3                                  |                               | Met-5A                                |                               |
|---------|------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
|         | Концентрация EC <sub>50</sub><br>(пмоль) | Максимальное связывание (MFI) | Концентрация EC <sub>50</sub><br>(пмоль) | Максимальное связывание (MFI) | Концентрация EC <sub>50</sub> (пмоль) | Максимальное связывание (MFI) |
| PRO2562 | 446,6                                    | 608623                        | 5551                                     | 148153                        | 87,7                                  | 12044                         |
| PRO2566 | 563,6                                    | 756616                        | 5131                                     | 154450                        | 106,3                                 | 12058                         |
| PRO2567 | 611,4                                    | 809233                        | 6637,5                                   | 169975                        | 82,4                                  | 11230                         |
| PRO2660 | 1084,7                                   | 686235                        | 10738,5                                  | 197710                        | 157,3                                 | 14462                         |

## **Пример 8: Подавление роста опухоли *in vivo* с помощью PRO2000 (biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA):**

### **Введение**

Для определения способности PRO2000 (biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA) эффективно контролировать рост опухоли у контрольных животных в компании Charles River Laboratories проводили два *in vivo* эксперимента по ксенотрансплантации линии клеток, экспрессирующих мезотелин. В рамках одного эксперимента проверяли подавление роста опухоли на ксенотрансплантатной модели H292, а в другом эксперименте – подавление роста опухоли на ксенотрансплантатной модели поджелудочной железы человека.

### **Способы**

#### *Животные*

Самок мышей NCG от компании Charles River Laboratories выводили и помещали в условия, подходящие для работы с гуманизированными мышами. В обоих исследованиях использовали животных в возрасте 8–12 недель.

#### *План исследования*

Животным в группах лечения ( $n = 5-6$  – в группе H292,  $n = 10$  – в группе клеток рака поджелудочной железы человека) подкожно имплантировали  $1 \times 10^7$  опухолевых клеток H292 (немелкоклеточный рак легких) и  $1 \times 10^7$  моноклеарных клеток периферической крови или  $1 \times 10^7$  опухолевых клеток рака поджелудочной железы человека и  $2,5 \times 10^6$  моноклеарных клеток периферической крови во фланговую область. Через 5 суток животным внутривенно вводили молекулы, представляющие интерес, и повторяли дозирование каждые 5 суток до конца эксперимента. Во время эксперимента регулярно контролировали рост опухоли у животных, используя

штангенциркуль, и измеряли потерю массы. Животных усыпляли, когда средний объем опухоли в контрольной группе достигал 800 мм<sup>3</sup>, или на 40 сутки (в зависимости от того, что наступало раньше). Животных контролировали и усыпляли в соответствии с правилами обеспечения здоровья и благополучия животных, принятыми в компании Charles River Laboratories.

## Результаты

Эффективность PRO2000 (biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA) оценивали с точки зрения стимуляции подавления роста опухоли с помощью модели имплантации PBMC/клеток H292, как указано в способах. Клетки H292 экспрессировали средние уровни мезотелина и получались из немелкоклеточного рака легкого. Дозы PRO2000 многократно вводили внутривенно, как показано на фиг. 15. Для сравнения использовали паливизумаб (антитело к респираторно-синцитиальному вирусу (RSV)) в качестве контроля лечения с помощью IgG и опухолевые клетки, пересаженные при отсутствии PBMC (без лечения). Было обнаружено, что при контрольных условиях наблюдалось разрастание опухоли (светло-серые линии, фиг. 15A). Лечение с помощью молекул PRO2000 (biMSLN.CD3) привело к подавлению роста опухоли при концентрациях 1 и 5 мг/кг по сравнению с контрольной группой (черные и темно-серые линии на фиг. 15A, соответственно). Значимость лечения проверяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с повторными измерениями и последующим испытанием с помощью критериев множественных сравнений Тьюки; данные на 40 сутки представлены на фиг. 15B, где каждая точка соответствует отдельному животному. Две наибольшие дозы (1 и 5 мг/кг) привели к значительному уменьшению объемов опухоли по сравнению с животными, которых лечили паливизумабом (контроль) и которых не лечили. Самая низкая доза (0,2 мг/кг) оказалась неоптимальной, поскольку результаты сравнения не были значительными по сравнению с животными, которых лечили паливизумабом. Отрицательных последствий для здоровья животных обнаружено не было,



поскольку масса животных оставалась относительно стабильной на протяжении всего эксперимента (данные не показаны). В целом эти данные указывают на то, что мультиспецифическое антитело PRO2000 (biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA) способно ингибировать рост опухоли *in vivo* и является перспективным концептуальным вариантом для иммунотерапии рака.

Также эффективность PRO2000 (biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA) оценивали с точки зрения стимуляции подавления роста опухоли с помощью модели имплантации PBMC/ HPAC (клеток рака поджелудочной железы), как указано в способах. Опухолевые клетки рака поджелудочной железы человека экспрессируют повышенные уровни мезотелина по сравнению с клетками H292. Аналогично модели H292 при контрольных условиях было обнаружено разрастание опухоли (фиг. 16, паливизумаб), а при условиях испытания – подавление роста опухоли, зависящее от дозы. Значимость лечения проверяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с повторными измерениями и последующим испытанием с помощью критериев множественных сравнений Тьюки. Было обнаружено, что наименьшая доза PRO2000 (biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA) обеспечивала значительное подавление роста опухоли в разные моменты времени по сравнению с наименьшей дозой PRO1872 (MSLNxCD3xhSA), которая представляет собой моновалентную молекулу, нацеленную на мезотелин. Эти данные указывают на то, что активность PRO2000 (biMSLN<sub>высокая</sub> KDXCD3xhSA) на основе авидности в клетках, экспрессирующих повышенные уровни мезотелина, приводит к повышению эффективности.

### Формула изобретения

1. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

- a) два домена связывания на основе антител, которые специфически связываются с мезотелином (MSLN- BDs); и
- b) по крайней мере один домен связывания на основе антител, который специфически связывается с CD3 (CD3-BD);

причем мультиспецифическое антитело не содержит полипептид Fc-области иммуноглобулина и причем каждый из указанных доменов MSLN- BDs связан с мезотелином (MSLN) с моновалентной константой диссоциации ( $K_D$ ) в диапазоне от 0,5 до 20 нмоль, в частности в диапазоне от 0,6 до 10 нмоль, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

2. Мультиспецифическое антитело по п. 1, в котором указанный MSLN-BD содержит

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 1, 2 (или 10) и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно; или последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно; и

(ii) последовательности каркасных областей FR1–FR4 домена VH3 или VH4; конкретно – последовательности каркасных областей FR1–FR4 домена VH3; и

(iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, конкретно – каркасные области FR1–FR3 каркаса V<sub>κ1</sub> или V<sub>κ3</sub>, более конкретно – каркасные области FR1–FR3 каркаса V<sub>κ1</sub>, и каркасную область FR4, выбранную из каркасной области FR4 каркаса V<sub>κ</sub>, и каркасной области FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, конкретно – каркасную область FR4 каркаса V<sub>λ</sub>, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную любой последовательности SEQ ID NO: 132–139 по крайней мере на 70, 80 или 90 процентов, более конкретно – каркасную область FR4 каркаса V<sub>λ</sub>,

выбранную из любой из SEQ ID NO: 132–139, конкретно – каркасную область FR4 каркаса Vλ согласно SEQ ID NO: 132 или 139.

3. Мультиспецифическое антитело по п. 1 или 2, в котором указанный MSLN-BD содержит

a.1) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 1, 2 (или 10) и 3, соответственно,

b.1) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно,

c.1) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.1) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

a.2) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 1, 2 (или 10) и 3, соответственно,

b.2) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно,

c.2) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.2) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

a.3) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно,

b.3) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно,

с.3) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.3) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

a.4) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно,

b.4) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно,

с.4) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.4) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

a.5) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно,

b.5) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно,

с.5) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

d.5) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

а.6) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно,

б.6) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно,

с.6) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

д.6) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов;

или

а.7) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно,

б.7) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно,

с.7) последовательность VH, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов, и

д.7) последовательность VL, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 по крайней мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 процентов.

4. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–3, в котором CD3-BD связывается с CD3ε.

5. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное антитело содержит один CD3-BD, причем CD3-BD связывает CD3ε с моновалентной константой диссоциации  $K_D$  в диапазоне от 0,5 до 50 нмоль, конкретно – в диапазоне от 1 до 40 нмоль, более конкретно – в диапазоне от 2 до 35 нмоль, при измерении методом SPR.

6. Мультиспецифическое антитело по п. 4 или 5, в котором CD3-BD содержит

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 45, 46 и 47, соответственно, в каркасе VH антитела человека, более конкретно – в каркасе VH3, и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, в каркасе VL антитела человека, причем каркас VL содержит каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, конкретно – каркаса V<sub>κ</sub>1, и каркасную область FR4, выбранную из V<sub>κ</sub> FR4, конкретно - V<sub>κ</sub>1 FR4, и V<sub>λ</sub> FR4,

в частности, в котором указанный CD3-BD содержит

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, 140, 141 или 142, и

(ii) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

7. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное антитело также содержит по крайней мере один домен связывания с человеческим сывороточным альбумином (hSA-BD), конкретно – один hSA-BD, в частности, в котором hSA-BD содержит

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 53, 54 и 55, соответственно, в каркасе VH антитела человека, более конкретно – в каркасе VH3, и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 56, 57 и 58, соответственно, в каркасе VL антитела человека, причем каркас VL содержит каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, конкретно – каркаса V<sub>κ</sub>1, и каркасную область FR4, выбранную из V<sub>κ</sub> FR4, конкретно - V<sub>κ</sub>1 FR4, и V<sub>λ</sub> FR4;

или

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 63, 64 и 65, соответственно, в каркасе VH антитела человека, конкретно – в каркасе VH3, и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 66, 67 и 68, соответственно, в каркасе VL антитела человека, причем каркас VL содержит каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, конкретно – каркаса V<sub>κ</sub>1, и каркасную область FR4, выбранную из V<sub>κ</sub> FR4, конкретно - V<sub>κ</sub>1 FR4, и V<sub>λ</sub> FR4,

или

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 73, 74 и 75, соответственно, в каркасе VH антитела человека, конкретно – в каркасе VH3, и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 76, 77 и 78, соответственно, в каркасе VL антитела человека, причем каркас VL содержит каркасные области FR1, FR2 и FR3 каркаса V<sub>κ</sub>, конкретно – каркаса V<sub>κ</sub>1, и каркасную область FR4, выбранную из V<sub>κ</sub> FR4, конкретно - V<sub>κ</sub>1 FR4, и V<sub>λ</sub> FR4;

в частности, в котором домен hSA-BD содержит

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и

(ii) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

или

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и

(ii) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

или

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79 или 143, и

(ii) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 или 144;

или

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 или 145, и

(ii) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 или 146;

8. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное антитело не содержит области CH1 и/или CL.

9. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 101, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 102; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 110; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 119, и



указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 120; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 121, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 123, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124.

10. Последовательность нуклеиновой кислоты или две последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие мультиспецифическое антитело по одному из пп. 1–9.

11. Вектор или два вектора, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты или две последовательности нуклеиновой кислоты по п. 10.

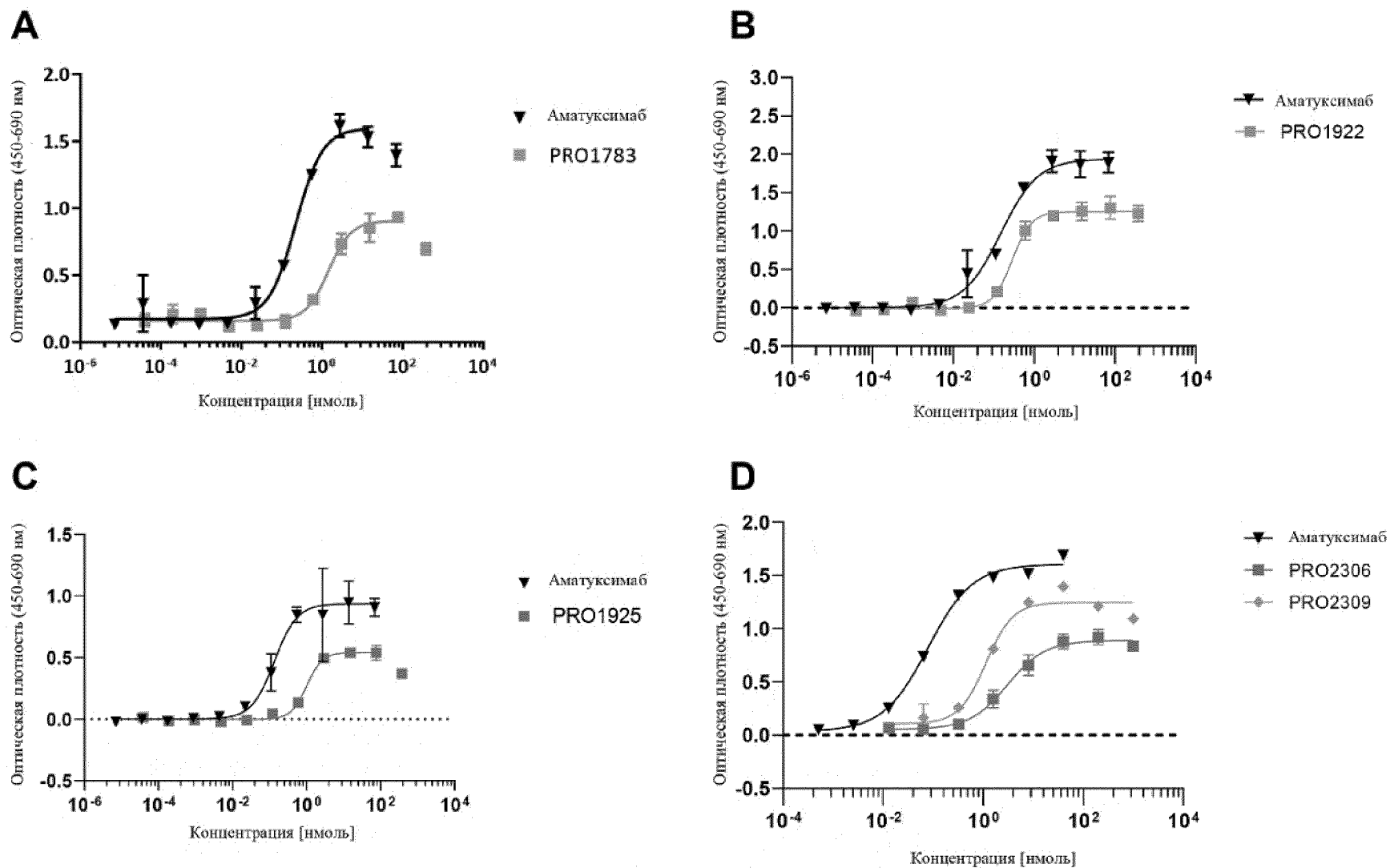
12. Клетка-хозяин или клетки-хозяева, содержащие вектор или два вектора по п. 11.

13. Способ получения мультиспецифического антитела по любому из пп. 1–9, содержащий (i) предоставление последовательности нуклеиновой кислоты или двух последовательностей нуклеиновой кислоты по п. 10 или вектора или двух векторов по п. 11, экспрессирование указанной последовательности нуклеиновой кислоты или последовательностей нуклеиновой кислоты, или указанного вектора или векторов, и получение указанного мультиспецифического антитела из экспрессионной системы, или (ii) предоставление клетки-хозяина или клеток-хозяев по п. 12, культивирование

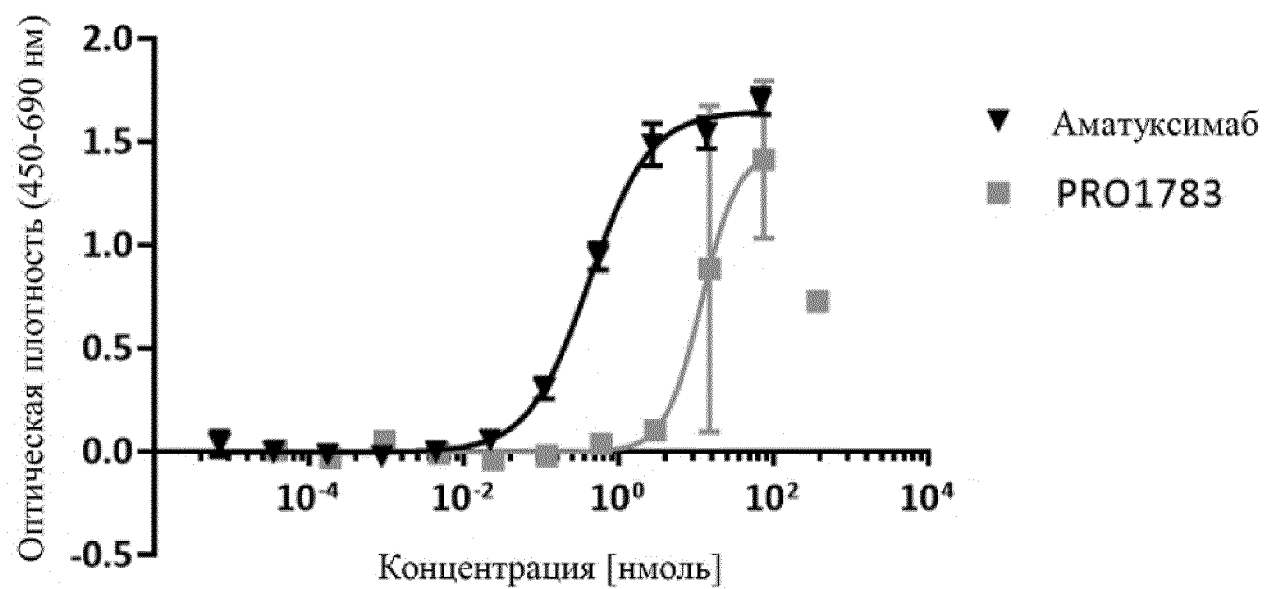
указанной клетки-хозяина или указанных клеток-хозяев и сбор указанного мультиспецифического антитела из клеточной культуры.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1–9 и фармацевтически приемлемый носитель.

15. Применение мультиспецифического антитела по любому из пп. 1–9 в лечении заболевания, в частности заболевания человека, более конкретно заболевания человека, выбранного из рака, в частности рака, выбранного из мезотелиомы, рака поджелудочной железы и рака яичников, воспалительного и аутоиммунного заболеваний, в частности в котором указанное мультиспецифическое антитело представляет собой либо одноцепочечный белок, содержащий три или четыре домена связывания, либо гетеродимерный белок, содержащий три или четыре домена связывания.

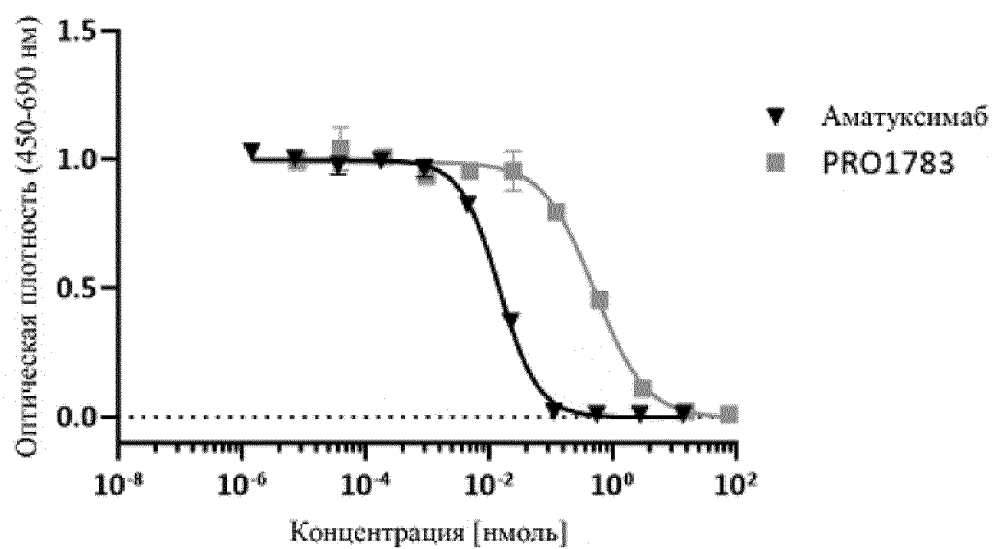


Фиг. 1

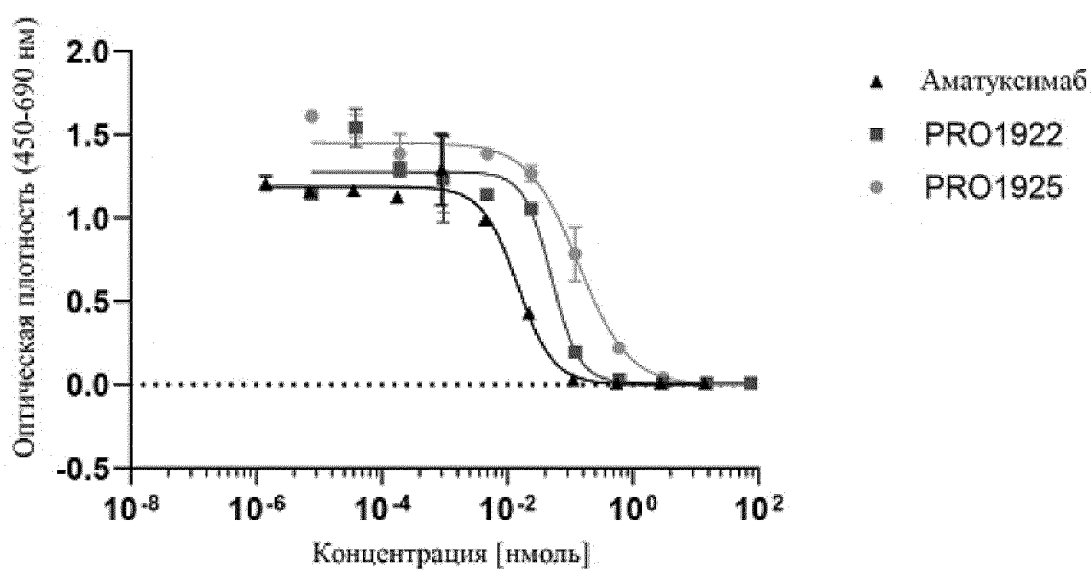


Фиг. 2

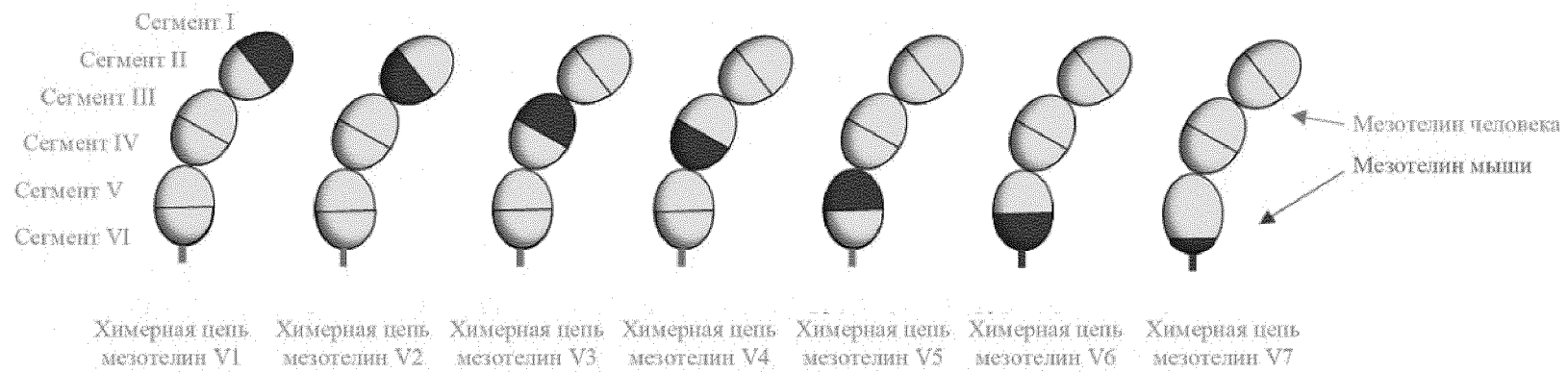
**A**



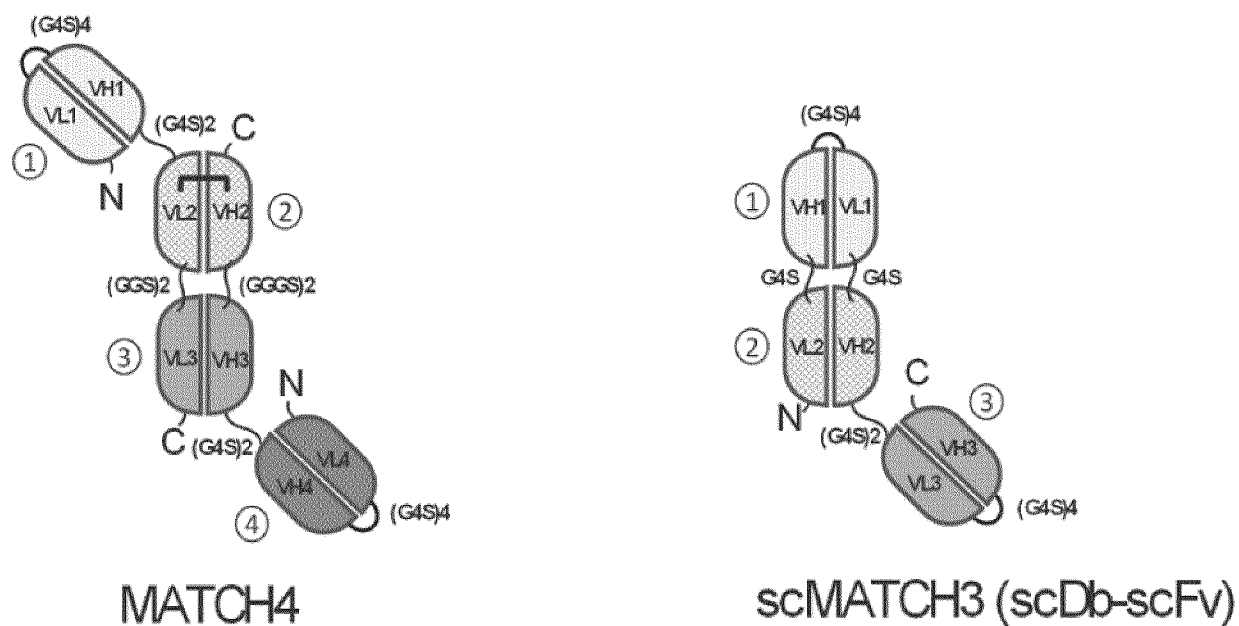
**B**



Фиг. 3



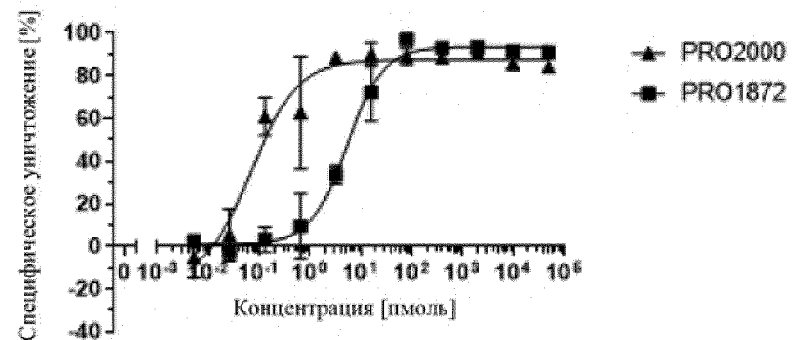
Фиг. 4



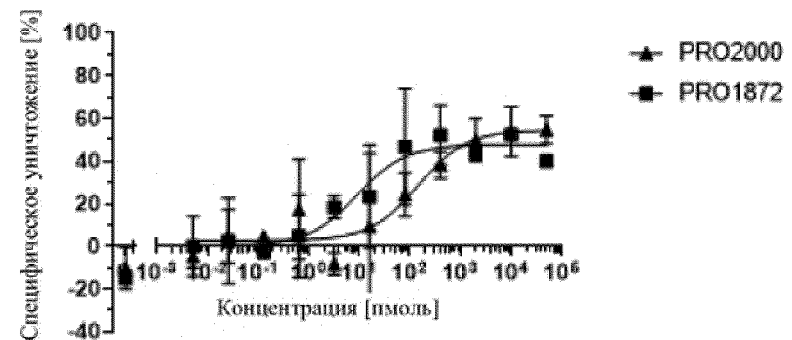
-  Дисульфидная связь, VL-G141C/VH-G51C  
 Пептидный линкер  
 N-конец  
 С-конец  
 VLx/VHx Варибельный домен легкой цепи (VL) и тяжелой цепи (VH) #

Фиг. 5

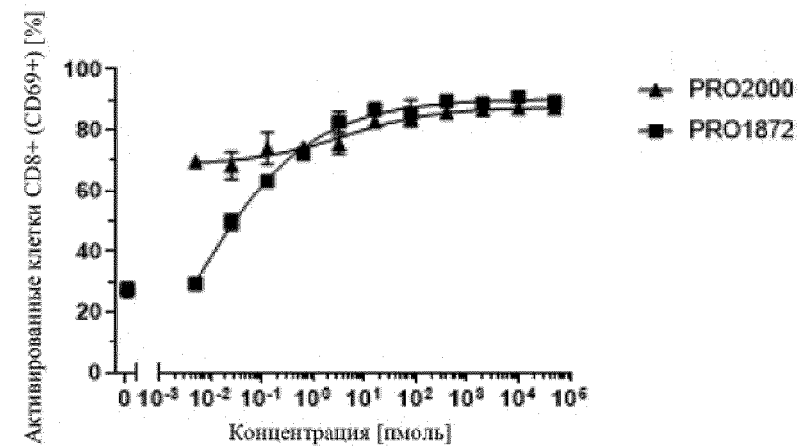
A



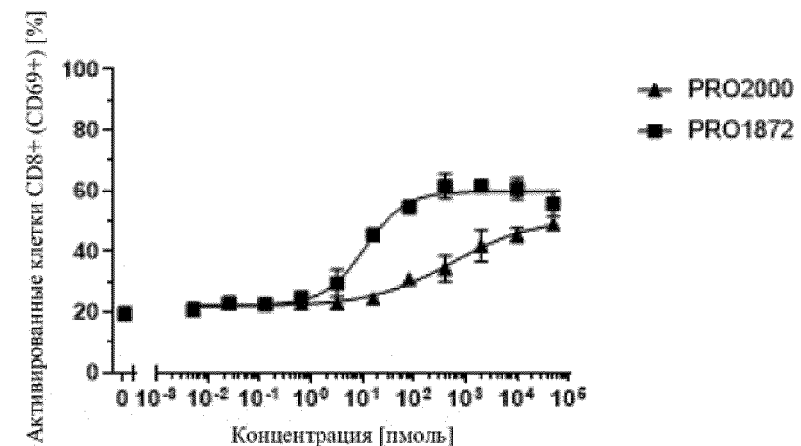
B



C



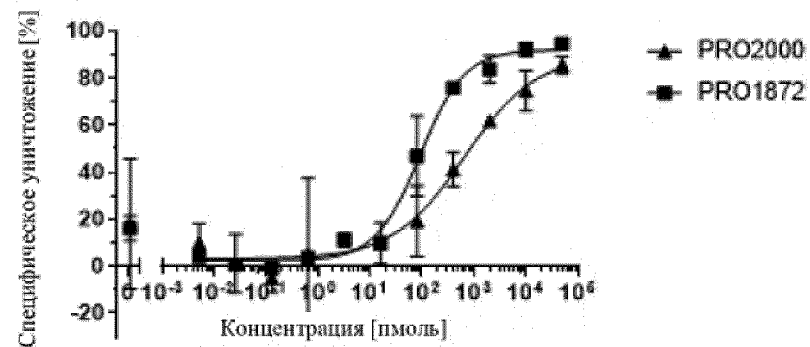
D



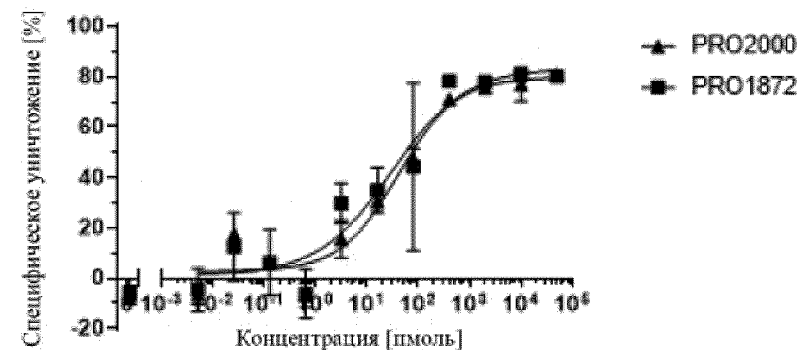
Фиг. 6



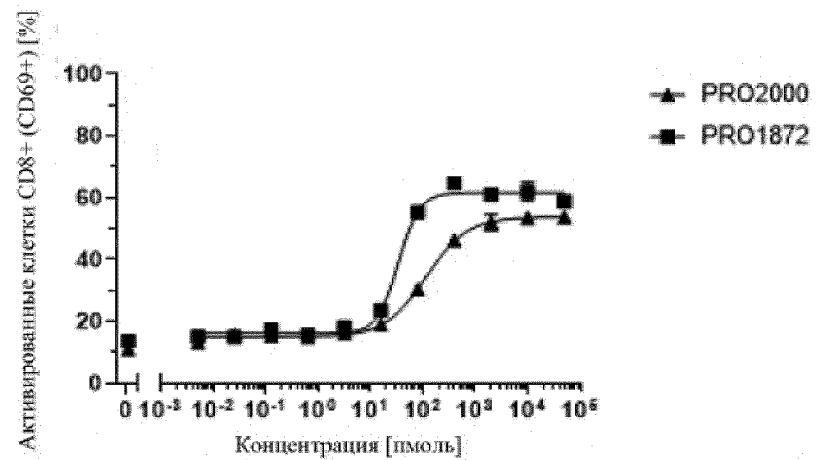
A



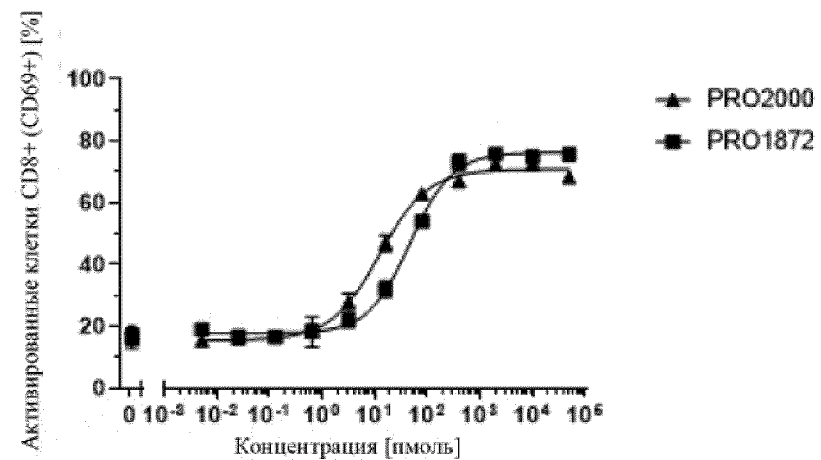
B



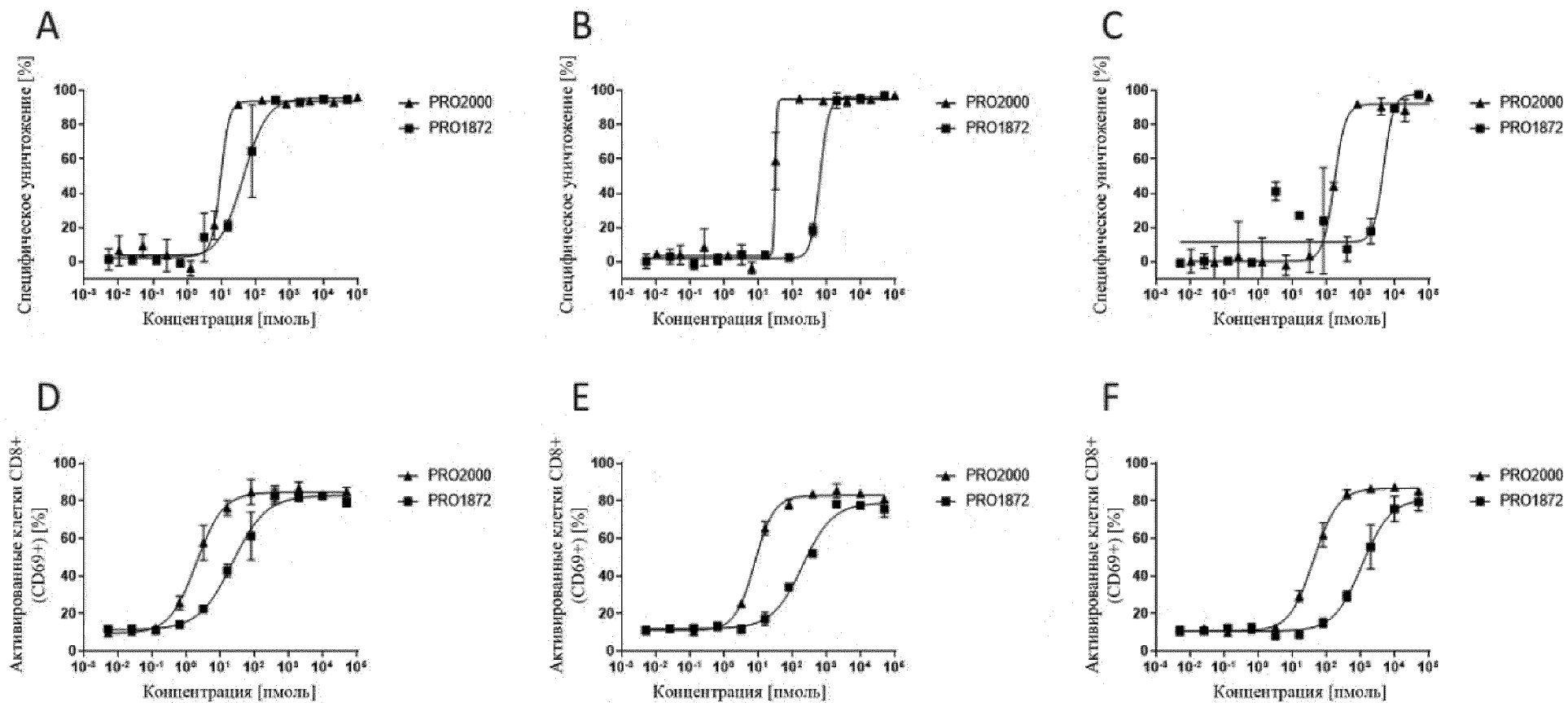
C



D

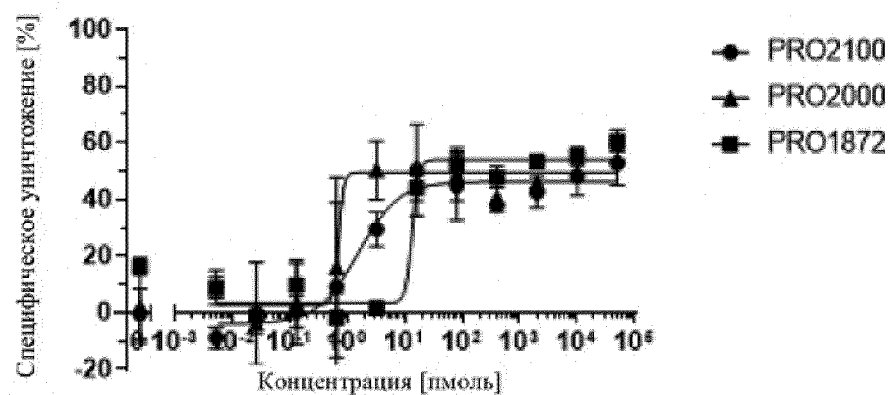


Фиг. 7

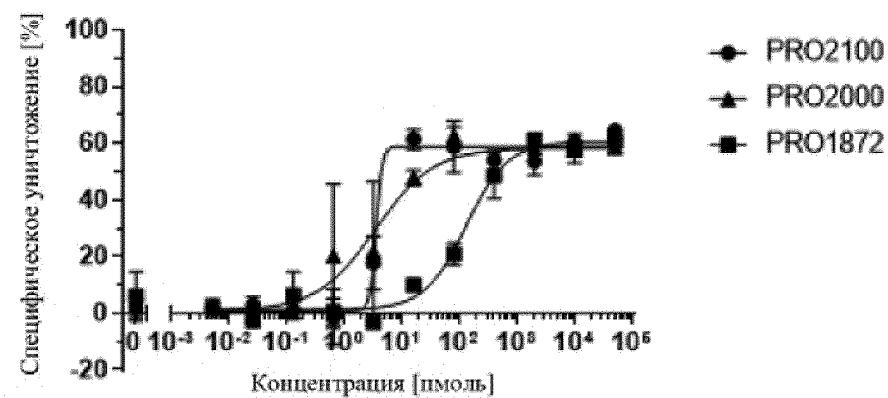


Фиг. 8

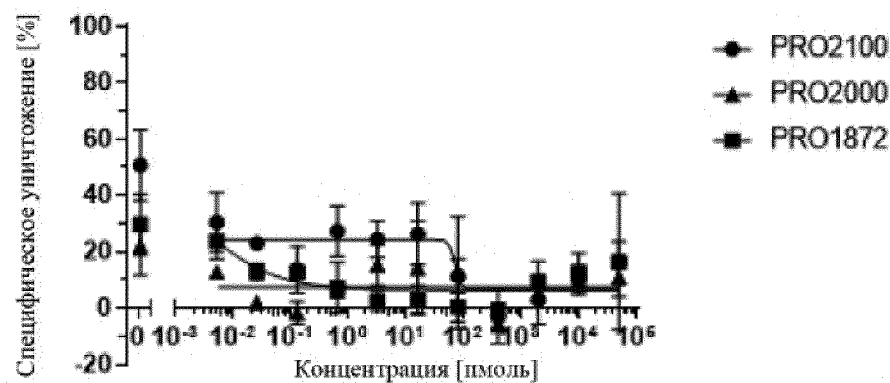
A



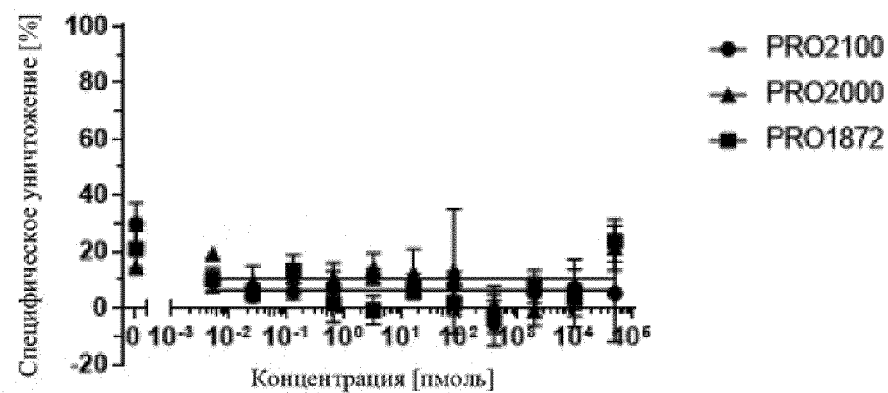
B



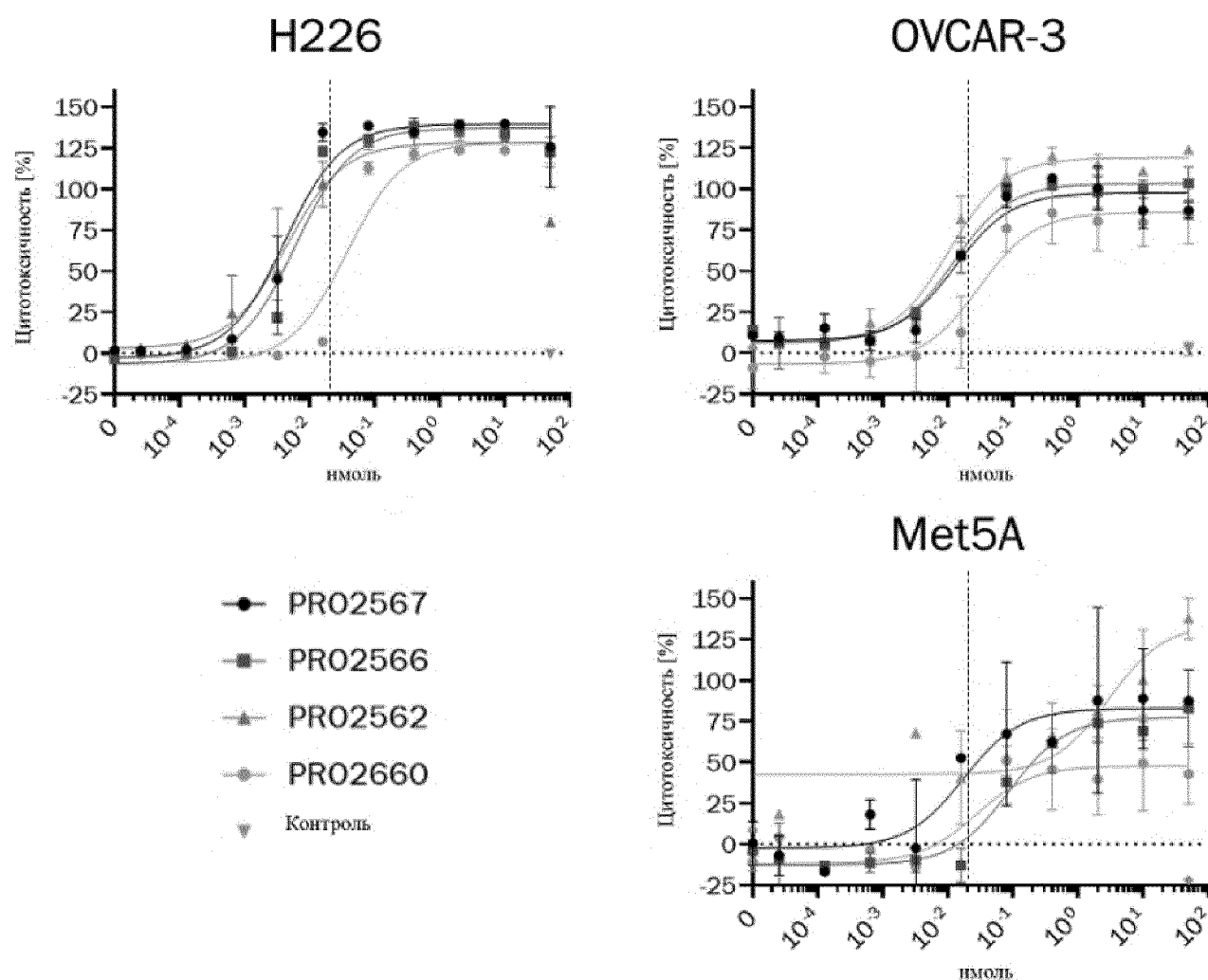
C



D

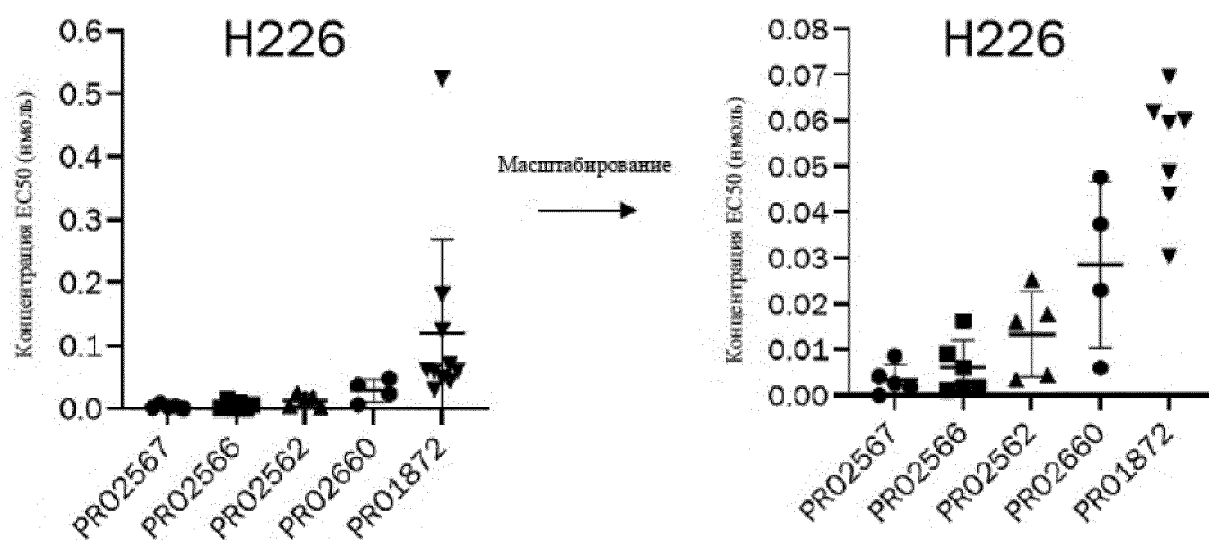


Фиг. 9

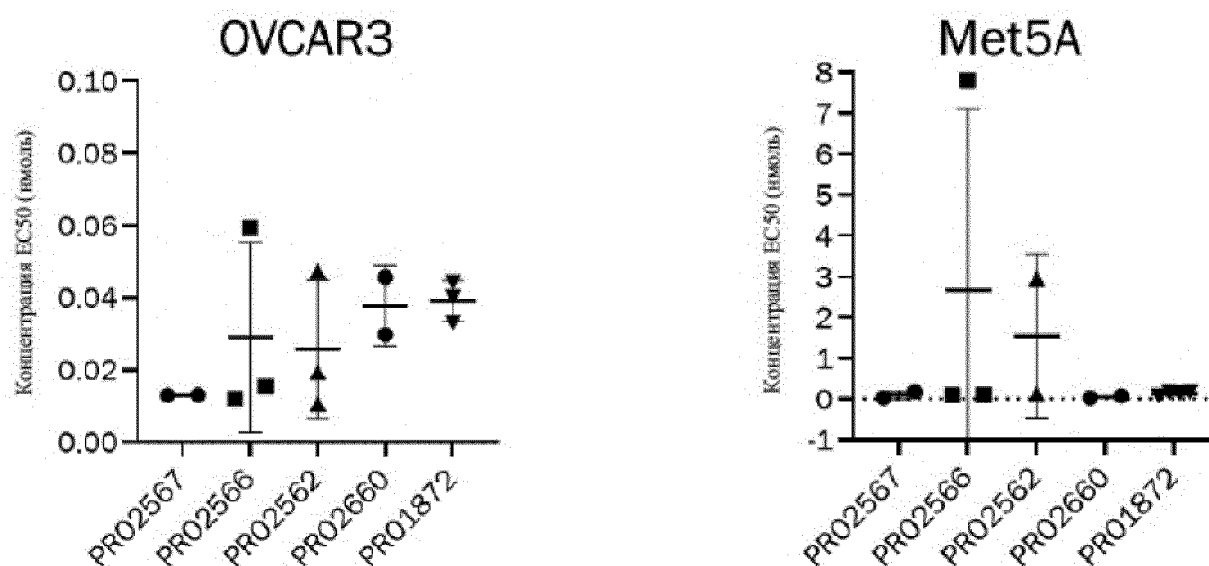


Фиг. 10

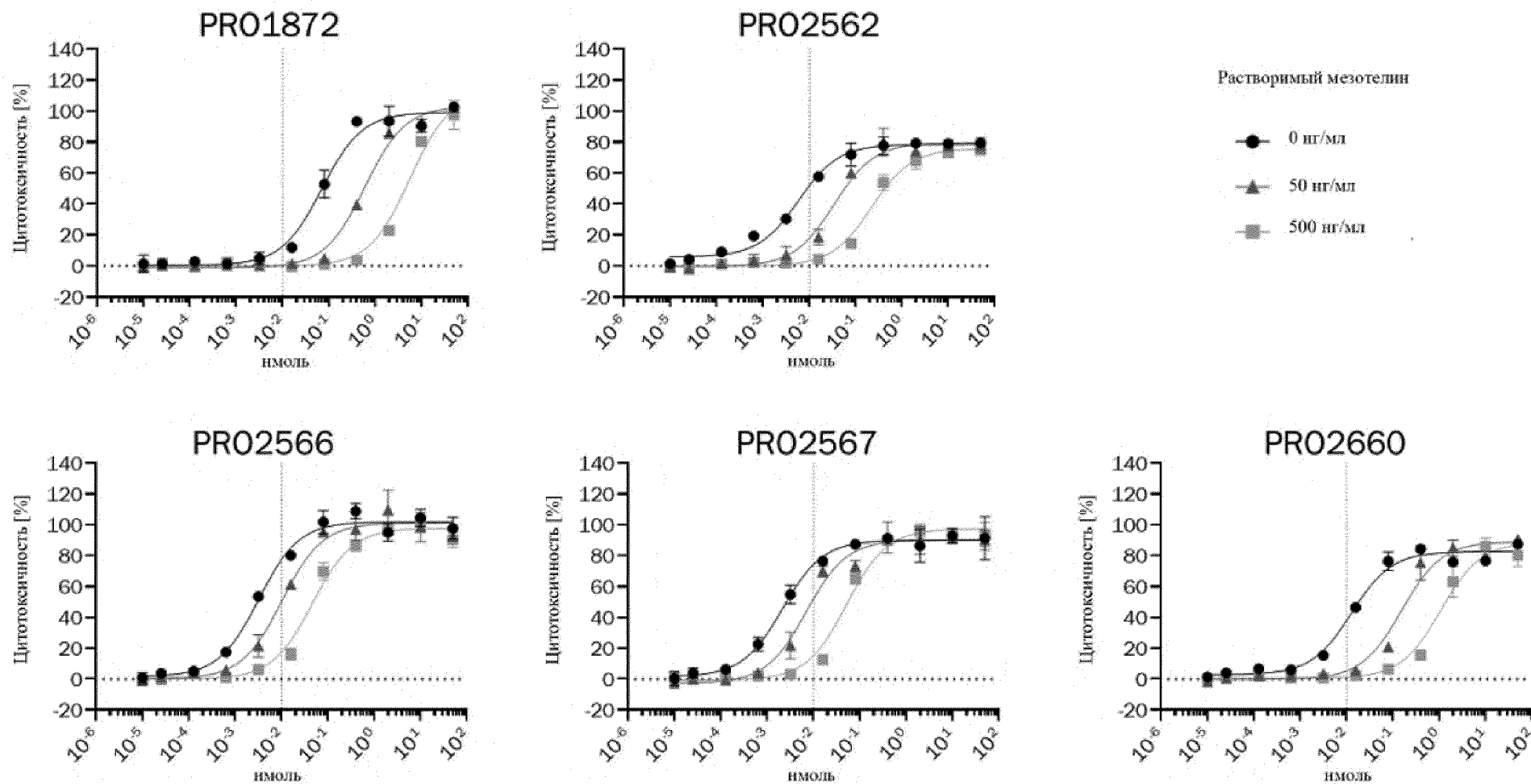
**A**



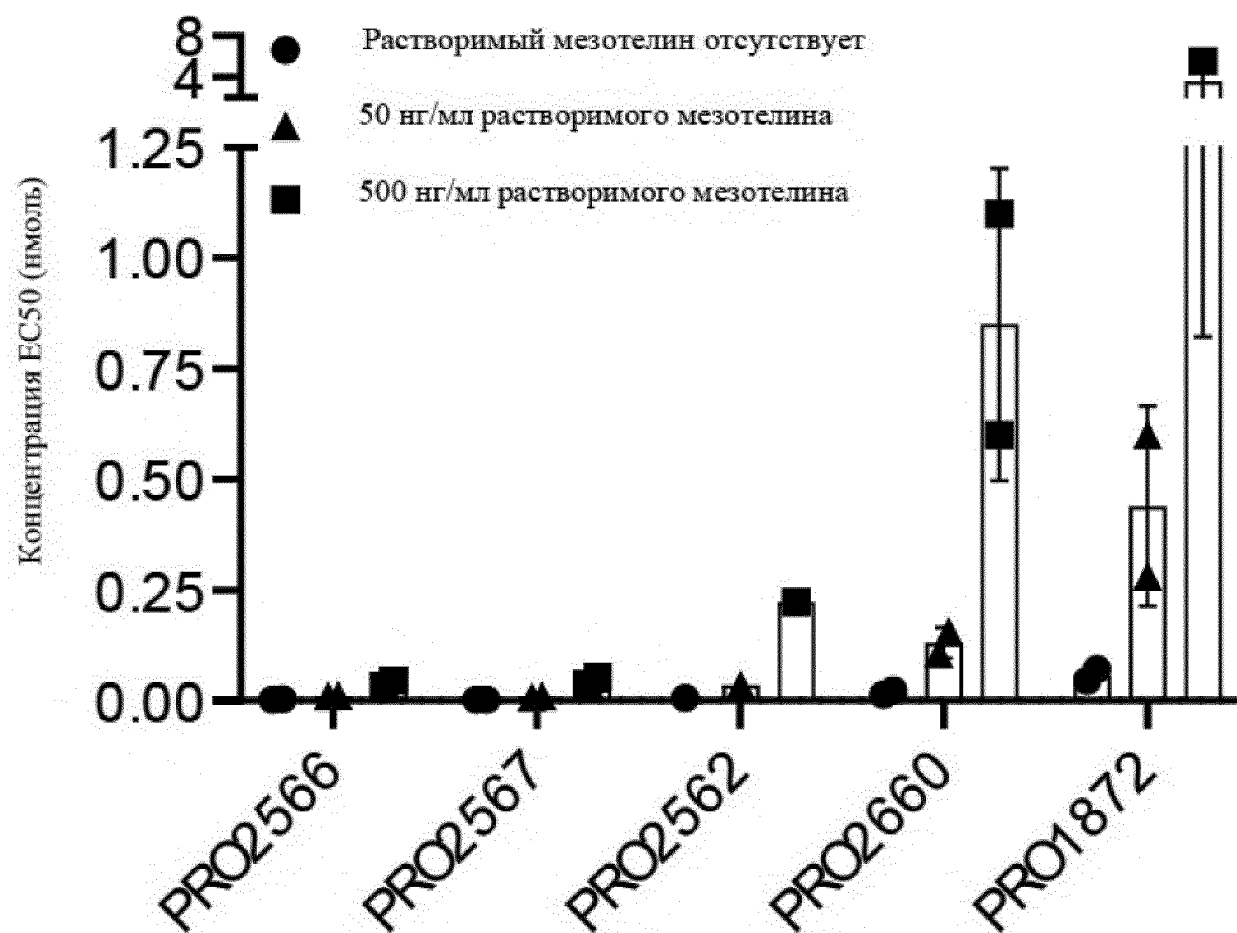
**B**



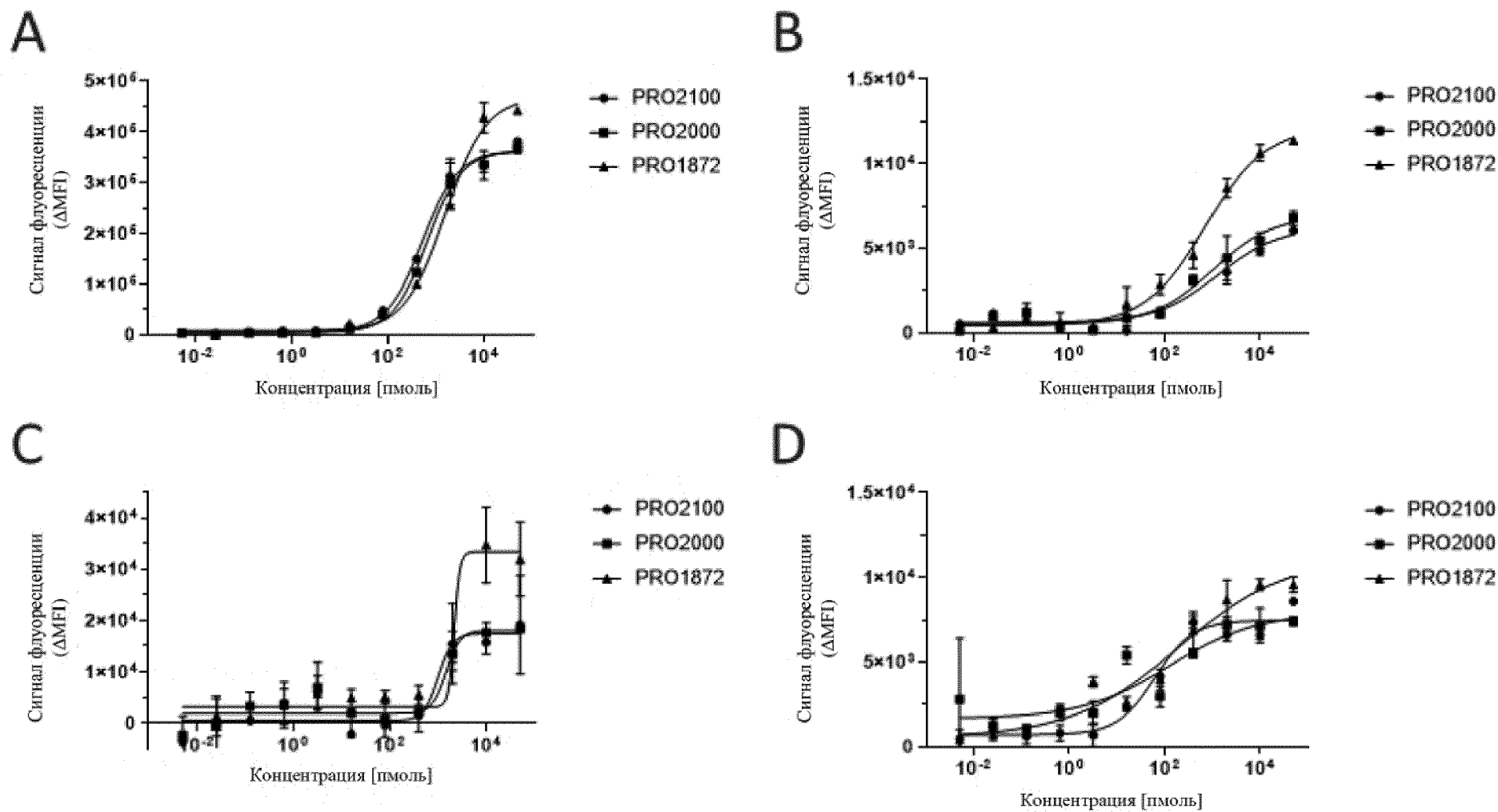
Фиг. 11



Фиг. 12



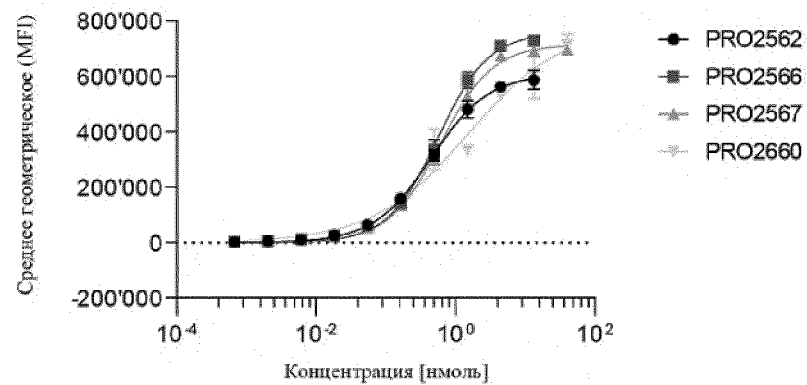
Фиг. 13



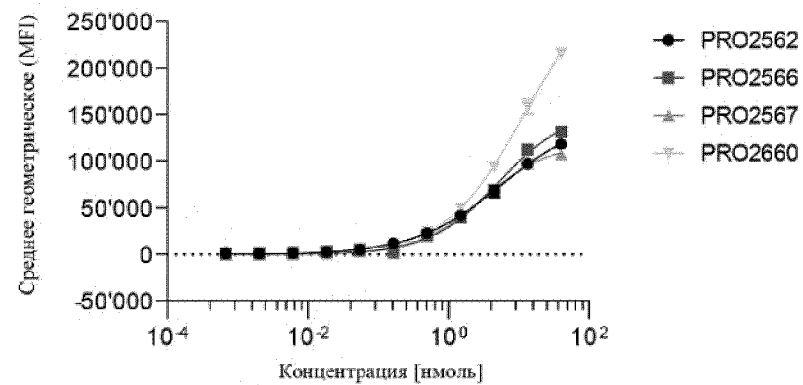
Фиг. 14



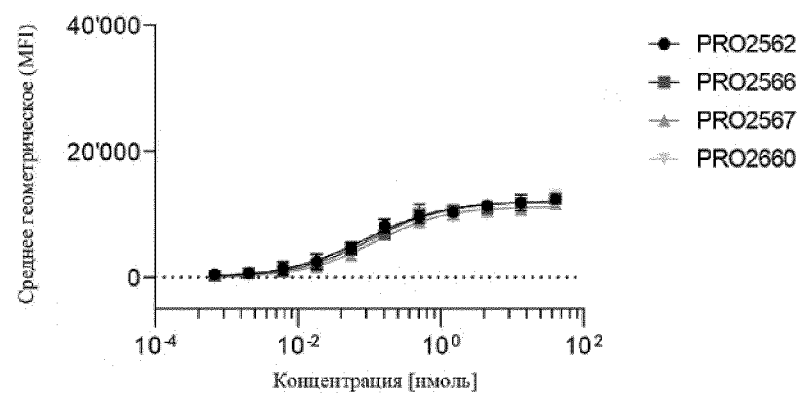
**E**



**F**

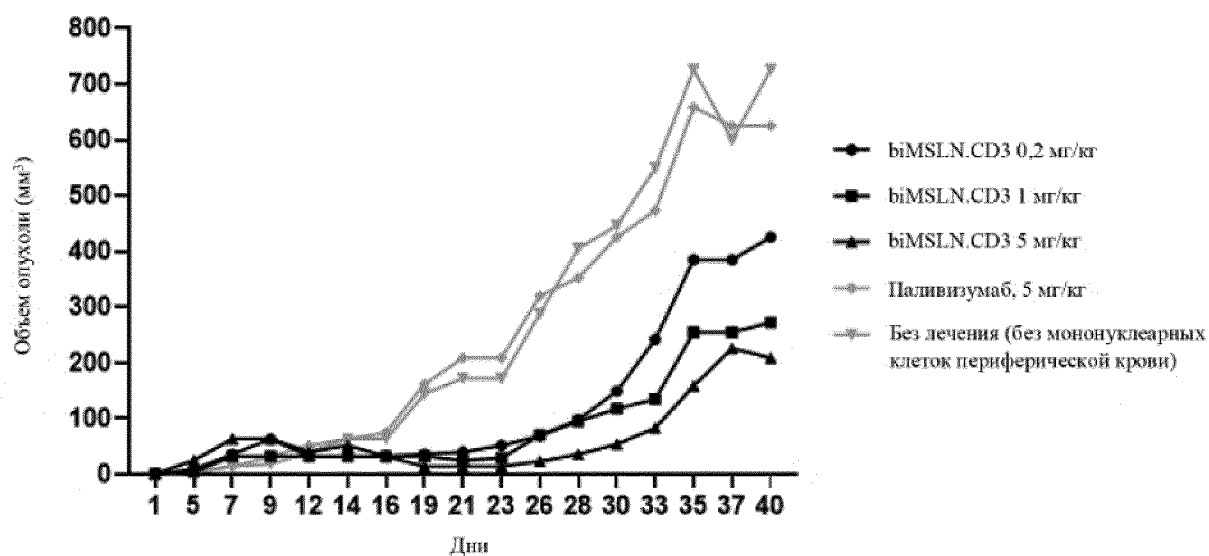


**G**

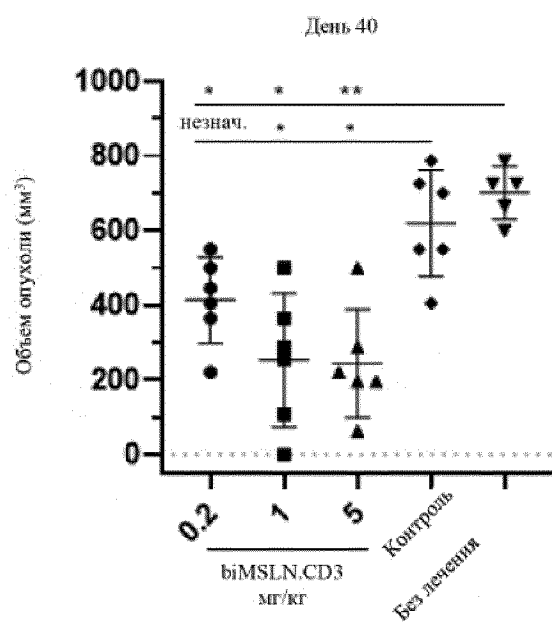


Фиг. 14 (продолжение)

A

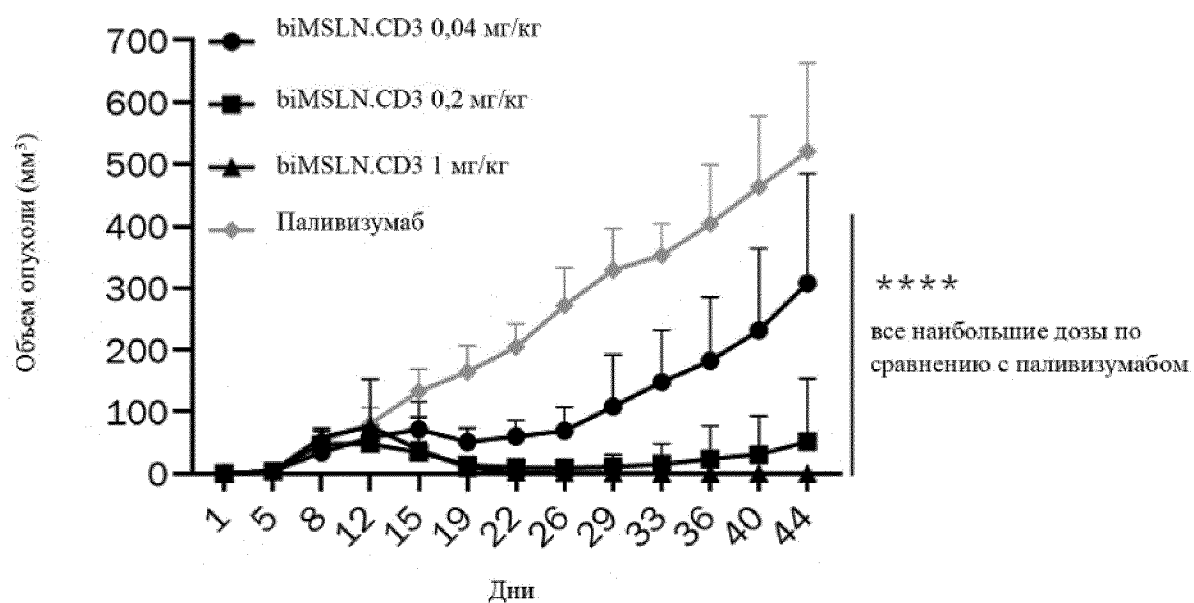


B

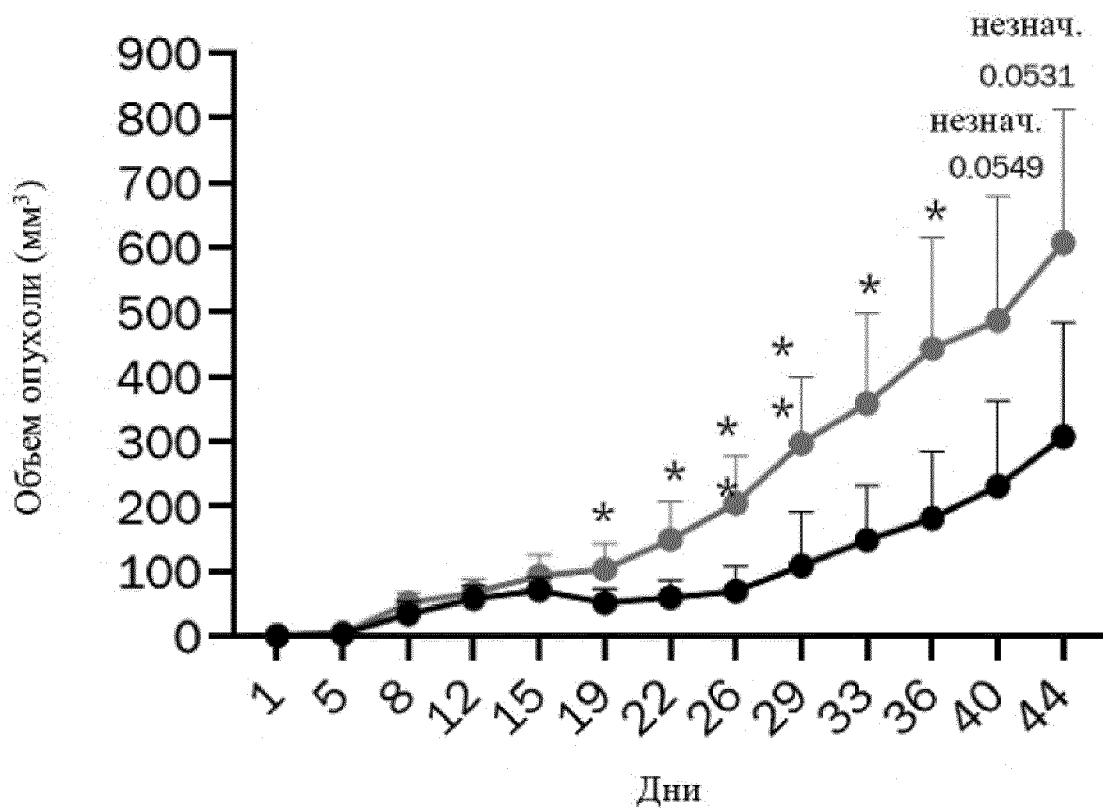


Фиг. 15

A



Фиг. 16

**B**

**Фиг. 16 (продолжение)**