(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202392313 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.30

(22) Дата подачи заявки
2022.02.17

(51) Int. Cl. ***A61P 35/00*** (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(54) ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ВАРИАБЕЛЬНОМУ ДОМЕНУ ДЕЛЬТА-ЦЕПИ 1 TCR

(31) **2102224.9; 2111685.0**
(32) **2021.02.17; 2021.08.14**
(33) **GB**
(86) **PCT/EP2022/054011**
(87) **WO 2022/175414 2022.08.25**

(71) Заявитель:
ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС ЛТД; Ф-СТАР ТЕРАПЬЮТИКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Туна Михрибан, Уден Марк, Фридман Джошуа, Маунт Натали (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, содержащим область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); а область Fc содержит EGFR-связывающий сайт. Настоящее изобретение также относится к композициям и фармацевтическим композициям, содержащим такие полиспецифические антитела, и способу получения таких полиспецифических антител. Настоящее изобретение также относится к способам лечения с использованием полиспецифических антител и применениям их в медицинских целях.

202392313 A1

202392313 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579053EA/022

ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ВАРИАБЕЛЬНОМУ ДОМЕНУ ДЕЛЬТА-ЦЕПИ 1 TCR

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, их фрагментам и вариантам, которые специфически связываются с Т-клеточным рецептором гамма-дельта Т-клеток и специфически связываются с EGFR.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Растущий интерес к Т-клеточной иммунотерапии рака сфокусирован на очевидной способности субпопуляций CD8+ и CD4+ альфа-бета (αβ) Т-клеток распознавать раковые клетки и опосредовать иммунологические защитные функциональные потенциалы, в частности при дерепрессии клинически опосредованным антагонизмом ингибирующих путей, определяющихся PD-1, CTLA-4 и другими рецепторами. Однако αβ Т-клетки являются MHC-ограниченными, что может привести к болезни «трансплантат против хозяина».

Гамма-дельта Т-клетки (γδ Т-клетки) представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отличающийся специфический γδ Т-клеточный рецептор (TCR). Этот TCR состоит из одной гамма (γ) и одной дельта (δ) цепи, каждая из которых подвергается перестройке цепи, однако имеет ограниченное количество V-генов по сравнению с αβ Т-клетками. Основными сегментами гена TRGV кодирующими Vγ, являются TRGV2, TRGV3, TRGV4, TRGV5, TRGV8, TRGV9 и TRGV11 и нефункциональные гены TRGV10, TRGV11, TRGVA и TRGVB. Наиболее частые сегменты гена TRDV кодируют Vδ1, Vδ2 и Vδ3, а также несколько V-сегментов, которые имеют обозначение Vδ и Vα (Adams *et al.*, 296:30-40 (2015) *Cell Immunol.*). Человеческие γδ Т-клетки можно в общих чертах классифицировать на основании их цепей TCR, так как определенные типы γ и δ обнаруживаются на клетках чаще, хоть и не исключительно, в одном или более типах тканей. Например, большинство присущих крови γδ Т-клеток экспрессируют Vδ2 TCR, обычно Vγ9Vδ2, тогда как это является менее распространенным среди присущих тканям γδ Т-клеток, таких как клетки кожи, которые чаще используют Vδ1 TCR, спаренную с гамма-цепями, например, часто спаренную с Vγ4 в кишечнике.

γδ Т-клетки играют решающую роль в иммунном надзоре, распознавая злокачественные или трансформированные клетки (такие как раковые клетки) с помощью набора маркеров стресса, а затем проявляя мощную и селективную цитотоксичность. Поэтому γδ Т-клетки могут функционировать как регуляторы иммунного ответа. Модуляция этих клеток *in situ* дает возможность увеличить иммуногенность даже в опухолях с низкой мутационной нагрузкой, которые оказались неэффективными при использовании других видов иммунотерапии. Распознавание опухолей γδ Т-клетками не зависит от какого-либо одного опухолевого антигена, поэтому модуляторы γδ Т-клеток могут применяться для лечения целого ряда заболеваний, включая гематологические и

солидные злокачественные опухоли. Механизм распознавания γδ Т-клеток не ограничивается МНС.

Авторы WO2019147735 предполагают, что некоторые γδ клетки обладают проопухолевой активностью или ингибируют противораковый иммунный ответ, опосредованный αβ Т-клетками. Авторы утверждают, что γδ Т-клетки являются иммуносупрессантами, и поэтому предлагают истощать, подавлять или блокировать их при злокачественном новообразовании с помощью антител.

Однако, несмотря на доминирующее мнение о том, что антитела к γδ будут негативно модулировать функцию γδ клеток, блокируя или уничтожая такие клетки, было обнаружено, что существует положительная корреляция между инфильтрацией γδ Т-клеток и прогнозом и/или выживаемостью пациентов.

По сравнению с пониманием взаимодействия рецептора/лиганда αβ TCR, понимание взаимодействия рецептора vδ1 TCR/лиганда ограничено. В отсутствие такого понимания антитела, которые распознают vδ1 TCR, на сегодняшний день являются в значительной степени исследовательскими инструментами для изучения этого взаимодействия. Такие инструменты, как правило, представляют собой грубые блокирующие антитела, которые предполагают, что взаимодействие рецептора TCR/лиганда приводит к блокированию, подавлению или разрушению vδ1+ клеток. Например, инструментальные антитела TS8.2 и TS-1 используются в качестве блокирующих антител к γδ в исследованиях, которые предполагают, что указанные антитела снижают цитотоксичность vδ1 клеток. Эти исследования, в сочетании с другими, предполагают, что использование таких антител к vδ1 для благоприятной модуляции цитотоксичности vδ1 клеток в условиях заболевания *in situ* немыслимо, и поэтому существует потребность в антителах, которые увеличивают, а не снижают цитотоксичность vδ1.

Для использования γδ Т-клеток в иммунотерапии необходимы либо средства для экспансии клеток *in situ*, либо для их сбора и экспансии *ex vivo* перед реинфузией. Последний подход ранее был описан с использованием добавления экзогенных цитокинов, например, см. WO 2017/072367 и WO 2018/212808. Были описаны способы экспансии собственных γδ Т-клеток пациентов с использованием фармакологически модифицированных форм гидроксиметилбут-2-енилпирофосфата (HMBPP) или клинически одобренных аминобисфосфонатов. С помощью этих подходов лечили более 250 пациентов со злокачественным новообразованием, казалось бы, безопасно, но полная ремиссия наблюдалась лишь в редких случаях. Однако по-прежнему существует потребность в активирующих агентах, обладающих доказанной способностью к экспансии большого количества γδ Т-клеток.

Кроме того, весьма перспективным в качестве лекарственного препарата может быть связывающий или активирующий агент, способный предпочтительно нацеливаться или связываться, или распознавать, или специфически модулировать, или увеличивать количество Vδ1+ клеток *in situ*.

Однако, хотя существуют лекарственные препараты, которые потенциально

модулируют Vδ2+ клетки, включая аминобисфосфонаты, такие как Zometa® (золедроновая кислота), указанные лекарственные препараты в первую очередь предназначены для замедления костной реабсорбции. И независимо от указанной модуляции Vδ2+, существует необходимость в разработке лекарственных препаратов, специально предназначенных для связывания, нацеливания, модуляции, активации или увеличения количества Vδ1+ клеток. Это связано с тем, что, например, повторная модуляция Vδ2+ может привести к длительному и постепенно истощающемуся фенотипу.

Кроме того, учитывая преобладающую присущую ткани природу Vδ1+, идеальный лекарственный препарат, способный модулировать Vδ1+, также будет проявлять меньше «нецелевых» нежелательных эффектов и быстрый почечный клиренс. Как правило, указанные нежелательные эффекты могут проявляться при использовании низкомолекулярных химических веществ. Например, вышеупомянутые аминобисфосфонаты, способные модулировать отдельный класс Vδ2+ клеток (в качестве вторичного эффекта по сравнению с первичным модулирующим эффектом на кости), связаны с почечной токсичностью, которая проявляется ухудшением почечной функции и потенциальной почечной недостаточностью (например, Markowitz et al. (2003) Kidney Int. 64(1):281-289). Дополнительные нежелательные эффекты, перечисленные Европейским медицинским агентством для Zometa, включают анемию, реакции гиперчувствительности, гипертонию, фибрилляцию артерий, миалгию, общую боль, недомогание, повышение уровня мочевины в крови, рвоту, отек суставов, боль в груди и т. д.

Необходимо также дополнительно учитывать среду *in situ*, в которой находятся vδ1+ клетки.Например, ранее было показано, что негематопоэтические присущие тканям γδ Т-клетки проявляли сильную пролиферативную реакцию при первом отделении от ткани, но только в том случае, если они не находились в прямом клеточном контакте с аутологичными фибробластами.Установлено, что для функционирования негематопоэтических присущих тканям Т-клеток (γδ Т-клеток) необходимо отделить их от негематопоэтических клеток (например, стромальных клеток, в частности, фибробластов). Это связано с тем, что прямой контакт лимфоцитов со стромальными или эпителиальными клетками, по-видимому, ингибирует экспансию присущих тканям γδ Т-клеток. Наблюдение, что предварительно активированные клетки *in situ* в дальнейшем находятся в подавленном состоянии, является еще одной причиной, по которой vδ1 клетки до настоящего времени не рассматривались в качестве перспективной терапевтической мишени. Действительно, до описанных в данном документе открытий не представлялось, как можно благоприятно и селективно модулировать эти клетки in situ, причем vδ1+ клетки крови и тканей, как правило, считаются «покоящимися», «предварительно активированными» или «неактивированными».

Следовательно, существует потребность в улучшенных лекарственных препаратах, специально предназначенных для воздействия на Vδ1+ клетки и для лечения инфекций, аутоиммунных состояний и злокачественного новообразования. В частности, существует потребность в лекарственных препаратах, которые можно вводить для облегчения

проявлений и симптомов заболевания путем специфического связывания Vδ1+, клеток нацеливания на Vδ1+ клетки, специфической активации Vδ1+ клеток, специфического усиления пролиферации и/или цитотоксической активности Vδ1+ клеток или специфического блокирования активации Vδ1+ клеток.

Различные форматы биспецифических и полиспецифических антител были разработаны для различных терапевтических целей. Би- и полиспецифические антитела можно разделить на отдельные, хотя и перекрывающиеся, классы, основанные на типах биологических мишеней и механизмах действия. Например, такие полиспецифические антитела можно разделить на классы, такие как перенаправляющие цитотоксические эффекторные клетки соединения (также известные как рекрутирующие Т-клетки биспецифические антитела, привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы, TCE или BiTE) и двойные иммуномодуляторы (DI).

TCE (привлекающие Т-клетки активаторы) предназначены для усиления иммунного ответа пациента на опухоли путем нацеливания Т-клеток на опухолевые клетки или наоборот, и работают путем нацеливания на первый эпитоп комплекса Т-клеточного рецептора Т-клетки (обычно CD3) и второй эпитоп, который представляет собой раковый антиген или ассоциированный с раком антиген, такой как опухолеассоциированный антиген (TAA). Такие антитела обеспечивают совместную локализацию опухолевых клеток и Т-клеток, что способствует уничтожению опухолевых клеток. Примеры BiTE включают биспецифическое антитело к CD3 x CD19 блинатумомаб, биспецифическое антитело к CD3 x EpCAM катумаксомаб и биспецифическое антитело к CD3 x HER2 эртумаксомаб. TCE, такие как BiTE, как правило, представлены в формате scFv, хотя были представлены и в других форматах. Например, BiKE похожи на BiTE, но нацелены на CD16 на NK-клетках, а не на CD3.

Т-клеточный рецептор был описан как наиболее сложная рецепторная структура иммунной системы млекопитающих. Он включает трансмембранный многобелковый рецепторный комплекс, включающий Т-клеточный рецептор в непосредственной близости от ряда цепей CD3. Например, у млекопитающих типичный такой комплекс включает Т-клеточный рецептор, цепь CD3γ, цепь CD3δ и две цепи CD3ε. Эти цепи связываются с Т-клеточным рецептором (TCR) вместе с ζ-цепью (дзета-цепью), которые в сочетании затем образуют типичные сигналы активации в Т-лимфоцитах. Однако были зарегистрированы и альтернативные комплексы. Например, были описаны комплексы Т-клеточного рецептора, содержащие Т-клеточный рецептор и гомодимер дзета-цепи. Дополнительные корецепторы, такие как CD4 и CD8, также могут способствовать функционированию TCR.

Независимо от состава рецепторного комплекса, хорошо известно, что эти комплексы передают сигналы о связывании с клеточной поверхностью во внутриклеточный сигнальный каскад фосфорилирования. Такие события фосфорилирования завершаются активацией факторов транскрипции, таких как NFAT и NFkB, что приводит к увеличению экспрессии цитокинов и эффекторных белков, таких как гранзимы и перфорин.

Тем не менее, несмотря на то, что использование таких TCE для лечения

злокачественного новообразования остается убедительной концепцией, на сегодняшний день и даже после 30 лет объединенных усилий по продвижению TCE на ранних стадиях клинических исследований многие из таких биспецифических антител продемонстрировали низкую безопасность, эффективность и технологичность. Действительно, по состоянию на январь 2020 года блинатумомаб остается единственным одобренным TCE, который затем не был отозван. Этот полиспецифический фрагмент антитела TCE связывает комплекс Т-клеточного рецептора на первом связывающем плече и мишень CD19 на втором связывающем плече.

Рекрутирующие Т-клетки биспецифические антитела обсуждаются в Lejeune et al., 2020, Front Immunol., 11:762. Однако существующие биспецифические антитела этой категории, в частности те, которые рекрутируют Т-клетки посредством связывания с CD3, обладают существенными нецелевыми эффектами, которые приводят к серьезным побочным эффектам, учитывая эффективность антигена CD3 в качестве трансдуктора сигнала и его повсеместное присутствие в популяции Т-клеток пациента. Следовательно, для биспецифических агентов, нацеленных на CD3, таких как катумаксомаб (в настоящее время снят с производства), системная доставка (например, внутривенная) не является реальной перспективой. Вместо этого чаще предполагается более узконаправленная доставка, например, интраоперационная, интраперитонеальная, интраабдоминальная и т. д. Таким образом, это ограничивает опциональность и применение указанных биспецифических соединений в качестве лекарственных препаратов. Действительно, даже для эффектор-аттенуированных антител к CD3 (т. е. взаимодействующего с Т-клеточным комплексом активатора, нацеленного на CD3, но не биспецифического), связанная с этим токсичность затрудняет внутривенную доставку. Например, для ограничения воздействия и снижения токсичности в настоящее время чаще всего рассматривается возможность перорального введения антитела к CD3 форалумаба (например, при лечении заболеваний кишечника).

Часто утверждается, что многие из наблюдающихся в настоящее время проблем с такими TCE в ранних клинических исследованиях связаны с использованием высокоаффинных связывающих Т-клеточный комплекс доменов. Кроме того, было высказано предположение, что это происходит потому, что при разработке этих TCE не было уделено должного внимания низкой аффинности естественного связывания TCR-комплексов, и этому препятствовала тяжелая дозолимитирующая токсичность, что привело к чрезмерно узкому терапевтическому окну. В связи с этим было подчеркнуто, что многие ранние разработчики лекарственных препаратов TCE использовали три домена, связывающие Т-клеточный комплекс CD3, полученные из OKT3, SP34 и UCHT1. И все эти исходные связывающие домены связываются с относительно высокой аффинностью в диапазоне от однозначных до низких двухзначных чисел в нМ, что примерно в 1000 раз превышает аффинность для естественного связывания. В свою очередь было высказано предположение, что это может привести к совершенно разным (и часто неблагоприятным) эффектам для активации Т-клеток по сравнению с естественным связыванием комплекса Т-

клеточного рецептора. Например, разработчики TCE, использующие платформы, основанные на OKT3 с более высокой аффинностью, могут быть сбиты с толку тем фактом, что OKT3 вызывают апоптоз Т-клеток в присутствии IL-2.

По этим причинам стало очевидным, что связывание комплексов Т-клеток с более низкой аффинностью является важным фактором для определения параметров дизайна терапевтических средств на основе привлекающих Т-клетки биспецифических антител.

Другой проблемой при разработке указанных TCE является необходимость ослабления функции Fc. Действительно, как правило, TCE требуют полного подавления Fc-опосредованных эффекторных функций, чтобы максимизировать терапевтическую эффективность и минимизировать нецелевую токсичность, поскольку связывание Fc с Fc-гамма-рецептором (FcγR) приводит к активации эффекторных иммунных клеток. В действительности, большинство нацеленных на CD3 биспецифических антител, которые в настоящее время используются в клинической практике, имеют домены Fc со сниженной активностью связывания с FcγR или преднамеренно представляют собой биспецифические фрагменты без области Fc. Обычно ожидается, что TCE с неаттенуированной функцией Fc будет индуцировать эффект антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и тем самым истощать популяцию γδ Т-клеток, распознаваемых антителом. Однако, опять же, ослабляя такую функциональность, чтобы избежать сложностей с токсичностью/безопасностью, можно также ослабить потенциально важные аспекты эффективности, например,

взаимодействие с CD16+ или CD32+ или CD64+ иммунными клетками, или уменьшение периода полужизни биспецифического соединения (например, при использовании меньших фрагментов биспецифических антител, таких как BITE). Ожидается, что способы уменьшения взаимодействия FcγR и TCE (такие как использование формата IgG, предназначенного для уменьшения указанного взаимодействия) уменьшат Fc-опосредованную иммобилизацию TCE и уменьшат кластеризацию TCR путем перекрестного связывания с иммобилизованным TCE.

Для решения некоторых, но не всех этих проблем, многие компании, такие как Xencor (Пасадена, штат Калифорния), Macrogenics (Гейтерсбург, штат Мэриленд) и Genentech (Сан-Франциско, штат Калифорния), недавно сообщили о снижении аффинности плеча, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, на соответствующих платформах TCE. Однако снижение аффинности указанного связывания может привести к меньшей эффективности и меньшей опциональности с точки зрения дизайна и функциональности TCE. Например, в настоящее время продемонстрировано, что аффинность связывающих доменов в таких TCE определяет профиль распределения in vivo. В частности, как правило, наблюдается, что распределение TCE смещено в сторону мишени с наивысшей аффинностью. Следовательно, за счет снижения аффинности связывающего домена TCE к Т-клеточному комплексу обычно происходит смещение распределения от Т-клеток - тех самых клеток, которые необходимы для обеспечения эффективности таких TCE. Частично по этим причинам терапевтические окна для TCE были названы «запредельно узкими».

Кроме того, для иммуномодулирующей терапии, особенно при солидных опухолях, все еще сохраняются значительные дополнительные сложности. Например, современные подходы включают биспецифические антитела, нацеленные на CD3, где первый домен связывает CD3, а второй домен нацелен на TAA. Однако часто это оказывается проблематичным. Например, в публикации Middelburg J, *et al*. Overcoming Challenges for CD3-Bispecific Antibody Therapy in Solid Tumors.*Cancers*. 2021; 13(2):287 обобщены некоторые из этих проблем для солидной опухоли для таких полиспецифических, привлекающих Т-клетки, иммуномодулирующих фрагментов, включая:

целевые внеопухолевые проблемы токсичности, например, авторы подчеркивают, что TAA солидных опухолей часто также экспрессируются в тканях здоровых органов, что, в свою очередь, может привести к иммунной патологии и недостаточности органов с потенциальной летальностью, как показано на доклинических исследованиях на мышах с использованием биспецифического соединения к CD3.

наличие эффекторных клеток в микроокружении опухоли (TME) - например, обычные CD3+ «наивные» Т-клетки существуют в основном в крови и лимфатической системе без какой-либо дополнительной активации, опосредованной дендритными клетками.

качество инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), учитывая, что они могут включать CD3+ Treg и/или истощенные CD3+ клетки, например, биспецифические соединения, нацеленные на CD3, могут индуцировать апоптоз TIL посредством индуцированной активацией гибели клеток, что препятствует сильному противоопухолевому ответу.

Следовательно, существует потребность в улучшенных полиспецифических иммуномодулирующих лекарственных препаратах, в которых по меньшей мере один связывающий домен связывается с Т-клеткой, а по меньшей мере один второй связывающий домен нацелен на TAA.

Также существует потребность в улучшенных лекарственных препаратах, специально предназначенных для нацеливания на Vδ1+ клетки и для лечения инфекций, аутоиммунных состояний и злокачественного новообразования. В частности, существует потребность в лекарственных препаратах, которые можно вводить для облегчения проявлений и симптомов заболевания путем специфического связывания Vδ1+, клеток нацеливания на Vδ1+ клетки, специфической активации Vδ1+ клеток, специфического усиления пролиферации и/или цитотоксической активности Vδ1+ клеток или специфического блокирования активации Vδ1+ клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к высокоаффинным антителам, которые содержат множество антигенсвязывающих сайтов («полиспецифические антитела»), включая антигенсвязывающий сайт для вариабельного домена дельта-цепи 1 TCR (Vδ1) и антигенсвязывающий сайт для EGFR. Более конкретно, настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, содержащим область Fab и область Fc, где область Fab

содержит сайт связывания, специфичный для эпитопа вариабельной домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и область Fc содержит сайт связывания, специфичный для EGFR.

Полиспецифические антитела по настоящему изобретению имеют формат, известный как «антитела мкАт^2» или «антитело мкАт с двумя связывающими доменами», которые представляют собой антитела, содержащие область Fc, которая была сконструирована так, чтобы содержать антигенсвязывающие петли в своем домене CH3 - эта модифицированная область Fc называется «Fcab» (Fc со связыванием антигена). Полученные Fcab можно быстро встроить в формат природного антитела IgG для создания четырехвалентных биспецифических антител мкАт^2, которые связываются с двумя разными антигенами. Таким образом, антитело мкАт^2 дополнительно содержит область Fab, содержащую пару доменов VH-VL, обеспечивающую антигенсвязывающий сайт. Молекулы мкАт^2 по настоящему изобретению содержат EGFR-связывающий Fcab и vδ1-связывающий Fab.

Антитела по настоящему изобретению имеют предпочтительный функциональный профиль. В частности, в отличие от антител к Vδ1 предшествующего уровня техники, которые направлены на истощение Vδ1 Т-клеток, антитела по настоящему изобретению применимы для активации Vδ1 Т-клеток. Хотя они могут вызывать снижение количества TCR на Т-клетках, с которыми они связываются, они не вызывают истощения Т-клеток Vδ1, а скорее стимулируют Т-клетки и, следовательно, могут быть полезны в терапевтических условиях, которые могут быть полезны при активации этого компартмента Т-клеток. Активация Vδ1 Т-клеток проявляется в снижении уровня TCR, изменениях маркеров активации, таких как CD25, Ki67 , маркер дегрануляции CD107a, NCR (рецепторы естественной цитотоксичности) и/или 4-1BB. Активация Vδ1 Т-клеток, в свою очередь, запускает высвобождение воспалительных цитокинов, таких как INFγ и TNFα, для стимулирования иммунного лицензирования. Удивительно, но антитела, имеющие подходящую высокую аффинность к TRDV1, вызывают повышенное уничтожение Vδ1 Т-клеток, и, в отличие (например) от антител, нацеленных на CD3, возможно получение антител с высокой аффинностью без побочных эффектов, связанных с массовой активацией через CD3. В свою очередь, высокоаффинные антитела способны вызывать сильный иммуностимулирующий эффект через опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL). Это может быть достигнуто с минимальным истощением или уничтожением Vδ1 клеток. Следовательно, полиспецифические антитела по изобретению можно считать агонистическими антителами.

Области Fcab, содержащиеся в полиспецифических антителах по настоящему изобретению, имеют меньшую поверхность связывания, чем типичные связывающие сайты моноклональных антител. Если плечи Fab типичного мкАт разделены гибкой шарнирной областью, связывающие сайты Fcab образуют компактный фрагмент антитела с двумя связывающими сайтами, расположенными близко друг к другу. Два антигенсвязывающих сайта Fcab также пространственно близки друг к другу по сравнению с сайтами типичного

моноклонального антитела. Учитывая этот меньшую поверхность связывания и уменьшенную гибкость двух связывающих сайтов, удивительно, что полиспецифические антитела по изобретению (содержащие области Fcab) способны связываться и ингибировать EGFR с такой же аффинностью и активностью, что и эталонные моноклональные антитела.

Согласно первому аспекту изобретения предложено полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и область Fc содержит EGFR-связывающий сайт.

Во втором аспекте изобретения предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая полиспецифическое антитело по изобретению. Например, предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый связывающий домен к Vδ1, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 199-222, 224-247, 249-259 или 261-271.

В третьем аспекте изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность по изобретению. Также предложена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотидную последовательность по изобретению или вектор экспрессии по изобретению. Также предложен способ получения любого полиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в среде для культивирования клеток.

В дополнительном аспекте изобретения предложена композиция, содержащая полиспецифическое антитело по изобретению. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело по изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Композиции и фармацевтические композиции могут необязательно дополнительно содержать один или более дополнительных терапевтически активных агентов.

В дополнительном аспекте изобретения предложен набор, содержащий полиспецифическое антитело по изобретению или фармацевтическую композицию по изобретению, необязательно включающую инструкции по применению и/или дополнительный терапевтически активный агент.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению. Также предложен способ модуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению. Введение антител субъекту может быть введением в терапевтически эффективном количестве.

В еще одном аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело по изобретению, или фармацевтическая композиция по изобретению, или набор по

изобретению для применения в медицине. Также предложено применение полиспецифического антитела по изобретению при производстве лекарственного препарата.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: Раунды селекции фагов. (A) Раунд селекции фагов округляется 1-3 для библиотеки ADT1-7. **(B)** Раунд селекции фагов 1-3 для библиотеки ADT1-4. **(C)** Раунд селекции фагов 1-3 для библиотеки ADT1-4 со стратегией селекции для выделения связывающих веществ, перекрестно реактивных для молекул яванского макака.

Фиг. 2: Схематический обзор селекции созревших антител с помощью дисплея на клетках млекопитающих. (A) Схема проточной сортировки библиотеки ADT1-7. **(B)** Схема проточной сортировки библиотеки 1 ADT1-4 (человек). **(C)** Схема проточной сортировки библиотеки 2 ADT1-4 (яванский макак).

Фиг. 3. Влияние изменения S74L на аффинность. (A) Полученные соединения дисплея на клетках млекопитающих для линии ADT1-4: скорость диссоциации для человеческих молекул (SPR) по сравнению со связыванием человеческого антигена (ELISA Delfia, 0,4 нМ человеческого антигена) с использованием LC 74S (незаштрихованный кружок) или 74L (закрашенный кружок). Результаты подчеркивают хорошее соответствие между улучшенной аффинностью с помощью SPR и связыванием антигена с помощью ELISA Delfia. Эти результаты также подчеркивают улучшенное связывание, обеспечиваемое модификацией вариабельного домена S74L. **(B)** Результаты дисплея на клетках млекопитающих для линии дифференцировки ADT1-4: скорость диссоциации для молекул яванского макака (SPR) по сравнению со связыванием антигена яванского макака (ELISA Delfia, 10нМ антигена яванского макака) с использованием LC 74S (незаштрихованный кружок) или 74L (закрашенный кружок). **(C)** Результаты дисплея на клетках млекопитающих для линии ADT1-4: Корреляция между улучшением скорости диссоциации антигена человека (SPR) и скоростью диссоциации антигена яванского макака (SPR) с использованием LC 74S (незаштрихованный кружок) или 74L (закрашенный кружок).

Фиг. 4: Применение и перекрестный обмен CDR3. (A) Пример перекрестного обмена тяжелых цепей и легких цепей между антителами с созревшей аффинностью в линии ADT1-4 (G04) (результаты ELISA для 0,4 нМ TRDV1 человека согласно тепловой карте). Эта «тепловая карта» демонстрирует перекрестный обмен последовательностей CDR3 между различными антителами с созревшей аффинностью в линии ADT1-4, демонстрируя процесс созревания аффинности, обеспечиваемый последовательностями антител, которые не обязательно предоставлять в виде специфических пар тяжелой и легкой цепей. Результаты подчеркивают, что антитела с созревшей аффинностью могут перекрестно делиться легкими и тяжелыми цепями, и что различные комбинации LC/HC дают эквивалентные или улучшенные результаты в исследовании связывания антигена в строгих условиях. На фигуре также показан исходный клон ADT1-4 (G04) (внизу слева). **(B)** Конечная селекция линии ADT1-4: применение и перекрестный обмен CDR3 +

«Тепловая карта» связывания антигена яванского макака по сравнению с начальным исходным ADT1-4, исходным мкАт G04 (внизу слева) **(C)** Конечная селекция линии ADT1-7: применение и перекрестный обмен CDR3 + «Тепловая карта» связывания антигена человека по сравнению с начальным исходным ADT1-7, исходным мкАт E07 (внизу слева).

Фиг. 5. Кратность усиления связывания для линии ADT1-4 по сравнению с исходным G04 ADT1-4). **(A)** Кратность усиления связывания рекомбинантного человеческого антигена Vδ1. **(B)** Кратность усиления связывания рекомбинантного антигена Vδ1 яванского макака. **(C)** Кратность усиления MFI первичных Vδ1.**(D)**Кратность усиления MFI линии Vδ1 клеток PEER.

Фиг. 6. Кратность усиления связывания для линии ADT1-1 по сравнению с исходным E07 ADT1-4). (A). Кратность усиления связывания рекомбинантного человеческого антигена Vδ1. **(B).** Кратность усиления MFI первичных Vδ1. **(C).** Кратность усиления MFI линии Vδ1 клеток PEER.

Фиг. 7. Кратность улучшения связывания антигена человека (и яванского макака) по сравнению с исходными клонами. (A) Кратное улучшение связывания с человеческим антигеном. Сигнал ELISA DELFIA клонов с созревшей аффинностью по сравнению с исходным ADT1-4 (G04), 0,4 нМ рекомбинантного человеческого антигена L1 (содержащего человеческий антиген Vδ1 TCR). **(B)** Кратное улучшение связывания с антигеном яванского макака (DV1/GV77, содержащий SEQ ID NO: 308 яванского макака (зрелый, без лидера)). Сигнал ELISA DELFIA клонов с созревшей аффинностью по сравнению с исходным ADT1-4 (G04), 0,4 нМ рекомбинантного человеческого антигена L1. **(C)** Кратное улучшение связывания с человеческим антигеном. Сигнал ELISA DELFIA клонов с созревшей аффинностью по сравнению с исходным ADT1-7 (E07), 0,4 нМ рекомбинантного человеческого антигена L1.

Фиг. 8. Кратность улучшения KD для антигена человека (и яванского макака) по сравнению с исходными клонами. (A) Кратность улучшения KD антигена человека для линии ADT1-4 (G04). **(B)** Кратность улучшения KD антигена яванского макака для линии ADT1-4 (G04). **(C)** Кратность улучшения KD антигена человека для линии ADT1-7 (E07).

Фиг. 9. Анализ аффинности связывания (KD с помощью SPR) с человеческим антигеном Vδ1. (A) Поверхностный плазмонный резонанс для линии ADT1-4. **(B)** Поверхностный плазмонный резонанс для линии ADT1-7. **(C)** Значения KD и кратность изменения по сравнению с исходным клоном для линии ADT1-4. **(D)** Значения KD и кратность изменения по сравнению с исходным клоном для линии ADT1-7. **(E)** Кратность изменения KD по сравнению с исходным клоном для линии ADT1-4. **(F)** Кратность изменения KD по сравнению с исходным клоном для линии ADT1-7.

Фиг. 10. Анализ аффинности связывания (KD с помощью SPR) с антигеном яванского макака. (A)Поверхностный плазмонный резонанс линии ADT1-4 для яванского антигена. **(B)** Значения KD для линии ADT1-4 для антигена яванского макака.

Фиг. 11. Аффинность связывания с Vδ1 TCR клеточной поверхности (EC50 для

связывания с Vδ1 клеточной поверхности). (A, B) Уровень связывания мкАт к Vδ1 с двумя донорами γδ Т-клеток, ATS006 (A) и TS164 (B).**(C)** Гистограмма, представляющая средние значения 50% связывания клонов ADT1-4 и ADT1-7, связывающихся с Vδ1-положительными γδ Т-клетками, представленные как средние значения двух доноров, причем эти значения представлены в таблицах с % улучшения. **(D)** В таблице обобщены значения IC50, нанесенные на (A) и (B), и Vδ1-отрицательные типы клеток, включая HEK293A, клетки Raji и различные субпопуляции лейкоцитов с первичными мононуклеарными клетками крови. Для Vδ1-положительных γδ Т-клеток данные представлены в виде среднего значения для двух доноров.

Фиг. 12. Снижение уровня TCR (A, B) Линия ADT1-4 (A) и линия ADT1-7 (B). **(C)** Среднее уменьшение уровня TCR - результаты в виде IC50 от двух доноров клеток GD. **(D, E)** Кратность снижения уровня TCR улучшена по сравнению такой для исходного клона ADT1-4 (D) и клона ADT1-7 (E). **(F)** Значения 50%-ного эффекта из (C), с процентным улучшением, рассчитанным для соответствующих исходных вариантов ADT1-4 (верхний) и ADT1-7 (нижний). **(G)** Значения 50%-ного эффекта из (C) с кратностью улучшения, рассчитанной для соответствующих исходных вариантов ADT1-4 (верхний) и ADT1-7 (нижний).

Фиг. 13. Моноклональные антитела к Vδ1 при активации γδ, измеренной по экспрессии CD107a. (A, B) Клон ADT1-4-2 в клетках GD отдельно (A) или с клетками THP-1 (B). **(C, D)** Клон ADT1-7-3 в клетках только с клетками GD (C) или с клетками THP-1 (D). **(E)** Таблица, представляющая процентное увеличение экспрессии γδ CD107a в совместно культивируемых клетках, обработанных самой высокой концентрацией мкАт к Vδ1, по сравнению с необработанными совместно некультивируемыми γδ-клетками.**(F)** Таблица, представляющая процентное увеличение экспрессии γδ CD107a из совместно культивируемых клеток, обработанных самой высокой концентрацией мкАт к Vδ1, по сравнению с необработанными, совместно культивируемыми и совместно некультивируемыми γδ клетками.

Фиг. 14. Моноклональные антитела к Vδ1 при активации γδ, измеренной по экспрессии CD25. (A, B) Клон ADT1-4-2 в клетках GD отдельно (A) или с клетками THP-1 (B). **(C, D)** Клон ADT1-7-3 в клетках только с клетками GD (C) или с клетками THP-1 (D). **(E)** Таблица, представляющая процентное увеличение экспрессии γδ CD25 в совместно культивируемых клетках, обработанных самой высокой концентрацией мкАт к Vδ1, по сравнению с необработанными совместно некультивируемыми γδ-клетками.**(F)** Таблица, представляющая процентное увеличение экспрессии γδ CD25 из совместно культивируемых клеток, обработанных самой высокой концентрацией мкАт к Vδ1, по сравнению с необработанными, совместно культивируемыми и совместно некультивируемыми γδ клетками.

Фиг. 15. Снижение уровня TCR яванского макака (A) Сравнение способности ADT1-4-2 и ADT1-4 взаимодействовать с и снижать экспрессию VD1 на γδ-Т-клетках яванского макака. **(B)** Процент экспрессии VD1 на клеточной поверхности при обработке

ADT1-4-2. **(C)** отдельные значения EC50 для разных доноров в сочетании со средним значением и стандартным отклонением.

Фиг. 16. Количественное определение числа живых клеток THP-1 через 24 часа совместного культивирования с γδ Т-клетками в присутствии мкАт к Vδ1 или контролей. (A) Анализ уничтожения клеток THP-1 для клонов ADT1-4. **(B)** Анализ уничтожения клеток THP-1 для клонов ADT1-7. **(C)** Средние значения EC50 в анализе уничтожения THP-1 для клонов ADT1-4 и ADT1-7. **(D)** Таблица, в которой обобщены EC50, представленные на графике (C).

Фиг. 17. Моноклональные антитела к Vδ1 на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

Фиг. 18. Моноклональные антитела к Vδ1 на комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

Фиг. 19. Сохранение здоровых клеток для клона ADT1-4-2.

Фиг. 20. Влияние антител к Vδ1 на популяции TIL из биоптатов первичной опухоли. (A, B) Показан % снижения экспрессии TCR Vδ1 на всех инфильтрирующих опухоль γδ Т-клетках после 48 (A) или 72 (B) часов стимуляции мкАт у двух отдельных доноров, что подтверждает взаимодействие с мишенью в каждом случае. **(C)** Показана повышенная экспрессия как CD25, так и Ki67 на Vδ1+ Т-клетках после 48-часовой стимуляции с помощью ADT1-4-2 по сравнению со стимуляцией изотипическим контролем IgG1 или ADT1-4. **(D)** Показано существенное кратное увеличение продукции IFN-γ с помощью TIL, стимулированных ADT1-4-2 или ADT1-7-3, в течение 72 часов в присутствии 50 нг/мл IL-15.**(E)** Показано, что стимуляция TIL с помощью ADT-1-4-2 или ADT1-7-3 не усиливала секрецию связанных с типом 17 цитокинов IL-6 или IL-17 в этот момент времени. **(F, G)** Показан % снижения экспрессии Vδ1 TCR на всех инфильтрирующих опухоль γδ Т-клетках после стимуляции мкАт через 24 (F) или 72 (G) часа у двух отдельных доноров, что подтверждает взаимодействие с мишенью в TIL, выделенных ферментативным расщеплением. **(H)** Показана дозозависимая повышенная экспрессия Ki67 на γδ Т-клетках после 72-часовой стимуляции с помощью ADT1-4-2. **(I, J)** Показано кратное увеличение IFN-γ, продуцируемого TIL, выделенными от двух отдельных доноров путем ферментативного расщепления и стимулированными ADT1-4-2 в концентрации 6,66 нМ в присутствии 2 нг/мл IL-15 в 24 (I) или 72 (J) часа. Во всех случаях концентрация контрольного анти-RSV и исходного ADT1-4 соответствует самой высокой концентрации, использованной в исследовании (т.е. концентрация 6,66 нМ для A, C, F, G, H, I, J и концентрация 66,6 нМ для B и E).

Фиг. 21. Влияние антител к Vδ1 на популяции TIL из биоптатов первичной опухоли. (A) Показана повышенная экспрессия CD25 и Ki67 в γδ Т-клетках, стимулированных в течение 10 дней с помощью ADT1-4-2. **(B)** Показано значительное увеличение перфорин$^+$ гранзим B$^+$ γδ Т-клеток после 10-дневной стимуляции с помощью ADT1-4-2. **(C)** Показана значительно повышенная экспрессия гранзима B и перфорина как CD8$^+$, так и CD8$^-$ αβ Т-клетками после 10-дневной стимуляции инфильтрирующих опухоль

Vδ1$^+$ Т-клеток с помощью ADT1-4-2. **(D)** Показано заметное увеличение продукции IFN-γ и умеренное увеличение продукции IL-17 и IL-6 TIL, полученными из опухоли легкого, после стимуляции ADT1-4-2. **I** Показано увеличенная продукция хемокинов CCL2, CCL4 и CXCL10 с помощью TIL после 10-дневной стимуляции с помощью ADT1-4-2. Во всех случаях контрольный анти-RSV и исходный ADT1-4 соответствовали той же концентрации, что и ADT1-4-2 с созревшей аффинностью.

Фиг. 22: Последовательности клонов линии ADT1-4 (легкие цепи)

Фиг. 23: Последовательности клонов линии ADT1-4 (тяжелые цепи).

Фиг. 24: Последовательности клонов линии ADT1-7 (легкие цепи).

Фиг. 25: Последовательности клонов линии ADT1-7 (тяжелые цепи)

Фиг. 26: Биспецифические антитела к Vδ1/EGFR демонстрируют высокую аффинность связывания с EGFR человека и аффинность связывания Vδ1 человека с исходными мкАт. (A, B) Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили с биспецифическими вариантами к Vδ1/EGFR для оценки связывания с человеческим Vδ1 **(A)** и антигеном EGFR человека **(B)**. Для целей сравнения были включены исходные мкАт, цетуксимаб и мкАт отрицательного контроля.

Фиг. 27: Биспецифическое антитело к Vδ1/EGFR связывается с целевыми клетками EGFR$^+$ A431 и Vδ1 γδ Т-клетками (A) Экспрессия EGFR и Vδ1 на поверхности клеток из линии клеток A431 и первичных Vδ1 γδТ-клетках. **(B)** Уровень связывания биспецифических антител к Vδ1/EGFR с линией клеток A431 или первичными Vδ1 γδ Т-клетками. Целевые клетки окрашивали различными концентрациями антитела, а затем флуоресцентным антителом для обнаружения IgG человека. Все стадии инкубации выполняли при 4°C, и связывание мкАт определяли с помощью проточной цитометрии для измерения медианного уровня флуоресценции. Логарифмические четырехпараметрические кривые доза-ответ были построены с использованием GraphPad Prism 9.

Фиг. 28: Биспецифические антитела к Vδ1/EGFR индуцируют активацию и дегрануляцию EGFR-специфических Т-клеток, что приводит к повышению опосредованной γδ Т-клетками цитотоксичности целевых клеток A431. (A) Экспрессия γδTCR на клеточной поверхности первичных Vδ1 γδ Т-клеток после культивирования с биспецифическими антителами в течение 24 часов в присутствии или в отсутствие клеток A431. **(B, C)** Количество жизнеспособных клеток A431 (B) и статус активации первичных Vδ1 γδ-Т-клеток после совместного культивирования в соотношении 1:1 с различными концентрациями антител в течение 24 часов. Жизнеспособность измеряли с помощью витального красителя и статуса активации с использованием антитела к CD25. **(D)** Дегрануляция первичных Vδ1 γδ-Т-клеток после совместного культивирования с клетками A431 в соотношении 1:1 вместе с различными концентрациями антител в течение четырех часов. Дегрануляцию определяли путем добавления конъюгированного с флуорофором антитела к CD107α непосредственно в смесь клеток и антител в начале совместного культивирования. **(E)** (A-E) Во всех случаях флуоресценцию определяли с помощью проточной цитометрии для измерения медианного уровня флуоресценции.

Логарифмические четырехпараметрические кривые доза-ответ были построены с использованием GraphPad Prism 9. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение для двух биологических повторов

Фиг. 29: Дополнительные доказательства отсутствия истощения и снижения уровня CD3 как в кровяных, так и в опухолевых Vδ1 Т-клетках. . **(A)** показано MFI vδ1 TCR при стимуляции антителами как показатель взаимодействия с мишенью мкАт на Vδ1 Т-клеток, полученных из крови.**(B)** показана MFI экспрессии CD3 на положительно гейтированных vδ1 клетках, полученных из крови. Стимуляция антителом к vδ1 приводила к взаимодействию с vδ1 клетками и снижению количества как vδ1, так и CD3 на vδ1 клетках.

Фиг. 30: Репортерный биологический анализ ADCC не демонстрирует ADCC в результате воздействия антител к vδ1. Целевые клетки, т.е. γδ инкубировали с эффекторными клетками для биоанализа ADCC в присутствии антител к vδ1, LAGA антител к vδ1 (нефункциональный Fc) и изотипического контроля к RSV. Сигнал люминесценции регистрировали в относительных световых единицах (RLU) и рассчитывали кратность индукции, как описано в способах. N=2 γδ донора (выполнено в технических повторностях) для «антитела к vδ1», «LAGA антитела к vδ1», «RSV», «OKT3». N=1 линии клеток Raji для условия «ритуксимаб+Raji» (в технических повторностях) и n=1 γδ доноры для условий «антитело к vδ1+эффектор» и «LAGA антитело к vδ1+эффектор» (выполнено в технических повторностях и в одну повторность, соответственно). Соотношение эффектор:мишень 3:1.

Фиг. 31. Полиспецифические антитела усиливали цитотоксичность, опосредованную эффекторными Vδ1+ клетками. Нацеливание на антиген, ассоциированный с заболеванием соединительной ткани: **(A-D)** Пример совместного культивирования эффекторных Vδ1+ клеток с раковыми клетками A-431 +/- полиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты к Vδ1 x TAA (EGFR), где связывающий домен VL+VH к Vδ1 (к первой мишени) спаривается с доменом CH1-CH2-CH3 связывающего фрагмента к EGFR (со второй мишенью). **(E-H)** Пример совместного культивирования эффекторных Vδ1+ клеток с раковыми клетками A-431 +/- полиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты к Vδ1 x TAA (EGFR), где связывающий домен к Vδ1 (к первой мишени) содержит полноразмерное антитело (VH-CH1-CH2-CH3/VL-CL), затем объединенное со связывающим фрагментом scFv, полученным из цетуксимаба, к EGFR (ко второй мишени).

Фиг. 32. Последовательности EGFR-связывающих доменов (CH1-CH2-CH3 IgG1), которые демонстрируют выравнивание последовательностей и изменения в CH3 IgG1 (нумерация EU).

Фиг. 33. Таблица, демонстрирующая нумерацию остатков CH3 с перекрестными ссылками. Таблица адаптирована с сайта IMGT.org. Положения модифицированных аминокислот согласно нумерации IMGT (стандарт), IMGT (экзон), EU и Kabat, упомянутой в других местах данного документа, выделены штриховкой. Обратите внимание, что также указана необходимая, но нетрадиционная номенклатура положений

для описания дополнительной аминокислотной вставки, обнаруженной в одном примере EGFR-связывающей конструкции - см. ниже положения 21.1 (колонка экзонов IMGT) / 361.1 (колонка EU) / 384.1 (колонка Kabat) / 17.1 (стандартная колонка IMGT).

Фиг. 34. Оценка технологичности/стабильности полиспецифических антител к Vδ1xEGFR: исследования экспрессии и аналитические исследования на шести молекулах. (A) Выход для CHO. **(B)** Стабильность в условиях «ускоренного старения». **(C)** Склонность к агрегации. **(D)** Профиль распада в условиях «ускоренного старения» (анализ в невосстанавливающих условиях). **(E)** Профиль распада в условиях «ускоренного старения» (анализ в восстанавливающих условиях). **(F)** Общее резюме/ Выводы

Фиг. 35. Расширенное исследование полиспецифических антител к VD1xEGFR и различных эффектов, получаемых при повышении/понижении аффинности на VD1-связывающем плече. (A) Сводная информация об аффинности. **(B) (C)** Влияние на полиспецифическое связывание с присущими тканям Vδ1+ клетками. **(D)(E)** Влияние на интернализацию Vδ1 TCR присущих тканям Vδ1+ клеток. **(F)(G)** Влияние на дегрануляцию присущих тканям Vδ1+ клеток. **(H)(I)** Влияние на цитолитическую функцию полиспецифических антител в отношении EGFR+ раковых клеток. **(J)(K)** Влияние на пролиферацию присущих ткани Vδ1+ клеток. **(L)** Общее резюме этого исследования. **(M)** Влияние количества копий TAA.

Фиг. 36: Расширенное исследование полиспецифических антител к VD1xEGFR и различных эффектов, получаемых при повышении/понижении аффинности EGFR-связывающем плече. (A) Сводные данные по аффинности. **(B)(C)** Влияние на полиспецифическое связывание с EGFR+ линией клеток рака толстой кишки HT-29. **(D)(E)** Влияние на снижение уровня Vδ1 TCR присущих ткани Vδ1+ клеток. **(F)(G)** Влияние на дегрануляцию присущих ткани Vδ1+ клеток. **(H)(I)** Влияние на статус активации 41BB присущих ткани Vδ1+ клеток. **(J)(K)** Влияние на цитолитическую функцию полиспецифических антител в отношении EGFR+ раковых клеток. **(L)(M)** Влияние на пролиферацию присущих ткани Vδ1+ клеток. **(N)** Аффинность к EGFR и влияние количества копий TAA раковых клеток.

Фиг. 37. влияние аффинности на преимущественное связывание с Vδ1 клетками по сравнению с EGFR клетками. Влияние аффинности на преимущественное связывание с Vδ1 клетками по сравнению с EGFR клетками в виде гистограммы **(A),** таблицы **(B)** и соотношения **(C).**

Фиг. 38. влияние аффинности к EGFR на интернализацию полиспецифических антител опухолевыми клетками A431. (A)(B) Аффинность к EGFR; влияние на интернализацию полиспецифических антител опухолевыми клетками A431. **(C)(D)** Влияние на клиренс полиспецифических молекул опухолевыми клетками A431.

Фиг. 39. Влияние аффинности к EGFR на ингибирование полиспецифическими антителами связывания лиганда EGF и пролиферацию опухолевых клеток. (A)(B) Влияние аффинности к EGFR на ингибирование полиспецифическими антителами связывания лиганда EGF и пролиферацию опухолевых клеток. **(C)(D)** Влияние аффинности

к EGFR на ингибирование полиспецифическими молекулами пролиферации EGFR+ опухолевых клеток.

Фиг. 40. Полиспецифические антитела к VD1xEGFR: сохранение здоровых EGFR+ клеток. (A)(C) Представлены результаты подбора дозы. **(B)** Репрезентативные полученные при помощи микроскопа изображения из эксперимента, описанного в (A).

Фиг. 41. Полиспецифические антитела к VD1xEGFR: сравнение ADT1-4-2xFS1-67 с «исходным» ADT1-4xFS1-67 с более низкой аффинностью (условное название G04 FS1-67). (A) Снижение уровня TCR - сравнение зависимостей доза-ответ для ADT1-4-2xFS1-67 и ADT1-4xFS1-67. **(B)** Сравнение снижения уровней TCR - сводка результатов.

Фиг. 42. Полиспецифические антитела к VD1xEGFR: сравнение с полиспецифическим антителом к CD3xEGFR. (A)(B)(C) Влияние Т-клеточного рецептора-мишени на снижение уровня Vδ1 TCR и CD3ε. (D)(E) Влияние на цитолитическую функцию полиспецифических антител в отношении EGFR+ раковых клеток**. (F)(G)** Влияние на индуцированную секрецию цитокинов активированными Т-клетками. **(H)(I)** Влияние на пролиферацию присущих ткани Vδ1+ клеток.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, их фрагментам и вариантам, которые специфически связываются с Т-клеточным рецептором гамма-дельта Т-клеток и специфически связываются с EGFR.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к высокоаффинным антителам, которые содержат множество антигенсвязывающих сайтов, включая антигенсвязывающий сайт для вариабельного домена дельта-цепи 1 TCR (Vδ1) и антигенсвязывающий сайт для EGFR («полиспецифические антитела»).

Полиспецифические антитела по настоящему изобретению имеют формат мкАт^2 и содержат область Fc, которая была сконструирована так, чтобы содержать антигенсвязывающие петли в своем домене CH3 - эта модифицированная область Fc называется «Fcab». Антитело мкАт^2 дополнительно содержит область Fab, содержащую пару доменов VH-VL, обеспечивающую антигенсвязывающий сайт. Молекулы мкАт^2 по настоящему изобретению содержат EGFR-связывающий Fcab и vδ1-связывающий Fab.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к получению и характеристике оптимизированных полиспецифических антител, например, антител, полученных в соответствии с оптимизированной процедурой селекции, начиная с исходных антител к Vδ1, таких как исходные антитела, обозначенные в данном документе как G04, E07, C08, B07, C05, E04, F07, G06, G09, B09, G10 и E01. Настоящее изобретение относится, в частности, к оптимизированным полиспецифическим антителам, полученным из G04 и E07.

Определения

Если не указано иное, все употребляемые в настоящем документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. В контексте настоящего документа, следующие термины имеют значения, присвоенные им ниже.

Гамма-дельта (γδ) Т-клетки представляют собой небольшое подмножество Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отдельный определяющий Т-клеточный рецептор (TCR). Этот TCR состоит из одной гамма (γ) и одной дельта (δ) цепи. Каждая цепь содержит вариабельную (V) область, константную (C) область, трансмембранную область и цитоплазматический хвост. V-область содержит антигенсвязывающий сайт. Существует два основных подтипа γδ Т-клеток человека: один, который доминирует в периферической крови, и второй, который доминирует в негематопоэтических тканях. Эти два подтипа могут определяться по типу δ и/или γ, присутствующих на клетках. Например, γδ Т-клетки, которые преобладают в периферической крови, в первую очередь экспрессируют вариабельный домен дельта-цепи 2 (Vδ2). γδ Т-клетки, которые преобладают в негематопоэтических тканях (*m.e.* являются присущими тканям), в первую очередь экспрессируют вариабельный домен дельта-цепи 1. Ссылки на «**Vδ1 Т-клетки**» или « **Vδ1+Т-клетки**» относятся к γδ Т-клеткам с Vδ1-цепью, *m.e.* $V\delta1^+$ клеткам.

Ссылки на «вариабельный домен **дельта-цепи 1**» также могут обозначаться как Vδ1 или Vd1, в то время как нуклеотидная последовательность, кодирующая цепь TCR, содержащую эту область, или белковый комплекс TCR, содержащий эту область, может обозначаться как «TRDV1». Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с Vδ1-цепью γδ TCR, а также взаимодействуют с EGFR, являются эффективными антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, которые связываются с Vδ1, и могут называться «антителами к вариабельному домену дельта-цепи 1 TCR или их антигенсвязывающими фрагментами» или «антителами к Vδ1 или их антигенсвязывающими фрагментами», или «антителами к TRDV1 или их антигенсвязывающими фрагментами», или «антителами к Vδ1xEGFR или их антигенсвязывающими фрагментами».

В данном документе сделаны дополнительные ссылки на другие дельта-цепи, такие как «**вариабельный домен дельта-цепи 2**». Они могут быть обозначены аналогичным образом. Например, вариабельные домены дельта-цепей 2 могут обозначаться как Vδ2, тогда как нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область, или белковый комплекс TCR, содержащий эту область, может обозначаться как «TRDV2». В предпочтительных вариантах осуществления полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с Vδ1-цепью γδ TCR, не взаимодействуют с другими дельта-цепями, такими как Vδ2. В изобретении антитела специфичны к TRDV1 и не связываются с TRDV2 (SEQ ID NO: 310) или другими антигенами, присутствующими на гамма-дельта Т-клеточном рецепторе, таком как TRDV3 (SEQ ID NO: 311).

В данном документе также сделаны ссылки на «**вариабельные домены гамма-цепей**». Они могут называться γ-цепями или Vγ, тогда как нуклеотидная последовательность, кодирующая цепь TCR, содержащую эту область, или белковый комплекс TCR, содержащий эту область, может обозначаться как TRGV. Например, TRGV4 относится к цепи Vγ4. В предпочтительном варианте осуществления полиспецифические

антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с Vδ1-цепью γδ TCR, не взаимодействуют с гамма-цепями, такими как Vγ4 (например, SEQ ID NO: 309). Антитела также не связываются и не взаимодействуют с другими доменами, присутствующими в γδ TCR, такими как TRDJ, TRDC, TRGJ или TRGC

Термин «**комплекс Т-клеточного рецептора**» представляет собой комплекс белков, включающий «Т-клеточный рецептор» (или «TCR»), обнаруженный на поверхности Т-клеток, ответственный за распознавание множества антигенов. Комплекс Т-клеточного рецептора включает либо альфа- и бета-цепи Т-клеточного рецептора, либо, в случае гамма-дельта Т-клеток, гамма- и дельта-цепи Т-клеточного рецептора и до 6 дополнительных цепей или более, таких как CD3δ, CD3γ, CD3ε и CD3ζ, хотя точный состав комплексов Т-клеточных рецепторов может варьироваться. Комплекс Т-клеточного рецептора опосредует внутриклеточный сигналинг в Т-клетке, что может привести к активации Т-клетки.

Термин «**антитело**» включает любую белковую конструкцию антитела, содержащую по меньшей мере один вариабельный домен антитела, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт (antigen binding site - ABS). Антитела включают, помимо прочего, иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также все их подтипы). Общая структура иммуноглобулинов G (IgG), собранных из двух идентичных полипептидов тяжелой (H) цепи и двух идентичных полипептидов легкой (L) цепи, хорошо известна и является высококонсервативной у млекопитающих (Padlan (1994) *Mol. Immunol.* 31:169-217).

Обычное антитело или иммуноглобулин (Ig) представляет собой белок, содержащий четыре полипептидные цепи: две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи. Каждая цепь разделена на константную область и вариабельный домен. Вариабельные домены тяжелой (H) цепи в настоящем документе сокращенно обозначаются как VH, а вариабельные домены легкой (L) цепи в настоящем документе сокращенно обозначаются как VL. Эти домены, родственные им домены и домены, полученные из них, могут обозначаться в настоящем документе как вариабельные домены цепей иммуноглобулина. Домены VH и VL (также называемые области VH и VL) могут быть дополнительно поделены на области, называемые «определяющими комплементарность областями» («CDR»), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми «каркасными областями» («FR»). Каркасные и определяющие комплементарность области были точно определены (Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, *Fifth Edition U.S. Department of Health and Human Services*, (1991) NIH Publication Number 91-3242). Существуют также альтернативные правила нумерации последовательностей CDR, например те, которые изложены в Chothia *et al.* (1989) Nature 342: 877-883 или кратко изложены на IMGT.org. В обычном антителе каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Тетрамер обычного антитела из двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина образуется тяжелой и легкой цепями иммуноглобулина, связанными

между собой, *например,* дисульфидными связями, и тяжелыми цепями, связанными аналогичным образом. Таким образом, полное антитело содержит два Fab, причем каждое Fab содержит пару доменов VH-VL. Константная область тяжелой цепи включает в себя три домена CH1, CH2 и CH3. Константная область легкой цепи состоит из одного домена - CL. Вариабельный домен тяжелых цепей и вариабельный домен легких цепей представляют собой связывающие домены, которые взаимодействуют с антигеном. Константные области антител обычно опосредуют связывание антитела с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (*например*, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

«**Нумерация EU**» относится к соглашению о нумерации, используемому для нумерации аминокислотных остатков в антителах. Каждому остатку антитела присвоен номер, позволяющий сравнивать антитела. Если вариант антитела содержит остаток, которого не было в антителе дикого типа (например, мутация по типу инсерции), для обозначения вставки используются десятичные дроби. Например, если остаток был вставлен между остатками, обозначенными номерами 361 и 362, новому остатку будет присвоен номер EU 361.1. Нумерация EU является альтернативной схемой нумерации по сравнению с другими схемами нумерации, такими как Kabat, (Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, *Fifth Edition U.S. Department of Health and Human Services*, (1991) NIH Publication Number 91-3242). Chothia (Chothia *et al.* (1989) Nature 342: 877-883) или кратко изложены на IMGT.org. где нумерация EU представлена с дополнительной перекрестной ссылкой на Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969). (10.1073/pnas.63.1.78). На Фиг. 33 показано соответствие между нумерацией EU, нумерацией IMGT и нумерацией Kabat для остатков домена CH3. На Фиг. 32 показано, как остатки полиспецифических антител по изобретению пронумерованы в соответствии со схемой нумерации EU.

В контексте данного документа термин «**область Fab**» относится к части антитела (или конструкции, которая содержит указанную часть), содержащей пару доменов VH-VL, обеспечивающую антигенсвязывающий сайт (также известный как антигенсвязывающий сайт на основе CDR). Область Fab может дополнительно содержать домены CL и CH1. Таким образом, обычное антитело с двумя тяжелыми и двумя легкими цепями содержит два Fab, причем каждое Fab содержит пару доменов VH-VL.

В контексте данного документа «**область Fc**» (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина) относится к части антитела (или конструкции, которая содержит указанную часть), содержащей домены CH2 и CH3. Область Fc представляет собой C-концевую область тяжелой цепи иммуноглобулина, включая области Fc последовательности дикого типа и модифицированные области Fc. Область Fc является димерной и, таким образом, содержит парные константные области тяжелой цепи, каждая из которых содержит домены CH2 и CH3.

«Фрагмент» антитела (который также может называться «антительный фрагмент», «фрагмент иммуноглобулина», «антигенсвязывающий фрагмент» или

«антигенсвязывающий полипептид») в контексте данного документа относится к части антитела (или конструкции, которая содержит указанную часть), которая специфически связывается с первой мишенью, вариабельным доменом дельта-цепью 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора, или второй мишенью, EGFR, (*например*, молекула, в которой одна или большее количество цепей иммуноглобулина не являются полноразмерными, однако которая специфически связывается с мишенью). Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «фрагмент антитела», включают в себя:

(i) Fab-фрагмент (одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1);

(ii) F(ab')2-фрагмент (двухвалентный фрагмент, состоящий из двух Fab-фрагментов, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области);

(iii) Fd-фрагмент (состоящий из доменов VH и CH1);

(iv) Fv-фрагмент (состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела);

(v) одноцепочечный вариабельный фрагмент scFv (состоящий из доменов VL и VH, соединенных с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть в виде единой белковой цепи, в которой пары областей VL и VH образуют одновалентные молекулы);

(vi) VH (вариабельный домен цепи иммуноглобулина, состоящий из домена VH);

(vii) VL (вариабельный домен цепи иммуноглобулина, состоящий из домена VL);

(viii) однодоменное антитело (dAb, состоящее из домена VH или VL);

(ix) минитело (состоящее из пары фрагментов scFv, которые соединены посредством доменов CH3); и

(x) диатело (состоящее из нековалентного димера фрагментов scFv, которые состоят из домена VH одного антитела, соединенного посредством небольшого пептидного линкера с доменом VL другого антитела).

(xi) фрагмент Fc (состоящий из доменов CH2 и CH3)

(xii) фрагмент Fcab (состоящий из фрагмента Fc, который был сконструирован так, чтобы содержать антигенсвязывающие петли в своем домене CH3)

(xiii) антигенсвязывающий домен CH3 Fcab.

Термин «**антитело человека**» относится к антителам, которые имеют вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Субъекты-люди, которым вводят указанные антитела человека, не генерируют межвидовые гуморальные ответы (например, называемых HAMA-ответами - человеческое антимышиное антитело (HAMA)) на первичные аминокислоты, содержащиеся в указанных антителах. Указанные антитела человека могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом или соматической мутацией), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако этот термин не предназначен для охвата антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида

млекопитающих, такого как мышь, были привиты к человеческим каркасным последовательностям. Антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, например, антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной библиотеки комбинаторных антител человека, антитела, выделенные из животного (*например,* мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека, или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК, также могут называться «рекомбинантными антителами человека».

Замена по меньшей мере одного аминокислотного остатка в каркасной области вариабельного домена иммуноглобулина нечеловеческого происхождения соответствующим остатком вариабельного домена человека называется «**гуманизацией**». Гуманизация вариабельного домена может снизить иммуногенность у людей.

«**Специфичность**» относится к числу разных типов антигенов или антигенных детерминант, с которыми может связываться определенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Специфичность антитела - это способность антитела распознавать конкретный антиген как уникальный молекулярный объект и отличать его от других. Антитело, которое «специфически связывается» с антигеном или эпитопом (или является «специфичным» в отношении антигена или эпитопа), представляет собой термин, хорошо понятный в данной области техники . Считается, что молекула демонстрирует «специфическое связывание», если она реагирует чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным целевым антигеном или эпитопом, чем с альтернативными мишенями. Антитело «специфически связывается» с целевым антигеном или эпитопом, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами.

Антитела по настоящему изобретению представляют собой полиспецифические антитела. «**Полиспецифическое антитело**» представляет собой антитело, способное одновременно или последовательно связывать множество различных эпитопов. Как правило, эпитопы не будут находиться на одном и том же антигене. Следовательно, полиспецифическое антитело обладает способностью селективно связываться с эпитопами, присутствующими на разных антигенах, посредством множества различных связывающих доменов. Это контрастирует с обычными моноспецифическими антителами, которые не обладают такой способностью. Скорее, «**моноспецифическое антитело**» имеет связывание, специфичное только для одного антигена, хотя они могут иметь несколько сайтов связывания для этого одного антигена (например, валентность полного человеческого антитела IgG равна 2, а валентность других антител может быть выше, но если антитело распознает только один антиген, оно все равно классифицируется как моноспецифическое антитело). Следовательно, полиспецифические антитела по

изобретению связывают несколько различных антигенов одновременно и/или последовательно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой биспецифические антитела. «**Биспецифическое антитело**» представляет собой антитело, способное одновременно и/или последовательно связывать два разных эпитопа. Как правило, эпитопы не будут находиться на одном и том же антигене. Следовательно, биспецифические антитела обладают способностью селективно связываться с двумя разными эпитопами, присутствующими на двух разных антигенах, через два разных связывающих домена. Это контрастирует с обычными моноспецифическими антителами, которые не обладают такой способностью. Следовательно, биспецифические антитела по изобретению связывают два разных антигена одновременно и/или последовательно.

В контексте данного документа «антитело **мкАт^2**» или «**антитело мкАт с двумя связывающими доменами**» относится к формату биспецифических антител, согласно которому биспецифические антитела содержат область Fc, которая была сконструирована так, чтобы содержать антигенсвязывающие петли в своем домене CH3. Эта модифицированная область Fc называется «**Fcab**». Антитело мкАт^2 дополнительно содержит область Fab, содержащую пару доменов VH-VL, обеспечивающую антигенсвязывающий сайт.

Домен CH3 человеческого IgG1 начинается с номера остатка 341 и заканчивается остатком с номером 447 (нумерация EU). Остаток номер 447 (нумерация EU) иногда отщепляется во время производства, поэтому он не всегда появляется в конечной молекуле. Домен CH3 человеческого IgG1 (SEQ ID NO:563) состоит из двух β-листов, образованных тремя и четырьмя β-цепями, соответственно. Три структурные петли соединяют эти β-цепи на С-конце домена CH3. В антителах по настоящему изобретению эти петли были модифицированы с образованием EGFR-связывающего сайта. Остатки с 355 по 362 были определены как петля, соединяющая цепи A и B домена CH3, - «**петля AB**», остатки с 383 по 391 были определены как петля, соединяющая цепи C и D домена CH3, - «**петля CD**», а остатки с 413 по 422 были определены как петля, соединяющая цепи E и F домена CH3, - «**петля EF**». Используется нумерация EU (см. Фиг. 32).

«**Аффинность**», представленная равновесной константой для диссоциации антигена с антигенсвязывающим полипептидом (KD), является мерой силы связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента): чем ниже значение KD, тем сильнее сила связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим полипептидом. В альтернативном варианте аффинность также может быть выражена как константа аффинности (KA), которая составляет 1/KD. Аффинность может быть определена известными способами в зависимости от конкретного антигена, представляющего интерес. Например, KD может быть определена с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Считается, что любое значение KD менее 10^{-6} указывает на связывание. Специфическое связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном

или антигенной детерминантой может определяться любым пригодным способом, включая, например, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания, такие как радиоиммуноанализы (RIA), иммуноферментные анализы (EIA) и конкурентные сэндвич-анализы, равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (например, с помощью флуоресцентного анализа) и их различные варианты, известные в данной области техники.

«**Авидность**» является мерой силы связывания между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и соответствующим антигеном. Авидность связана как с аффинностью между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом на антителе, так и числом соответствующих сайтов связывания, присутствующих на антителе.

«***In situ***» означает в естественном или первоначальном месте, вместо того, чтобы быть перемещенным в другое место. Например, Vδ1+ клетка *in situ* у пациента относится к vδ1 клетке *in vivo*, в отличие от клетки *in vitro* или *ex vivo*.

«**Vδ1+ клетки тканей человека**», и «**гемопоэтические и кровяные Vδ1+ клетки**», и «**Vδ1+ инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL)**» определены как Vδ1+ клетки, содержащиеся или полученные из тканей человека, или гемопоэтической и кровеносной систем, или опухолей человека, соответственно. Все указанные типы клеток могут быть идентифицированы по их (i) местоположению или месту, откуда они были получены, и (ii) их экспрессии Vδ1+ TCR.

«**Модулирующие антитела**» представляют собой антитела, которые вызывают измеримое изменение, включая, помимо прочего, измеримое изменение клеточного цикла, и/или количества клеток, и/или жизнеспособности клеток, и/или одного или большего количества маркеров клеточной поверхности, и /или секреции одной или большего количества секреторных молекул (например, цитокинов, хемокинов, лейкотриенов и т.д.) и/или функции (такой как цитотоксичность по отношению к целевой клетке или пораженной клетке) при контакта или связывания с клеткой, экспрессирующей мишень, с которой связывается указанное антитело. Способ «модулирования» клетки или их популяции относится к способу, в котором по меньшей мере одно измеримое изменение в указанной клетке или клетках или их секреции инициируется для образования одной или большего количества «модулированных клеток».

«**Иммунный ответ**» представляет собой измеримое изменение по меньшей мере одной клетки, или одного типа клеток, или одного эндокринного пути, или одного экзокринного пути иммунной системы (включая, помимо прочего, клеточно-опосредованный ответ, гуморальный ответ, цитокиновый ответ, хемокиновый ответ) при добавлении модулирующего антитела.

«**Иммунная клетка**» определяется как клетка иммунной системы, включая, помимо прочего, клетки CD34+, В-клетки, CD45+ клетки (общий антиген лимфоцитов), альфа-бета-Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, хелперные Т-клетки, плазматические клетки, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эритроциты, тромбоциты, дендритные клетки, фагоциты, гранулоциты, врожденные лимфоидные клетки, естественные клетки-киллеры

(NK) и гамма-дельта Т-клетки. Как правило, иммунные клетки классифицируют с помощью комбинаторного анализа молекул клеточной поверхности (например, с помощью проточной цитометрии) для идентификации или группировки или кластеризации с целью дифференциации иммунных клеток на субпопуляции. Затем клетки могут быть дополнительно подразделены с помощью соответствующего анализа. Например, CD45+ лимфоциты можно дополнительно подразделить на vδ-положительные популяции и vδ-отрицательные популяции.

«**Модельные системы**» представляют собой биологические модели или биологические имитации, предназначенные для помощи в понимании того, как лекарство, такое как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может функционировать в качестве лекарственного препарата для облегчения признака или симптома заболевания. Такие модели обычно включают использование пораженных клеток, непораженных клеток, здоровых клеток, эффекторных клеток, тканей и т. д. *in vitro*, *ex vivo*, и *in vivo*, и в которых изучают и сравнивают действие указанных лекарственных препаратов.

«**Пораженные клетки**» проявляют фенотип, связанный с прогрессированием заболевания, такого как злокачественное новообразование, инфекция, например, вирусная инфекция, или воспалительное состояние или воспалительное заболевание. Например, пораженная клетка может быть опухолевой клеткой, клеткой аутоиммунной ткани или инфицированной вирусом клеткой. Соответственно, указанные пораженные клетки могут быть определены как опухолевые, инфицированные вирусом или воспалительные.

«**Здоровые клетки**» относятся к нормальным клеткам, которые не являются пораженными. Их также можно назвать «**нормальными**» или «**непораженными**» клетками. Непораженные клетки включают нераковые, неинфицированные или невоспалительные клетки. Указанные клетки часто используют наряду с соответствующими пораженными клетками для определения специфичности пораженных клеток, придаваемой лекарственным средством, и/или для лучшего понимания терапевтического индекса лекарственного средства.

«**Специфичность к пораженным клеткам**» является мерой того, насколько эффективно эффекторная клетка или ее популяция (такая как, например, популяция Vδ1+ клеток) различает и уничтожает пораженные клетки, такие как раковые клетки, сохраняя при этом непораженные или здоровые клетки. Этот потенциал может быть измерен в модельных системах и может включать сравнение склонности эффекторной клетки или популяции эффекторных клеток к избирательному уничтожению или лизису пораженных клеток с потенциалом указанной эффекторной клетки (клеток) к уничтожению или лизису непораженных или здоровых клеток. Указанная специфичность к пораженным клеткам может информировать о потенциальном терапевтическом индексе лекарственного средства.

«**Повышенная специфичность к пораженным клеткам**» описывает фенотип эффекторной клетки, такой как, например, Vδ1+ клетка или ее популяция, которая была модулирована для дальнейшего повышения ее способности специфически уничтожать

пораженные клетки. Это усиление может быть измерено различными способами, включая кратное изменение или процентное увеличение специфичности или селективности уничтожения пораженных клеток.

«**ADCC**» или «**антителозависимая клеточная цитотоксичность**» описывает иммунный ответ на клетки, покрытые антителами, связанными с поверхностными антигенами клетки. Это клеточно-опосредованный процесс, при котором иммунная эффекторная клетка (например, NK-клетка) распознает связанные с клеткой антитела, вызывая дегрануляцию и лизис целевой клетки. Как правило, это опосредовано взаимодействиями Fc-Fcγ. Область Fc связанного с клеткой антитела рекрутирует эффекторные клетки, экспрессирующие Fcγ-рецепторы (например, NK-клеток), что приводит к дегрануляции эффекторных клеток и гибели целевой клетки.

«**Функциональная Fc**» относится к антителу, которое содержит функциональную область Fc (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина), то есть область Fc, которая не стала нефункциональной в результате мутации или иным образом. Антитела с функциональным Fc демонстрируют неаттенуированную функцию Fc. Антитело с функциональным Fc может содержать последовательность тяжелой цепи IGHC человека, как указано IMGT, которая не была модифицирована или создана или сконструирована для уменьшения связывания с одним или более Fc-гамма-рецепторами. Например, посредством мутации шарнира IGHC или путем конструирования антитела, содержащего константные домены тяжелой цепи, которые являются химерными или гибридными для последовательностей IGHC IgG1/IgG2A или IgG1/IgG4.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (*т. е.* полипептид) по изобретению являются выделенными. «**Выделенный**» полипептид представляет собой полипептид, удаленный из первоначального окружения. Термин «выделенный» может использоваться для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (*например*, выделенное антитело, которое специфически связывается с Vδ1, или его фрагмент по существу не содержат антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от Vδ1). Термин «выделенный» также может быть использован для обозначения препаратов, в которых выделенное антитело является достаточно чистым для терапевтического введения, когда оно составлено в виде активного ингредиента фармацевтической композиции, или по меньшей мере на 70-80% (масс./масс.) чистым, более предпочтительно по меньшей мере на 80-90% (масс./масс.) чистым, еще более предпочтительно на 90-95% чистым; и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (масс./масс.) чистым.

Предпочтительно, полинуклеотиды, используемые в настоящем изобретении, являются выделенными. «Выделенный» полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, удаленный из первоначального окружения. Например, встречающийся в природе полинуклеотид является выделенным, если он отделен от некоторых или всех сосуществующих материалов в естественной системе. Полинуклеотид считается

выделенным, если, например, он клонируется в вектор, который не является частью его естественного окружения, или если он содержится внутри кДНК.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой «**функционально активный вариант**», который также включает в себя встречающиеся в природе аллельные варианты, а также мутанты или любые другие не встречающиеся в природе варианты. Как известно в данной области техники, аллельный вариант представляет собой альтернативную форму (поли)пептида, который характеризуется как имеющий замену, делецию или добавление одной или большего количества аминокислот, которые существенным образом не меняют биологическую функцию полипептида. В качестве неограничивающего примера, указанные функционально активные варианты могут при этом функционировать, когда каркасы, содержащие CDR, подвергаются модификации, когда CDR сами по себе подвергаются модификации, когда указанные CDR прививаются к альтернативным каркасам или когда включаются N- или C-концевые удлинения. Более того, содержащие CDR связывающие домены могут быть спарены с различными партнерскими цепями, например, общими с другим антителом. При одинаковых так называемых «общих» легких или «общих» тяжелых цепях указанные связывающие домены при этом могут функционировать. Более того, указанные связывающие домены могут функционировать при мультимеризации. Более того, «антитела или их антигенсвязывающие фрагменты» могут также содержать функциональные варианты, причем VH, или VL, или константные домены были модифицированы в направлении от или к отличной канонической последовательности (например, как указано в IMGT.org) и при этом функционируют.

В целях сравнения двух близкородственных полипептидных последовательностей «**% идентичности последовательности**» между первой полипептидной последовательностью и второй полипептидной последовательностью может быть рассчитан с помощью NCBI BLAST v2.0 со стандартными настройками для полипептидных последовательностей (BLASTP). В целях сравнения двух близкородственных полинуклеотидных последовательностей «% идентичности последовательности» между первой полинуклеотидной последовательностью и второй полинуклеотидной последовательностью может быть рассчитан с помощью NCBI BLAST v2.0 со стандартными настройками для полинуклеотидных последовательностей (BLASTN).

Полипептидные или полинуклеотидные последовательности считаются такими же или «**идентичными**» другим полипептидным или полинуклеотидным последовательностям, если они имеют 100% идентичности последовательности по всей своей длине. Остатки в последовательностях нумеруются слева направо, *т. е.* от N- к C-концу для полипептидов; от 5'- к 3'-концу для полинуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления любой указанный % идентичности последовательности рассчитывается без последовательностей всех 6 CDR антитела. Например, антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 70%,

по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с указанной последовательностью вариабельной области тяжести последовательность области цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющая по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с указанной последовательностью вариабельной области легкой цепи, при этом любые аминокислотные варианты встречаются только в каркасных областях последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. В таких вариантах осуществления антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающие определенной идентичностью последовательностей, сохраняют полные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой и легкой цепей соответствующего антитела к Vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента. В более конкретном примере, хотя он никоим образом не ограничивает и служит только для дополнительной иллюстрации этих вариантов осуществления изобретения, предложено антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 40, где любые аминокислотные вариации встречаются только в каркасных областях последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Таким образом, антитело этого конкретного примера дополнительно содержит VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80 и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95.

Кроме того, полиспецифические антитела, представленные в данном документе, могут содержать последовательность вариабельной области легкой каппа-цепи и сохранять аминокислотный остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT, который не является серином, например, неполярный остаток и/или остаток, отличный от остатка зародышевой линии человека, например, они могут содержать остаток лейцина в этом положении. Например, хотя это никоим образом не ограничивает и служит только для дополнительной иллюстрации этих вариантов осуществления изобретения, предложено антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH, содержащую или

состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая по имеет меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 40, при этом любые аминокислотные вариации встречаются только в каркасных областях последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, и при этом антитело содержит последовательность вариабельной области легкой каппа-цепи, содержащую аминокислотный остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT, который не относится к остатку зародышевой линии человека и/или является неполярным (например, остаток лейцина в этом положении). Таким образом, антитело этого конкретного примера дополнительно содержит VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80 и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95.

«**Различие**» между последовательностями относится к вставке, делеции или замене одного аминокислотного остатка в положении второй последовательности по сравнению с первой последовательностью. Две полипептидные последовательности могут содержать одно, два или большее количество таких аминокислотных различий. Вставки, делеции или замены во второй последовательности, которая в остальном идентична (100% идентичности последовательности) первой последовательности, приводит к снижению % идентичности последовательностей. Например, если идентичные последовательности состоят из 9 аминокислотных остатков, одна замена во второй последовательности приводит к идентичности последовательностей, составляющей 88,9%. Если первая и вторая полипептидные последовательности состоят из 9 аминокислотных остатков и имеют 6 одинаковых остатков, первая и вторая полипептидные последовательности имеют более чем 66% идентичности (первая и вторая полипептидные последовательности имеют 66,7% идентичности).

В альтернативном варианте, для целей сравнения первой эталонной полипептидной последовательности со второй сравниваемой полипептидной последовательностью может быть установлено количество добавлений, замен и/или делеций, осуществленных в первой последовательности для получения второй последовательности. «**Добавление**» представляет собой добавление одного аминокислотного остатка в последовательность первого полипептида (включая добавление на любом конце первого полипептида). «**Замена**» представляет собой замену одного аминокислотного остатка в последовательности первого полипептида на один другой аминокислотный остаток. Указанная замена может быть консервативной или неконсервативной. «**Делеция**» представляет собой делецию одного аминокислотного остатка из последовательности

первого полипептида (включая делецию на любом конце первого полипептида).

Используя трехбуквенные и однобуквенные коды, встречающиеся в природе аминокислоты могут быть обозначены следующим образом: глицин (G или Gly), аланин (A или Ala), валин (V или Val), лейцин (L или Leu), изолейцин (I или Ile), пролин (P или Pro), фенилаланин (F или Phe), тирозин (Y или Tyr), триптофан (W или Trp), лизин (K или Lys), аргинин (R или Arg), гистидин (H или His), аспарагиновая кислота (D или Asp), глутаминовая кислота (E или Glu), аспарагин (N или Asn), глутамин (Q или Gln), цистеин (C или Cys), метионин (M или Met), серин (S или Ser) и треонин (T или Thr). Когда остаток может представлять собой аспарагиновую кислоту или аспарагин, могут использоваться символы Asx или B. Если остатком может быть любая аминокислота, можно использовать символ Xaa или X. Когда остаток может представлять собой глутаминовую кислоту или глутамин, могут использоваться символы Glx или Z. Ссылки на аспарагиновую кислоту включают в себя аспартат, а на глутаминовую кислоту - глутамат, если в контексте не указано иное.

В контексте данного документа нумерация полипептидных последовательностей и определения CDR и FR соответствуют системе нумерации EU и/или IMGT, как указано в контексте. «**Соответствующий**» аминокислотный остаток между первой и второй полипептидной последовательностью представляет собой аминокислотный остаток в аффинности первой последовательности, который занимает одно и то же положение в соответствии с системой нумерации EU и/или IMGT, как указано в контексте, с аминокислотным остатком во второй последовательности, тогда как аминокислотный остаток во второй последовательности может отличаться по идентичности от первой. Соответственно соответствующие остатки будут иметь один и тот же номер (и букву), если каркас и CDR имеют одинаковую длину в соответствии с определением EU или IMGT. Выравнивание может быть выполнено вручную или с помощью, например, известного компьютерного алгоритма для выравнивания последовательностей, такого как NCBI BLAST v2.0 (BLASTP или BLASTN), используя стандартные настройки.

Ссылки в данном документе на «**эпитоп**» относятся к части мишени, которая специфически связана антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Эпитопы также могут называться «**антигенными детерминантами**». Антитело связывается «**по существу с тем же эпитопом**», что и другое антитело, когда они оба распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. Широко применяемые способы определения того, связываются ли два антитела с идентичными или перекрывающимися эпитопами, представляют собой конкурентные анализы, которые могут быть сконфигурированы в различных форматах (*например*, планшеты с лунками с использованием радиоактивных или ферментных меток или проточная цитометрия на экспрессирующих антигены клетках) с использованием меченного антигена или меченного антитела. Антитело связывается с «**тем же эпитопом**», что и другое антитело, когда они оба распознают идентичные эпитопы (т. е. все точки контакта между антигеном и антителом являются одинаковыми).

Эпитопы, обнаруживаемые на белках-мишенях, могут быть определены как «**линейные эпитопы**» или «**конформационные эпитопы**». Линейные эпитопы образуются непрерывной последовательностью аминокислот в белковом антигене. Конформационные эпитопы образуются из аминокислот, которые являются прерывистыми в последовательности белка, но которые объединяются при сворачивании белка в его трехмерную структуру.

Термин «**вектор**» в контексте данного документа предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «**плазмиду**», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, причем дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации, и эписомные векторы млекопитающего и дрожжевые векторы). Другие векторы (*например*, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после внесения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе «**рекомбинантными векторами экспрессии**» (или просто «**векторами экспрессии**»). В целом, векторы экспрессии, используемые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании «плазмида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако настоящее изобретение предназначено для включения таких других форм векторов экспрессии, таких как вирусные векторы (*например*, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции, а также бактериофагов и фагмидных систем. Термин «**рекомбинантная клетка-хозяин**» (или просто «**клетка-хозяин**») в контексте данного документа предназначен для обозначения клетки, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но и потомства такой клетки, например, когда указанное потомство используют для создания линии клеток или банка клеток, которые затем необязательно хранят, предоставляют, продают, переносят или используют для изготовления антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе.

Ссылки на «**субъекта**», «**пациента**» или «**индивида**» относятся к субъекту, в частности, субъекту-млекопитающему, подлежащему лечению. Субъекты-млекопитающие включают в себя людей, отличных от человека приматов, сельскохозяйственных животных (таких как коровы), спортивных животных или домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления

субъект представляет собой человека. В альтернативных вариантах осуществления субъект представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как мышь.

Термин «**достаточное количество**» означает количество, достаточное для получения желаемого эффекта. Термин «**терапевтически эффективное количество**» означает количество, которое эффективно для облегчения симптома заболевания или нарушения. Терапевтически эффективное количество может представлять собой «**профилактически эффективное количество**», поскольку профилактика может считаться терапией.

«**Уменьшается интенсивность**» заболевания или нарушения, если тяжесть проявления или симптома заболевания или нарушения, частота, с которой субъект испытывает такое проявление или симптом, или и то, и другое уменьшается (по сравнению с более ранним моментом времени, например, перед введением любого антитела).

В контексте данного документа термин «**лечение заболевания или нарушения**» означает снижение частоты и/или степени тяжести по меньшей мере одного проявления или симптома заболевания или нарушения, испытываемого субъектом (по сравнению с более ранним моментом времени, например, до введения любого антитела).

«**Злокачественное новообразование**» в контексте настоящего документа относится к аномальному росту или делению клеток. Как правило, рост и/или срок жизни раковых клеток превышают рост и/или срок жизни нормальных клеток и тканей вокруг них и не согласуются с ними. Раковые заболевания могут быть доброкачественными, предзлокачественными или злокачественными. Злокачественное новообразование возникает в различных клетках и тканях, включая полость рта (например, рот, язык, глотку и т. д.), пищеварительную систему (например, пищевод, желудок, тонкую кишку, толстую кишку, прямую кишку, печень, желчные протоки, желчный пузырь, поджелудочную железу и т. д.), дыхательную систему (например, гортань, легкие, бронхи и т. д.), кости, суставы, кожу (например, базально-клеточная, плоскоклеточная, менингиома и т. д.), молочную железу, половую систему (например, матку, яичник, простату, яичко и т. д.), мочевыделительную систему (например, мочевой пузырь, почку, мочеточник и т. д.), глаза, нервную систему (например, головной мозг и т. д.), эндокринную систему (например, щитовидную железу и т. д.) и систему кроветворения (например, лимфома, миелома, лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфолейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и т. д.).

В контексте данного документа термин «**около**» включает до 10% включительно больше и до 10% включительно меньше указанного значения, предпочтительно до 5% включительно больше и до 5% включительно меньше указанного значения, особенно указанного значения. Термин «между» включает в себя значения в указанных границах.

Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты

В данном документе предложены полиспецифические антитела, способные специфически связываться с вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR), а также способные специфически связываться с EGFR. Данное

изобретение относится к применению указанных антител в качестве лекарственных препаратов для введения субъекту, подлежащему лечению.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, вариабельный домен (*например*, VH или VL), диатело, минитело или моноклональное антитело. В дополнительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv.

Полиспецифические антитела по изобретению могут относиться к любому классу, например, IgG, IgA, IgM, IgE, IgD или их изотипам, и могут содержать легкую цепь каппа или лямбда. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG, например, по меньшей мере один из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В дополнительном варианте осуществления антитело может быть в таком формате, как, например, формат IgG, который был модифицирован для придания желаемых свойств, таких как обеспечение мутации Fc с целью снижения эффекторной функции, увеличения периода полужизни, изменения ADCC или улучшения стабильности шарнира. Такие модификации хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются человеческими. Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены из последовательности иммуноглобулина (Ig) человека. CDR, каркасная область и/или константная область антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть получены из последовательности Ig человека, в частности последовательности IgG человека. CDR, каркасная и/или константная область могут быть по существу идентичными для последовательности Ig человека, в частности, последовательности IgG человека. Преимущество использования человеческих антител заключается в том, что они обладают низкой или нулевой иммуногенностью у людей.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также могут быть химерными, например, химерой антитела мыши/человека.

В альтернативном варианте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают от отличных от человека видов, таких как мышь. Такие антитела нечеловеческого происхождения могут быть модифицированы для повышения их сходства с вариантами антител, естественным образом вырабатываемых у людей, таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть частично или полностью гуманизированными. Таким образом, в одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

Краткое описание специфических областей Fab, представленных в данном документе

Краткое описание некоторых специфических антигенсвязывающих молекул (т.е. антител), используемых в данном изобретении, представлено ниже с обозначением присвоенной SEQ ID NO: в прилагаемом перечне последовательностей. Антигенсвязывающие варианты, их производные и фрагменты также представлены как часть настоящего изобретения. Последовательности представлены в прилагаемом перечне

последовательностей и на прилагаемых фигурах. В случае каких-либо расхождений между последовательностями в перечне последовательностей и последовательностями на фигурах 22-25 преимущественную силу должны иметь последовательности на фигурах.

Таблица 1. Краткое описание областей Fab, полученных из ADT1-4 (тяжелая цепь), и соответствующих SEQ ID NO

Антитело	**VH**	**HFR1**	**VHCDR1**	**HFR2**	**VHCDR2**	**HFR3**	**VHCDR3**	**HFR4**
Исходное ADT1-4	1	170	51	172	53	173	54	174
ADT1-4-105	2	170	51	172	53	173	55	174
ADT1-4-107	3	170	51	172	53	173	56	174
ADT1-4-110	4	170	51	172	53	173	57	174
ADT1-4-112	5	170	51	172	53	173	58	174
ADT1-4-117	6	170	51	172	53	173	59	174
ADT1-4-19	7	170	51	172	53	173	60	174
ADT1-4-21	8	170	**52**	172	53	173	61	174
ADT1-4-31	9	170	51	172	53	173	62	174
ADT1-4-139	10	170	51	172	53	173	63	174
ADT1-4-4	11	170	51	172	53	173	64	174
ADT1-4-143	12	**171**	51	172	53	173	65	174
ADT1-4-53	13	170	**52**	172	53	173	66	174
ADT1-4-173	14	170	51	172	53	173	67	174
ADT1-4-2	15	170	51	172	53	173	68	174
ADT1-4-8	16	170	51	172	53	173	69	174
ADT1-4-82	17	170	51	172	53	173	70	174
ADT1-4-83	18	170	51	172	53	173	71	174
ADT1-4-3	19	170	51	172	53	173	72	174
ADT1-4-84	20	170	51	172	53	173	73	174
ADT1-4-86	21	170	**52**	172	53	173	74	174
ADT1-4-95	22	170	51	172	53	173	75	174
ADT1-4-1	23	170	51	172	53	173	76	174
ADT1-4-6	24	170	51	172	53	173	77	174
ADT1-4-	25	170	51	172	53	173	78	174

138								

Таблица 2. Краткое описание областей Fab, полученных из ADT1-4 (тяжелая цепь), и соответствующих SEQ ID NO

Антитело	**VL**	**LFR1**	**VLCDR1**	**LFR2**	**VLCDR2**	**LFR3**	**VLCDR3**	**LFR4**
Исходное ADT1-4	26	175	79	176	80	178	81	179
ADT1-4-105	27	175	79	176	80	177	82	179
ADT1-4-107	28	175	79	176	80	177	83	179
ADT1-4-110	29	175	79	176	80	177	84	180
ADT1-4-112	30	175	79	176	80	177	85	179
ADT1-4-117	31	175	79	176	80	177	86	179
ADT1-4-19	32	175	79	176	80	177	87	179
ADT1-4-21	33	175	79	176	80	177	88	179
ADT1-4-31	34	175	79	176	80	177	89	179
ADT1-4-139	35	175	79	176	80	177	90	179
ADT1-4-4	36	175	79	176	80	177	91	179
ADT1-4-143	37	175	79	176	80	177	92	181
ADT1-4-53	38	175	79	176	80	177	93	179
ADT1-4-173	39	175	79	176	80	177	94	179
ADT1-4-2	40	175	79	176	80	177	95	179
ADT1-4-8	41	175	79	176	80	177	96	179
ADT1-4-82	42	175	79	176	80	177	97	179
ADT1-4-83	43	175	79	176	80	177	98	179
ADT1-4-3	44	175	79	176	80	177	99	179
ADT1-4-84	45	175	79	176	80	177	100	179
ADT1-4-86	46	175	79	176	80	177	101	179
ADT1-4-95	47	175	79	176	80	177	102	182
ADT1-4-1	48	175	79	176	80	177	103	179
ADT1-4-6	49	175	79	176	80	177	104	179
ADT1-4-138	50	175	79	176	80	**178**	105	179

Таблица 3. Краткое описание областей Fab, полученных из ADT1-7 (тяжелая цепь),

и соответствующих SEQ ID NO

Антитело	VH	HFR1	VHCDR1	HFR2	VHCDR2	HFR3	VHCDR3	HFR4
Исходное ADT1-4	106	189	130	190	131	191	132	192
ADT1-7-10	107	189	130	190	131	191	133	192
ADT1-7-15	108	189	130	190	131	191	134	192
ADT1-7-17	109	189	130	190	131	191	135	192
ADT1-7-18	110	189	130	190	131	191	136	192
ADT1-7-19	111	189	130	190	131	191	137	192
ADT1-7-20	112	189	130	190	131	191	138	192
ADT1-7-22	113	189	130	190	131	191	139	192
ADT1-7-23	114	189	130	190	131	191	140	192
ADT1-7-42	115	189	130	190	131	191	141	192
ADT1-7-3	116	189	130	190	131	191	142	192
ADT1-7-61	117	189	130	190	131	191	143	192

Таблица 4. Краткое описание областей Fab, полученных из ADT1-7 (тяжелая цепь), и соответствующих SEQ ID NO

Антитело	VL	LFR1	VLCDR1	LFR2	VLCDR2	LFR3	VLCDR3	LFR4
Исходное ADT1-7	118	193	144	195	145	196	146	197
ADT1-7-10	119	193	144	195	145	196	147	197
ADT1-7-15	120	193	144	195	145	196	148	197
ADT1-7-17	121	193	144	195	145	196	149	197
ADT1-7-18	122	**194**	144	195	145	196	150	197
ADT1-7-19	123	193	144	195	145	196	151	197
ADT1-7-20	124	193	144	195	145	196	152	197
ADT1-7-22	125	193	144	195	145	196	153	197
ADT1-7-23	126	193	144	195	145	196	154	197
ADT1-7-42	127	193	144	195	145	196	155	197
ADT1-7-3	128	193	144	195	145	196	156	197
ADT1-7-	129	193	144	195	145	196	157	197

61								

Таблица 5. Краткое описание других исходных Fab и соответствующих SEQ ID NO

Исходное антитело	**VH**	**VL**
C08	273	282
B07	274	283
C05	275	284
E04	276	285
F07	277	286
G06	278	287
G09	279	288
B09	280	289
G10	281	290
E01	312	313

Области Fab, полученные из ADT1-4 и ADT1-7

В настоящем изобретении предложены полиспецифические антитела, причем области Fab получены из исходного антитела ADT1-4, (которые имеют последовательность вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 1 и последовательность вариабельной области легкой области в соответствии с SEQ ID NO: 26), и антитела, полученные из исходного антитела ADT1-7, (которые имеют последовательность вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 106 и последовательность вариабельной области легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 118). ADT1-4 также упоминается в данном документе как G04, а ADT1-4 и G04 используются взаимозаменяемо. ADT1-7 также упоминается в данном документе как E07, а ADT1-7 и E07 используются взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полиспецифическим антителам, область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из VHCDR3, включающей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55-78 и 133-143; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82-

105 и 147-157. Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полиспецифическим антителам, область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 51, 52 и 130;

VHCDR2, содержащую или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 53 и 131; и

VHCDR3, содержащую или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 55 до 78 и 133 до 143; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую:

VLCDR1, содержащую или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 79 и 144;

VLCDR2, содержащую или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 80 и 145; и

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей

мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 82-105 и 147-157.

Определенные аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения одного или более вариантов областей Fab, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полиспецифическим антителам, область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-25 и 107-117; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-50 и 119-129.

Области Fab, полученные из ADT1-4

Настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, содержащим области Fab, полученные из исходного антитела ADT1-4 (имеющего последовательность вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 1 и последовательность вариабельной области легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 26), например, как указано ниже. ADT1-4 также упоминается в данном документе как G04, а ADT1-4 и G04 используются взаимозаменяемо.

Антитела, содержащие определенные последовательности CDR, полученные из ADT1-4

Полиспецифические антитела, представленные в данном документе, включают следующие области Fab, имеющие определенные последовательности, полученные из ADT1-4.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, область Fab к вариабельному домену дельта-цепи 1 TCR (анти-Vδ1), содержащая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55-78; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, содержащую или

состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82-105. Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, область Fab к вариабельному домену дельта-цепи 1 TCR (анти-Vδ1), содержащая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55-77; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82-104. Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления предложены полипецифические антитела, область Fab к вариабельному домену дельта-цепи 1 TCR (анти-Vδ1), содержащая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58, 60, 61, 62, 65, 66, 68, 74, 76 и 77; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85, 87, 88, 89, 92, 93, 95, 101, 103 и 104. Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 51 и 52;

VHCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53; и

VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 55 до 78; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую:

VLCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79;

VLCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80; и

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 82 до 105.

Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 51 и 52;

VHCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53; и

VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 55 до 77; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую:

VLCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79;

VLCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80; и

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 82 до 104.

Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 51 и 52;

VHCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53; и

VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 58, 60, 61, 62, 65, 66, 68, 74, 76 и 77; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую:

VLCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79;

VLCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80; и

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 85, 87, 88, 89, 92, 93, 95, 101, 103 и 104.

Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) , содержит

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 55, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 82, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 56, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 83, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 57, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 84, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 58, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 85, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 59, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 86, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 60, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 87, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 52, 53 и 61, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 88, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 62, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 89, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 63, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 90, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 64, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 91, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 65, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 92, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 52, 53 и 66, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 93, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 67, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 94, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 68, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 95, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 69, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 96, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 70, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 97, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 71, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 98, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 72, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 99, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 73, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 100, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 52, 53 и 74, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 101, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 75, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 102, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 76, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 103, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 77, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 104, соответственно; или;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 78, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 105, соответственно.

Полиспецифические антитела могут содержать вариабельную последовательность легкой каппа-цепи (или содержать вариабельную последовательность легкой цепи, полученную из вариабельной последовательности легкой каппа-цепи), где остаток в положении 74 последовательности вариабельной области легкой каппа-цепи в соответствии с системой нумерации IMGT не является серином, например, остатком, отличным от остатка зародышевой линии, и/или является неполярным остатком в положении 74, например, остатком в положении 74 является остатком лейцина.

Дополнительные варианты осуществления представлены ниже.

ADT1-4-105 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-105, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR (анти-Vδ1), содержащая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность,

имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR (анти-Vδ1), содержащая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител с областями Fab, полученными из ADT1-4-105, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR (анти-Vδ1), содержащая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей

мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител с областями Fab, полученными из ADT1-4-105, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-107 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-107, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab,

связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, содержащих области Fab, полученные из ADT1-4-107, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%,

по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, содержащих области Fab, полученные из ADT1-4-107, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-110 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-110, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, содержащих области Fab, полученные из ADT1-4-110, например, предложены

полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, содержащих области Fab, полученные из ADT1-4-110, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть

консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-112 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-112, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 58, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 58 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-112, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены.

Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 58; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 58; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител с областями Fab, полученными из ADT1-4-112, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-117 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-117, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител с областями Fab, полученными из ADT1-4-117, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей

мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител с областями Fab, полученными из ADT1-4-117, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-19 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-19, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%,

по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 87. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 87. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител с областями Fab, полученными из ADT1-4-19, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%,

по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 87.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 87.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител с областями Fab, полученными из ADT1-4-19, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-21 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-21, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%,

по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител с областями Fab, полученными из ADT1-4-21, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%

или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, содержащих области Fab, полученные из ADT1-4-21, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-31 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-31, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 89. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 62 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 89. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-31, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 89.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 89.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-31, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2

аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-139 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-139, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 63, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-139, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по

меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-139, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2

аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-4 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-4, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 91. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 91. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-4, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи,

содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 91.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1)

содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 91.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-4, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с

аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-143 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-143, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-143, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела,

при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-143, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-53 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-53, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR,

(анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-53, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей

мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 93.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 93.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при

этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-53, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-173 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-173, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 67, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-173, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-173, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-2 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-2, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 95. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 95. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-2, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей

мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 95.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 95.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-2, например, предложены

полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-8 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-8, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 96. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%

идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 96. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-8, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%,

по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 96.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 96.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-8, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3,

включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-82 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-82, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 97. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 97. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-82, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 97.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 97.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-82, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3,

включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-83 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-83, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 98. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 98. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-83, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область

легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 98.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей

мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 98.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-83, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-3 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-3, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 99. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 99. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-3, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 99.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2,

имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 99.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-3, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-84 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-84, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по

меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 100. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 100. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-84, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по

меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 100.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 100.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-84, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-86 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-86, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по

меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 101. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 101. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-86, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%,

по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 101.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 101.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-86, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-95 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-95, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой

цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-95, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей

мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-95, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-1 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-1, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 103. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 103. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab,

связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-1, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%,

по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 103.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 103.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-1, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-6 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-6, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 77, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 104. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 77 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 104. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-6, например, предложены

полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 77; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 104.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 77; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 104.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-6, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть

консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-4-138 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-4-138, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 78, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 105. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 78 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 105. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-138, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены.

Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 78; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 105.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 78; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 105.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-4-138, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

Антитела, содержащие вариабельные области тяжелой и/или легкой цепи, полученные из ADT1-4

В данном документе предложены полиспецифические антитела, при этом область

Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-25; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-50.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-24; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-49.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 21, 23 и 24; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 32, 33, 34, 37, 38, 40, 46, 48 и 49.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-25; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-50.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-24; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-49.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 21, 23 и 24; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 32, 33, 34, 37, 38, 40, 46, 48 и 49.

Необязательно указанные выше антитела сохраняют соответствующие последовательности CDR, так что любая вариабельность последовательностей VH и VL возникает в каркасных областях.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-25; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-50.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-24; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-49.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 21, 23 и 24; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 32, 33, 34, 37, 38, 40, 46, 48 и 49.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая

имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 37;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 38;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая

имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 39;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 40;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 43;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 44;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 45;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая

имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 49; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50.

Необязательно указанные выше антитела сохраняют соответствующие последовательности CDR, так что любая вариабельность последовательностей VH и VL возникает в каркасных областях.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 37;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 38;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 39;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 40;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 43;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 44;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 45;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 49; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 96% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50.

Необязательно указанные выше антитела сохраняют соответствующие последовательности CDR, так что любая вариабельность последовательностей VH и VL возникает в каркасных областях.

Необязательно указанные выше антитела сохраняют соответствующие последовательности CDR, так что любая вариабельность последовательностей VH и VL возникает в каркасных областях.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, необязательно имеющие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID

NO: 28, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID

NO: 38, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID

NO: 48, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49, необязательно имеющие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50, необязательно имеющие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

«В обеих вариабельных областях» в совокупности означает, что антитело может содержать в целом до указанного количества замен, если рассматривать вариабельные области как тяжелой, так и легкой цепи. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления замены (если они присутствуют) могут встречаться где угодно в последовательностях вариабельной области. В предпочтительных вариантах осуществления замены (если они присутствуют) могут быть ограничены каркасными областями. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены не встречаются в последовательности CDR.

Необязательно указанные выше антитела сохраняют соответствующие последовательности CDR, так что любая вариабельность последовательностей VH и VL возникает в каркасных областях.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID

NO: 20, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50.

Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

В любых вариантах осуществления, относящихся к областям Fab, имеющим определенные последовательности VH и/или VL (например, любые последовательности VH и/или VL, определенные как имеющие определенный процент идентичности и/или замен), при этом предпочтительно последовательность VH не является SEQ ID NO: 1, а последовательность VL не является SEQ ID NO: 26.

Другие антитела содержат области Fab, полученные из ADT1-4.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

последовательность HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности $GDSVSSKSX_1A$ (SEQ ID NO: 158);

последовательность HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 53

последовательность HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $X_2WX_3X_4X_5X_6DX_7$ (SEQ ID NO: 162), где последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 54;

последовательность LCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 79;

последовательность LCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 80; и

последовательность LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности

$QQX_8YX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}T$ (SEQ ID NO: 166), где последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 81;

и где каждый из X_1-X_{13} представляет собой природную аминокислоту.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

последовательность HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности $GDSVSSKSX_1A$ (SEQ ID NO: 159);

последовательность HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 53

последовательность HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $X_2WX_3X_4X_5X_6DX_7$ (SEQ ID NO: 163), где последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 54;

последовательность LCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 79;

последовательность LCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 80; и

последовательность LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $QQX_8YX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}T$ (SEQ ID NO: 167), где последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 81;

и где: X_1 выбран из группы, состоящей из A и V; X_2 выбран из группы, состоящей из S и T; X_3 выбран из группы, состоящей из V, A и L; X_4 выбран из группы, состоящей из G, E и D; X_5 выбран из группы, состоящей из Y и N; X_6 выбран из группы, состоящей из V, A и P; X_7 выбран из группы, состоящей из V, Y и R; X_8 выбран из группы, состоящей из K, R и G; X_9 выбран из группы, состоящей из S и K; X_{10} выбран из группы, состоящей из T, Q, A, E и D; X_{11} выбран из группы, состоящей из P, H и D; X_{12} выбран из группы, состоящей из Q, R, K, W, P, E и I; и X_{13} выбран из группы, состоящей из I, V и L. Антитело может дополнительно содержать последовательность HFR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 170 или 171; последовательность HFR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 172; последовательность HFR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 173; последовательность HFR4, включающую последовательность SEQ ID NO: 174; последовательность LFR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 175; последовательность LFR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 176; последовательность LFR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 177 или 178; и последовательность LFR4, включающую последовательность SEQ ID NO: 179, 180, 181 или 182.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

последовательность HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности

GDSVSSKSX$_1$A (SEQ ID NO: 160);

последовательность HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 53

последовательность HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности X$_2$WX$_3$X$_4$X$_5$X$_6$DX$_7$ (SEQ ID NO: 164), где последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 54;

последовательность LCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 79;

последовательность LCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 80; и

последовательность LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности QQX$_8$YX$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$T (SEQ ID NO: 168), где последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 81;

и где: X$_1$ выбран из группы, состоящей из A и V; X$_2$ выбран из группы, состоящей из S и T; X$_3$ выбран из группы, состоящей из V, A и L; X$_4$ выбран из группы, состоящей из G, E и D; X$_5$ выбран из группы, состоящей из Y и N; X$_6$ выбран из группы, состоящей из V, A и P; X$_7$ выбран из группы, состоящей из V, Y и R; X$_8$ выбран из группы, состоящей из K, R и G; X$_9$ выбран из группы, состоящей из S и K; X$_{10}$ выбран из группы, состоящей из T, Q, A, E и D; X$_{11}$ выбран из группы, состоящей из P и H; X$_{12}$ выбран из группы, состоящей из Q, R, K, W, P, E и I; и X$_{13}$ выбран из группы, состоящей из I, V и L. Антитело может дополнительно содержать последовательность HFR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 170 или 171; последовательность HFR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 172; последовательность HFR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 173; последовательность HFR4, включающую последовательность SEQ ID NO: 174; последовательность LFR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 175; последовательность LFR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 176; последовательность LFR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 177 и последовательность LFR4, включающую последовательность SEQ ID NO: 179, 180, 181 или 182.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

последовательность HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности GDSVSSKSX$_1$A (SEQ ID NO: 161);

последовательность HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 53

последовательность HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности X$_2$WX$_3$X$_4$X$_5$X$_6$DX$_7$ (SEQ ID NO: 165), где последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 54;

последовательность LCDR1, содержащую или состоящую из последовательности

SEQ ID NO: 79;

последовательность LCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 80; и

последовательность LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $QQX_8YX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}T$ (SEQ ID NO: 169), где последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 81;

и где: X_1 выбран из группы, состоящей из A и V; X_2 выбран из группы, состоящей из S и T; X_3 выбран из группы, состоящей из V, A и L; X_4 выбран из группы, состоящей из G и D; X_5 выбран из группы, состоящей из Y и N; X_6 выбран из группы, состоящей из V, A и P; X_7 выбран из группы, состоящей из V, Y и R; X_8 выбран из группы, состоящей из K и R; X_9 выбран из группы, состоящей из S и K; X_{10} выбран из группы, состоящей из T, Q, A и E; X_{11} выбран из группы, состоящей из P и H; X_{12} выбран из группы, состоящей из Q, K, W, P и I; и X_{13} выбран из группы, состоящей из V и L. Антитело может дополнительно содержать последовательность HFR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 170 или 171; последовательность HFR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 172; последовательность HFR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 173; последовательность HFR4, включающую последовательность SEQ ID NO: 174; последовательность LFR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 175; последовательность LFR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 176; последовательность LFR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 177 и последовательность LFR4, включающую последовательность SEQ ID NO: 179 или 181.

Области Fab, полученные из ADT1-7

Настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, содержащим области Fab, полученные из исходного антитела ADT1-7 (имеющего последовательность вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 106 и последовательность вариабельной области легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 118), например, как указано ниже. ADT1-7 также упоминается в данном документе как E07, а ADT1-7 и E07 используются взаимозаменяемо.

Антитела, содержащие определенные последовательности CDR, полученные из ADT1-7

Полиспецифические антитела, представленные в данном документе, включают следующие области Fab, имеющие определенные последовательности, полученные из ADT1-7.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 133-143; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147-157.

Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138, 142 и 143; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 152, 156 и 157. Определенные аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130;

VHCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 131; и

VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 133-143; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую:

VLCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 144;

VLCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145; и

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 147-157.

Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130;

VHCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 131; и

VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 138, 142 и 143; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую:

VLCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ

ID NO: 144;

VLCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145; и

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 152, 156 и 157.

Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

Дополнительные варианты осуществления представлены ниже.

ADT1-7-10 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-10, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 147. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 147. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-10, например, предложены

полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%

или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 147.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 147.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-10, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, необязательно

имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-7-15 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-15, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 148. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 148. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-15, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную

область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 148.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 148.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-15, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-7-17 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-17, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 135, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 149. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 135 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 149. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-17, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 135; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 149.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90%

идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 135; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 149.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-17, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-7-18 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-18, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические

антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 136, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 150. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 136 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 150. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-18, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей

мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 136; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 150.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 136; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 150.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-18, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-7-19 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-19, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%,

по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 151. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 151. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-19, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 151.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 151.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1)

содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-19, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-7-20 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-20, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 138, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3,

включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 152. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 138 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 152. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-20, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%,

по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 138; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 152.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 138; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 152.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-20, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-7-22 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-22, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 139, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%,

по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 153. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 139 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 153. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-22, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 139; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 153.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 139; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 153.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-22, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-7-23 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-23, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 140, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 154. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность,

имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 140 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 154. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-23, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 140; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей

мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 154.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 140; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 154.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-23, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен

дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-7-42 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-42, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 141, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 155. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 141 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 155. В одном варианте

осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-42, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 141; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по

меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 155.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 141; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 155.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-42, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-7-3 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-3, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 156. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 156. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, и/или вариабельную область легкой цепи,

содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-3, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 156.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 156.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-3, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156, необязательно имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

ADT1-7-61 и его фрагменты и варианты

Определенные варианты осуществления относятся к антителу ADT1-7-61, его фрагментам и вариантам.

Например, в некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 143, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 157. В одном варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 143 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 157. В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-61, например, предложены

полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 143; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%

или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 157.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, VHCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 143; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, VLCDR2, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 157.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

Аминокислотные замены могут быть произведены с целью получения вариантов антител, имеющих области Fab, полученные из ADT1-7-61, например, предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, VHCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VHCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, необязательно имеющий 1 или 2 аминокислотные замены, VLCDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, необязательно имеющую 1 или 2 аминокислотные замены, и VLCDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157, необязательно

имеющие 1 или 2 аминокислотные замены. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами.

Альтернативно антитела могут состоять из указанных последовательностей (с аминокислотными заменами или без них).

Антитела, содержащие вариабельные области тяжелой и/или легкой цепи, полученные из ADT1-7

В данном документе предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 107-117; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119-129.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 112, 116 и 117; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124, 128 и 129.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 107-117; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119-129.

Также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 112, 116 и 117; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124, 128 и 129.

Необязательно указанные выше антитела сохраняют соответствующие последовательности CDR, так что любая вариабельность последовательностей VH и VL возникает в каркасных областях.

В данном документе предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 107-117; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119-129.

В данном документе также предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 112, 116 и 117; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124, 128 и 129.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 107, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 119;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID

NO: 108, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 120;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 121;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 110, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 122;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 123;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 124;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 125;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 126;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 127;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ

ID NO: 116, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 128; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 129.

Необязательно указанные выше антитела сохраняют соответствующие последовательности CDR, так что любая вариабельность последовательностей VH и VL возникает в каркасных областях.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 107, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 119, необязательно имеющие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 120, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 121, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 110, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 123, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ

ID NO: 125, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 126, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 127, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 116, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 128, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 129, необязательно содержащие до 5, до 4, до 3, до 2 или 1 аминокислотную замену в обеих вариабельных областях.

«В обеих вариабельных областях» в совокупности означает, что антитело может содержать в целом до указанного количества замен, если рассматривать вариабельные области как тяжелой, так и легкой цепи. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления замены (если они присутствуют) могут встречаться где угодно в последовательностях вариабельной области. В предпочтительных вариантах осуществления замены (если они присутствуют) могут быть ограничены каркасными областями. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены не встречаются в последовательности CDR.

Необязательно указанные выше антитела сохраняют соответствующие последовательности CDR, так что любая вариабельность последовательностей VH и VL возникает в каркасных областях.

В некоторых вариантах осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 107, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 119;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 120;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID

NO: 109, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 121;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 110, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 123;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 125;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 126;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 127;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 116, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 128; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 129.

Определенные аминокислотные замены могут быть сделаны для получения одного или более вариантов антител, как описано в данном документе.

В любых вариантах осуществления, относящихся к областям Fab, имеющим определенные последовательности VH и/или VL (например, любые последовательности VH и/или VL, определенные как имеющие определенный процент идентичности и/или замен), при этом предпочтительно последовательность VH не является SEQ ID NO: 106, а последовательность VL не является SEQ ID NO: 118.

Другие антитела содержат области Fab, полученные из ADT1-7.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

последовательность HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 130;

последовательность HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности

SEQ ID NO: 131;

последовательность HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $X_1X_2YX_3X_4AFDI$ (SEQ ID NO: 183), где последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 132;

последовательность LCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 144;

последовательность LCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 145; и

последовательность LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $QQX_5X_6X_7X_8LX_9T$ (SEQ ID NO: 186), где последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 146;

где каждый из X_1-X_9 представляет собой природную аминокислоту.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

последовательность HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 130;

последовательность HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 131;

последовательность HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $X_1X_2YX_3X_4AFDI$ (SEQ ID NO: 184), где последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 132;

последовательность LCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 144;

последовательность LCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 145; и

последовательность LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $QQX_5X_6X_7X_8LX_9T$ (SEQ ID NO: 187), где последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 146;

где X_1 выбран из группы, состоящей из D, I и V; X_2 выбран из группы, состоящей из D и S; X_3 выбран из группы, состоящей из N, E, D, Q и A; X_4 выбран из группы, состоящей из D и E; X_5 выбран из группы, состоящей из T и S; X_6 выбран из группы, состоящей из A, G, Y и S; X_7 выбран из группы, состоящей из S и D; X_8 выбран из группы, состоящей из T, E и G; и X_9 выбран из группы, состоящей из L и D. Антитело может дополнительно содержать последовательность HFR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 189; последовательность HFR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 190; последовательность HFR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 191; последовательность HFR4, включающую последовательность SEQ ID NO: 192; последовательность LFR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 193 и 194; последовательность LFR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 195;

последовательность LFR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 196; и последовательность LFR4, включающую последовательность SEQ ID NO: 197.

В одном варианте осуществления предложены полиспецифические антитела, при этом область Fab, связывающая вариабельный домен дельта-цепи 1 TCR, (анти-Vδ1) содержит:

последовательность HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 130

последовательность HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 131

последовательность HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $X_1X_2YX_3X_4$AFDI (SEQ ID NO: 185), где последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 132;

последовательность LCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 144;

последовательность LCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 145; и

последовательность LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $QQX_5X_6X_7X_8LX_9T$ (SEQ ID NO: 188), где последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 146;

где X_1 выбран из группы, состоящей из D и V; X_2 выбран из группы, состоящей из D и S; X_3 выбран из группы, состоящей из D, Q и A; X_4 выбран из группы, состоящей из D и E; X_5 представляет собой S; X_6 выбран из группы, состоящей из A и Y; X_7 представляет собой S; X_8 выбран из группы, состоящей из E и G; и X_9 выбран из группы, состоящей из L и D. Антитело может дополнительно содержать последовательность HFR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 189; последовательность HFR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 190; последовательность HFR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 191; последовательность HFR4, включающую последовательность SEQ ID NO: 192; последовательность LFR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 193; последовательность LFR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 195; последовательность LFR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 196; и последовательность LFR4, содержащую последовательность SEQ ID NO: 197.

Антитела с заменами в последовательности

Специалисту в данной области техники известно, что различные аминокислоты обладают сходными свойствами. Одна или более таких аминокислот субстанции часто могут быть заменены одной или более другими такими аминокислотами без устранения желаемой активности этой субстанции.

Так, аминокислоты глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин часто могут быть заменены одна на другую (аминокислоты с алифатическими боковыми цепями). Из этих возможных замен предпочтительно, чтобы глицин и аланин использовались для замены

одна другой (поскольку они имеют относительно короткие боковые цепи) и чтобы валин, лейцин и изолейцин использовались для замены одна другой (поскольку они имеют более крупные алифатические боковые цепи, которые гидрофобны). Другие аминокислоты, которые часто могут заменены друг другом, включают: фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи); лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи); аспартат и глутамат (аминокислоты с кислыми боковыми цепями); аспарагин и глутамин (аминокислоты с амидными боковыми цепями); и цистеин и метионин (аминокислоты с серосодержащими боковыми цепями).

«Консервативная» аминокислотная замена представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком сходной химической структуры и которая, как ожидается, не будет оказывать значительного влияния на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Такие консервативные замены предпочтительно представляют собой замены, в которых одна аминокислота из следующих групп заменена другим аминокислотным остатком из этой же группы:

Группа	**Аминокислотный остаток**
Неполярные алифатические	Глицин
	Аланин
	Валин
	Метионин
	Лейцин
	Изолейцин
Ароматические	Фенилаланин
	Тирозин
	Триптофан
Полярные незаряженные	Серин
	Треонин
	Цистеин
	Пролин
	Аспарагин
	Глутамин
Отрицательно заряженные	Аспартат
	Глутамат
Положительно заряженные	Лизин
	Аргинин
	Гистидин

Предпочтительно, гидрофобный аминокислотный остаток представляет собой неполярную аминокислоту. Более предпочтительно , гидрофобный аминокислотный остаток выбран из V, I, L, M, F, W или C. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток выбран из глицина, аланина, валина, метионина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, тирозина или триптофана.

Следовательно, ссылки на «консервативные» аминокислотные замены относятся к

аминокислотным заменам, при которых одна или более аминокислот в последовательности антитела (например, в CDR или в последовательностях VH или VL) заменены другой аминокислотой того же класса, что указан выше. Консервативные аминокислотные замены могут быть предпочтительными в областях CDR, чтобы свести к минимуму неблагоприятные эффекты на функцию антитела. Однако в каркасных областях также могут встречаться консервативные аминокислотные замены. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления любые замены в CDR могут быть консервативными заменами, тогда как замены в каркасных областях могут представлять собой замены природных аминокислот на другие природные аминокислоты.

Аминокислотные делеции или вставки также могут быть сделаны относительно аминокислотных последовательностей, предложенных для описанных в данном документе антител. Так, например, могут быть удалены аминокислоты, которые не оказывают существенного влияния на активность полипептида или по меньшей мере не устраняют такую активность. Такие делеции могут быть выгодными, поскольку общая длина и молекулярная масса полипептида могут быть уменьшены при сохранении активности. Это может позволить уменьшить количество полипептида, необходимого для конкретной цели, например, можно уменьшить уровни дозировки.

Аминокислотные изменения относительно последовательностей, представленных в данном документе, могут быть сделаны с использованием любого подходящего метода, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза или твердофазного синтеза.

Следует понимать, что аминокислотные замены или вставки в рамках настоящего изобретения могут быть выполнены с использованием природных или неприродных аминокислот, хотя природные аминокислоты могут быть предпочтительными. Независимо от того, используются ли природные или синтетические аминокислоты, может быть предпочтительным, чтобы присутствовали только L-аминокислоты.

Различные варианты осуществления, включающие необязательные аминокислотные замены, представлены в данном документе. Кроме того, в одном варианте осуществления изобретения предложены антитела или их антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, содержащие до 10, предпочтительно до 5 или предпочтительно до 2 аминокислотных замен в связывающем домене антитела или антигенсвязывающих доменах. Например, в одном варианте осуществления изобретения предложено антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат 6 областей CDR антитела, выбранного из группы, состоящей из ADT1-4-105, ADT1-4-107, ADT1-4-110, ADT1-4-112, ADT1-4-117, ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-139, ADT1-4-4, ADT1-4-143, ADT1-4-53, ADT1-4-173, ADT1-4-2, ADT1-4-8, ADT1-4-82, ADT1-4-83, ADT1-4-3, ADT1-4-84, ADT1-4-86, ADT1-4-95, ADT1-4-1, ADT1-4-6, ADT1-4-138, ADT1-7-10, ADT1-7-15, ADT1-7-17, ADT1-7-18, ADT1-7-19, ADT1-7-20, ADT1-7-22, ADT1-7-23, ADT1-7-42, ADT1-7-3 и ADT1-7-61, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют до 10 аминокислотных замен во всех его областях CDR, предпочтительно до 5 аминокислотных замен или до 2 аминокислотных замен. В

другом варианте осуществления изобретения предложено антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности VH и VL антитела, выбранного из группы, состоящей из ADT1-4-105, ADT1-4-107, ADT1-4-110, ADT1-4-112, ADT1-4-117, ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-139, ADT1-4-4, ADT1-4-143, ADT1-4-53, ADT1-4-173, ADT1-4-2, ADT1-4-8, ADT1-4-82, ADT1-4-83, ADT1-4-3, ADT1-4-84, ADT1-4-86, ADT1-4-95, ADT1-4-1, ADT1-4-6, ADT1-4-138, ADT1-7-10, ADT1-7-15, ADT1-7-17, ADT1-7-18, ADT1-7-19, ADT1-7-20, ADT1-7-22, ADT1-7-23, ADT1-7-42, ADT1-7-3 и ADT1-7-61, при этом антитело имеет до 10 замен аминокислот в своих последовательностях VH и VL, предпочтительно до 5 замен аминокислот или до 2 замен аминокислот. В еще одном варианте осуществления изобретения предложено антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело, выбранное из группы, состоящей из ADT1-4-105, ADT1-4-107, ADT1-4-110, ADT1-4-112, ADT1-4-117, ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-139, ADT1-4-4, ADT1-4-143, ADT1-4-53, ADT1-4-173, ADT1-4-2, ADT1-4-8, ADT1-4-82, ADT1-4-83, ADT1-4-3, ADT1-4-84, ADT1-4-86, ADT1-4-95, ADT1-4-1, ADT1-4-6, ADT1-4-138, ADT1-7-10, ADT1-7-15, ADT1-7-17, ADT1-7-18, ADT1-7-19, ADT1-7-20, ADT1-7-22, ADT1-7-23, ADT1-7-42, ADT1-7-3 и ADT1-7-61, при этом антитело имеет до нескольких аминокислотных замен, предпочтительно до 5 аминокислотных замен или до 2 аминокислотных замен. Замены, конечно, представляют собой замены по отношению к исходным последовательностям CDR или вариабельной цепи исходного антитела.

В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен находятся в области или областях CDR. В других вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен находятся в каркасных областях, то есть в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей, но не в области или областях CDR. В других вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен могут находиться в любом положении в вариабельных областях тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены не встречаются в последовательности CDR.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены не оказывают неблагоприятного воздействия на специфичность связывания и/или аффинность антитела. Соответственно, вариант антитела может иметь такой же (или по существу такой же) или более высокий функциональный профиль, чем антитело, из которого оно получено.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены могут быть сделаны для увеличения аффинности связывания антитела с конкретным антигеном. Например, в вариантах осуществления изобретения, относящихся к мутагенезу серина в положении 74 (вариабельной области) легкой цепи, может быть произведена замена для увеличения перекрестной реактивности антитела с гомологом яванского макака антигена человека, против которого получено антитело. В отличие от других замен, описанных выше, эта замена предпочтительно может быть неконсервативной. В некоторых вариантах

осуществления замена может представлять собой замену серина в положении 74 на неполярную аминокислоту (например, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, метионина, лейцина и изолейцина). Альтернативно, серин может быть заменен аминокислотой, отличной от аминокислоты зародышевой линии человека (например, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аргинина, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, треонина, триптофана, тирозина и валина). В некоторых вариантах осуществления серин может быть заменен аминокислотой, которая не является как аминокислотой зародышевой линии человека, так и является неполярной, то есть аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из глицина, валина, метионина, лейцина и изолейцина. В некоторых вариантах осуществления серин может быть заменен лейцином.

Эпитопы

В данном документе предложены полиспецифические антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты), которые связываются с эпитопом Vδ1-цепи γδ TCR. Такое связывание необязательно может оказывать эффект на активность γδ TCR, такой как активация. Полиспецифические антитела по изобретению являются специфичными для Vδ1-цепи γδ TCR и не связывают эпитопы других антигенов, таких как Vδ2-цепь γδ TCR или Vδ3-цепь γδ TCR. Антитела по настоящему изобретению могут считаться агонистическими антителами по меньшей мере для агонистического эффекта, оказываемого Vδ1 клеткам при связывании.

В одном варианте осуществления эпитоп может представлять собой активирующий эпитоп γδ Т-клетки. «Активирующий» эпитоп может включать, например, стимуляцию функции TCR, такую как дегрануляция клеток, снижение уровня TCR, цитотоксичность, пролиферация, мобилизация, повышенная выживаемость или устойчивость к истощению, внутриклеточный сигналинг, секреция цитокина или фактора роста, фенотипическое изменение или изменение экспрессии генов. Например, связывание активирующего эпитопа может стимулировать размножение (*т. е.* пролиферацию) популяции γδ Т-клеток, предпочтительно популяции Vδ1+Т-клеток. Соответственно, эти антитела можно использовать для модуляции активации γδ Т-клеток и тем самым модуляции иммунного ответа. Таким образом, в одном варианте осуществления связывание активирующего эпитопа подавляет γδ TCR. В дополнительном или альтернативном варианте осуществления связывание активирующего эпитопа активирует дегрануляцию γδ Т-клетки. В еще одном дополнительном или альтернативном варианте осуществления связывание активирующего эпитопа способствует уничтожению, опосредованному γδ Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления активирующий эпитоп TRDV1 представляет собой эпитоп, который при связывании с антителом приводит к снижению количества рецептора и необязательно активирует Vδ1 клетку. В некоторых вариантах осуществления активирующий эпитоп представляет собой эпитоп, который повышает экспрессию активирующих маркеров на Vδ1 клетке, например, CD107a, CD25, CD69 и/или Ki67. В некоторых вариантах осуществления активирующий эпитоп представляет собой эпитоп,

который повышает экспрессию активирующих маркеров на Vδ1 клетке, например, CD107 и CD25 и необязательно, CD69 и/или Ki67. В некоторых вариантах осуществления активация одного или более активирующих маркеров (таких как CD107a) может быть активацией в присутствии раковых клеток. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела связывают активирующие эпитопы TRDV1, в частности, через связывающий TRDV1 домен.

Поскольку Т-клеточные рецепторы часто образуют комплексы с другими белками, снижение уровня Т-клеточного рецептора за счет связывания антитела к Vδ1 может вызвать снижение уровня других белков, связанных с Т-клеточным рецептором (т. е. связывание антитела к Vδ1 вызывает снижение уровня комплекса Т-клеточного рецептора). Например, в некоторых вариантах осуществления активирующий эпитоп TRDV1 представляет собой эпитоп, который при связывании снижает уровень комплекса TCR/рецептор CD3. Таким образом, антитела по изобретению могут вызывать непрямое снижение количества белков клеточной поверхности, которые не связаны с антителом, но образуют комплексы с Т-клеточным рецептором. Учитывая, что Т-клетки, экспрессирующие цепи гамма-дельта 1 (т.е. клетки Vδ1), представляют собой лишь небольшое количество от общей популяции Т-клеток, полиспецифические антитела по изобретению можно использовать для селективного (и непрямого) снижения количества белков в комплексе TCR, таких как CD3, снижая их количество только в Vδ1- клетках.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп, активирующий комплекс рецептора Т-клетки, представляет собой эпитоп, который при активации снижает содержание комплексов Т-клеточного рецептора, но не снижает количество молекул CD3, не связанные с указанным комплексом TCR TRDV1.

Эпитоп предпочтительно состоит из или состоит по меньшей мере из одной внеклеточной, растворимой, гидрофильной или внешней части Vδ1-цепи γδ TCR.

В частности, эпитоп не содержит или не состоит из эпитопа, обнаруженного в гипервариабельной области Vδ1-цепи γδ TCR, в частности CDR3 Vδ1-цепи. В предпочтительном варианте осуществления эпитоп находится в пределах невариабельной области Vδ1-цепи γδ TCR. Следует понимать, что такое связывание обеспечивает уникальное распознавание Vδ1-цепи без ограничения последовательностей TCR, которые являются сильно вариабельными (в частности, CDR3). Различные комплексы γδ TCR, которые распознают антиген, могут быть распознаны таким образом исключительно по присутствию Vδ1-цепи. Таким образом, следует понимать, что любой γδ TCR, содержащий Vδ1-цепь, может быть распознан с использованием полиспецифических антител, как определено в данном документе, независимо от специфичности γδ TCR. В одном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO: 272, например, части Vδ1-цепи, которые не являются частью последовательностей CDR1 и/или CDR3. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит или не состоит из аминокислотных остатков в аминокислотной области 91-105 (CDR3) SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит или состоит из аминокислот в последовательности CDR2 к TRDV-1.

Аналогично хорошо охарактеризованным αβ Т-клеткам, γδ Т-клетки используют определенный набор соматически реаранжированных генов вариабельности (V), разнообразия (D), присоединения (J) и константной области (C), хотя γδ Т-клетки содержат меньше сегментов V, D и J, чем αβ Т-клетки. В одном варианте осуществления эпитоп Vδ1, связанный с полиспецифическими антителами (или их антигенсвязывающими фрагментами), не содержит или состоит из эпитопа, обнаруженного в J-области Vδ1-цепи (например, одна из четырех J-областей, кодируемых в зародышевой линии дельта-цепи человека: SEQ ID NO:301 (J1*0) или 302 (J2*0) или 303 (J3*0), или 304 (J4*0)), или в C-области Vδ1-цепи (например, SEQ ID NO:305 (C1*0) который содержит C-концевые околомембранные/трансмембранные области). В одном варианте осуществления эпитоп Vδ1, связанного полиспецифическими антителами (или их антигенсвязывающими фрагментами), не содержит или не состоит из эпитопа, обнаруженного в N-концевой лидерной последовательности Vδ1-цепи (например, SEQ ID NO: 299). Таким образом, антитело или его фрагмент могут связываться только в V-области Vδ1-цепи (например, SEQ ID NO: 300).Таким образом, в одном варианте осуществления эпитоп состоит из эпитопа в V-области γδ TCR (*например*, аминокислотные остатки 1-90 из SEQ ID NO: 272).

Ссылки на эпитоп сделаны для последовательности Vδ1, полученной из последовательности, описанной Luoma *et al.* (2013) *Immunity* 39: 1032-1042, и записей банка данных белков RCSB: 3OMZ, представленных как SEQ ID NO: 272:

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQLPSKEMIFLIRQGSD EQNAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGESLTRADKLIFGKGTRVTV EPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDF KSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS (SEQ ID NO: 272)

SEQ ID NO: 272 представляет собой растворимый TCR, содержащий или состоящий из V-области (также называемой вариабельным доменом), D-области, J-области и константной области TCR. V-область содержит или состоит из аминокислотных остатков 1-90, область D содержит или состоит из аминокислотных остатков 91-104, J-область содержит или состоит из аминокислотных остатков 105-115, а константная область (полученная из Т-клеточного рецептора альфа) содержит или состоит из аминокислотных остатков 116-209. В пределах V-области, CDR1 определяется как аминокислотные остатки 25-34 SEQ ID NO: 272, CDR2 определяется как аминокислотные остатки 50-54 SEQ ID NO: 272, а CDR3 определяется как аминокислотные остатки 93-104. SEQ ID NO: 272 (Xu *et al.*, PNAS USA 108(6):2414-2419 (2011)).

Следовательно, в соответствии с аспектом изобретения предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с эпитопом вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR), содержащего или состоящего из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей:

(i) 3-20 SEQ ID NO: 272; и/или

(ii) 37-77 SEQ ID NO: 272.

В дополнительном варианте осуществления полиспецифические антитела дополнительно распознают полиморфную V-область, содержащую или состоящую из аминокислотных остатков 1-90 эпитопа SEQ ID NO: 306. Следовательно, аминокислоты 1-90 SEQ ID NO:272 и последовательность полиморфного варианта зародышевой линии (аминокислоты 1-90 SEQ ID NO:306) можно считать взаимозаменяемыми при определении описанных в данном документе эпитопов. Представленные в данном документе исследования продемонстрировали, что полиспецифические антитела по изобретению могут распознавать оба варианта этой последовательности зародышевой линии. В качестве примера, где указано, что полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, как определено в данном документе, распознают эпитопы, содержащие или состоящие из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO: 272, они дополнительно распознают эквивалентные эпитопы (т.е. в том же положении) в SEQ ID NO: 306.

В одном варианте осуществления полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты распознают один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-90 SEQ ID NO: 272. Более конкретно, в одном варианте осуществления полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, как определено в данном документе, распознают эпитоп последовательности зародышевой линии человека, где указанная зародышевая линия кодирует либо аланин (A), либо валин (V) в положении 71 SEQ ID NO: 272.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более, например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более аминокислотных остатков в пределах описанных областей.

В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 3-20 SEQ ID NO: 272. В альтернативном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 37-77 SEQ ID NO: 272 (например, аминокислотной области 50-54). В еще одном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 3-20 (например, 5-20 или 3-17) и один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 37-77 (например, 62-77 или 62-69) SEQ ID NO: 272.

Также следует понимать, что указанное антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) не должно связываться со всеми аминокислотами в пределах указанного диапазона. Такие эпитопы можно назвать линейными эпитопами. Например, антитело, которое связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислотных остатков

в аминокислотной области 5-20 из SEQ ID NO: 272 может связываться только с одним или большим количеством аминокислотных остатков в указанном диапазоне, *например*, с аминокислотными остатками на каждом конце диапазона (*т. е.* аминокислотными остатками 5 и 20), необязательно включая аминокислоты в пределах этого диапазона (*т. е.* аминокислоты 5, 9, 16 и 20).

В одном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из по меньшей мере одного из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 272. В дополнительных вариантах осуществления эпитоп содержит или состоит из одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати или двенадцати аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 272.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах следующих аминокислотных областей SEQ ID NO: 272:

(i) 3-17;

(ii) 5-20;

(iii) 37-53;

(iv) 50-64;

(v) 59-72;

(vi) 59-77;

(vii) 62-69; и/или

(viii) 62-77.

В дополнительных вариантах осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77 (например, хотя и не ограничиваясь ими, варианты осуществления, относящиеся к антителам, полученным из исходного клона E07, таким как их варианты с созревшей аффинностью); 50-64 (например, хотя и не ограничиваясь ими, варианты осуществления, относящиеся к антителам, полученным из исходного клона C08, таким как их варианты с созревшей аффинностью); 37-53 и 59-72 (например, хотя и не ограничиваясь ими, варианты осуществления, относящиеся к антителам, полученным из исходного клона G04, таким как их варианты с созревшей аффинностью); 59-77 (например, хотя и не ограничиваясь ими, варианты осуществления, относящиеся к антителам, полученным из исходного клона C05, таким как их варианты с созревшей аффинностью); или 3-17 и 62-69 (например, хотя и не ограничиваясь ими, варианты осуществления, относящиеся к антителам, полученным из исходного клона E01, таким как их варианты с созревшей аффинностью), SEQ ID NO: 272. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 272.

В другом варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из аминокислотных остатков: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 и 69 SEQ ID NO: 272, или соответственно состоит

из аминокислотных остатков: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 и 69 SEQ ID NO: 272 (например, хотя и не ограничиваясь ими, варианты осуществления, относящиеся к антителам, полученным из исходного клона E01, таким как их варианты с созревшей аффинностью). В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из аминокислотных остатков: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 272 или соответственно состоит из аминокислотных остатков: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 272 (например, хотя и не ограничиваясь ими, варианты осуществления, относящиеся к антителам, полученным из исходного клона E07, таким как их варианты с созревшей аффинностью). В еще одном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из аминокислотных остатков: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 272 или соответственно состоит из аминокислотных остатков: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 272 (например, хотя и не ограничиваясь ими, варианты осуществления, относящиеся к антителам, полученным из исходного клона G04, таким как их варианты с созревшей аффинностью). В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из аминокислотных остатков: 50, 53, 59, 62 и 64 SEQ ID NO: 272 или соответственно состоит из аминокислотных остатков: 50, 53, 59, 62 и 64 SEQ ID NO: 272 (например, хотя и не ограничиваясь ими, варианты осуществления, относящиеся к антителам, полученным из исходного клона C08, таким как их варианты с созревшей аффинностью). В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из аминокислотных остатков: 59, 60, 68 и 72 SEQ ID NO: 272 или соответственно состоит из аминокислотных остатков: 59, 60, 68 и 72 SEQ ID NO: 272 (например, хотя и не ограничиваясь ими, варианты осуществления, относящиеся к антителам, полученным из исходного клона C05, таким как их варианты с созревшей аффинностью).

В одном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 37-53 и/или 59-77 SEQ ID NO: 272. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 и/или 59-77 SEQ ID NO: 272. В другом альтернативном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 или 59-77 SEQ ID NO: 272. Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности G04, или такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены из G04. Например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR G04 или одну или обе последовательности VH и VL G04, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 5-20 и/или 62-77 SEQ ID NO: 272. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 и/или 62-77 SEQ ID NO: 272. В другом альтернативном варианте осуществления эпитоп содержит

или состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 или 62-77 SEQ ID NO: 272. Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности E07, или такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены из E07. Например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR E07 или одну или обе последовательности VH и VL E07, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 50-64 SEQ ID NO: 272. В другом варианте осуществления эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 50-64 SEQ ID NO: 272. Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности C08, или такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены из C08. Например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR C08 или одну или обе последовательности VH и VL C08, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит или состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 59-72 SEQ ID NO: 272. В другом варианте осуществления эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 59-72 SEQ ID NO: 272. Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности C05, или такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены из C05. Например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR C05 или одну или обе последовательности VH и VL C05, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп не содержит или не состоит из аминокислотных остатков в аминокислотной области 11-21 SEQ ID NO: 272. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит или не состоит из аминокислотных остатков в аминокислотной области 21-28 SEQ ID NO: 272. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит или не состоит из аминокислотных остатков в аминокислотной области 59 и 60 SEQ ID NO: 272. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит или не состоит из аминокислотных остатков в аминокислотной области 67-82 SEQ ID NO: 272.

Эпитопы для антител с созревшей аффинностью, как правило, будут такими же, как и эпитопы, идентифицированные в данном описании для исходного клона. Для этих эпитопов на TRDV1 яванского макака положения эпитопов для антител с созревшей аффинностью, как правило, будут такими же, как положения эпитопов, идентифицированных для соответствующего исходного клона. Ссылка на «положения» необходима, поскольку специалисту в данной области техники будет понятно, что идентичность некоторых аминокислот в эпитопах отличается от TRDV1 человека. Несмотря на эти различия между TRDV1 человека и яванского макака, такие антитела все

еще способны специфически связываться с обоими антигенами.

В одном варианте осуществления эпитоп не является тем же эпитопом, который связывается коммерчески доступным антителом к Vδ1, таким как TS-1 или TS8.2. Как описано в WO2017197347, связывание TS-1 и TS8.2 с растворимыми TCR обнаруживалось, когда δ1-цепь включала последовательности Vδ1 J1 и Vδ1 J2, но не Vδ1 J3 цепь, указывая на то, что в связывании TS-1 и TS8.2 участвуют критические остатки в области дельта J1 и дельта J2.

Ссылки на термин «в пределах» в данном документе включают крайние значения определяемого диапазона. Например, фраза «в пределах аминокислотных областей 5-20» относится ко всем аминокислотным остаткам от остатка 5 включительно до остатка 20 включительно.

В данной области техники известны различные методы для определения того, какой эпитоп связывается антителом. Типовые методы включают в себя, например, стандартные анализы перекрестного блокирования, анализ методом аланин-сканирующего мутагенеза, анализ пептидных блотов, анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и анализ ЯМР. Кроме того, можно применять такие способы, как иссечение эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов. Другой способ, который можно применять для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, представляет собой водород-дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии (как описано в Примере 9). В общих чертах, способ водород-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антитела, подвергаются водород-дейтериевому обратному обмену с более низкой скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью поверхности. В результате этого аминокислоты, которые образуют часть поверхности белка/антитела, могут сохранять дейтерий и тем самым демонстрировать относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в поверхность. После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело.

Полиспецифические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты соответствующим образом специфически связываются как с TRDV1 человека (SEQ ID NO: 272 и полиморфный вариант SEQ ID NO: 306), так и с ортологом TRDV1 яванского макака (SEQ ID NO: 308, см. также UniProtKB - G7P9S6 (G7P9S6_MACFA)). В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой антитела, полученные из G04, которые специфически связываются с TRDV1 как человека, так и яванского макака. Предполагается, что эпитопы, связывающиеся с полиспецифическими антителами по изобретению (например, но не

ограничиваясь ими, эпитопы, связывающиеся в области аминокислотных остатков 37-77 любой из SEQ ID NO: 272, 306 или 308) могут быть особенно полезными, поскольку они позволяют получить антитела к Vδ1, специфичные к Vδ1 (т.е. не связывающие сходные антигены, такие как Vδ2 или Vδ3), но также обеспечивают перекрестную реактивность с полиморфными вариантами Vδ1 (т.е. TRDV1 SEQ ID NO: 272 и TRDV1 SEQ ID NO: 306, несмотря на полиморфизм в положении остатка 20, который идентифицирован как возможный контактный остаток или близкий к идентифицированному контактному остатку для некоторых антител) и обеспечивают перекрестную реактивность между Vδ1 человека и яванского макака (несмотря на все остатки 42, 50, 54, 59, 60, 68, 73, 75 и 76, находящиеся в области аминокислотных остатков 37-77 SEQ ID NO: 272 и 308, различающиеся между последовательностями TRDV1 человека и яванского макака).

Эпитопы полученных из ADT1-4 антител

Антитела, полученные из ADT1-4, связываются с тем же или по существу с тем же эпитопом, что и исходное антитело ADT1-4. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, в частности относящихся к антителам, полученным из исходного антитела ADT1-4 или родственным ему, антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает эпитоп, содержащий или состоящий из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 37-77, например, в пределах аминокислотных областей 37-53 и/или 59-77 SEQ ID NO: 272 (или SEQ ID NO: 306). В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит или состоит из аминокислотных остатков 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 272 (или SEQ ID NO: 306). В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из аминокислотных остатков 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 272 (или SEQ ID NO: 306).

Антитела, полученные из ADT1-4, также связываются с эпитопом вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) яванского макака из γδ Т-клеточного рецептора (TCR), также известного как TRDV1 яванского макака (SEQ ID NO: 308). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, в частности относящихся к антителам, полученным из исходного антитела G04 или родственным ему, антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает эпитоп, содержащий или состоящий из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 37-77, например, в пределах аминокислотных областей 37-53 и/или 59-77, SEQ ID NO: 308. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит или состоит из аминокислотных остатков 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 308. В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из аминокислотных остатков 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 308.

Учитывая, в частности, перекрестную реактивность антител, полученных из ADT1-4, и способность описанных в данном документе антител связываться с полиморфным вариантом TRDV1, таким образом, в некоторых вариантах осуществления, в частности относящихся к антителам, полученным из исходного антитела G04 или родственным ему, антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент связывают эпитоп, содержащий или состоящий из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотной

области 37-77, например, в пределах аминокислотных областей 37-53 и/или 59-77, SEQ ID NO: 272, 306 и 308. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит или состоит из аминокислотных остатков 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: : 272, 306 и 308. В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из аминокислотных остатков 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 272, 306 и 308.

Обеспечение антител, которые содержат или состоят из таких эпитопов, как те, что описаны выше, но обеспечивают перекрестную реактивность между последовательностями TRDV1 человека и яванского макака, является неожиданным, учитывая расположение аминокислотных вариантов в этих последовательностях у двух видов.

Эпитопы полученных из ADT1-7 антител

Антитела, полученные из ADT1-7, связываются с тем же или по существу с тем же эпитопом, что и исходное антитело ADT1-7. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, в частности относящихся к антителам, полученным из исходного антитела ADT1-7 или родственным ему, антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает эпитоп, содержащий или состоящий из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 и/или 62-77 SEQ ID NO: 272 (или SEQ ID NO: 306). В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит или состоит из аминокислотных остатков 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 272 (или SEQ ID NO: 306). В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из аминокислотных остатков 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 272 (или SEQ ID NO: 306).

Каркасные и другие последовательности

Соответственно, каждая из областей VH и VL полиспецифических антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению содержит четыре каркасные области (FR1-FR4). В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащие последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с каркасной областью в любой из SEQ ID NO: 2-25 (например, в случае вариабельных последовательностей легкой цепи, полученных из G04), SEQ ID NO: 27-50 (например, в случае вариабельных последовательностей тяжелой цепи, полученных из G04), SEQ ID NO: 107-117 (например, в случае вариабельной последовательности легкой цепи, полученной из E07) или SEQ ID NO: 119-129 (например, в случае вариабельной последовательности легкой цепи, полученной из E07). В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, 97% или 99% идентичности последовательности с каркасной областью в любой из SEQ ID NO: 2-25 (например, в случае вариабельных последовательностей легкой цепи, полученных из G04), SEQ ID NO: 27-50 (например, в случае вариабельных последовательностей легкой цепи, полученных из G04), SEQ ID NO: 107-117 (например, в случае вариабельной последовательности легкой цепи, полученной из E07), или SEQ ID NO: 119-129 (например, в случае вариабельной последовательности

легкой цепи, полученной из E07). В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность в любой из SEQ ID NO: 2-25 (например, в случае вариабельных последовательностей легкой цепи, полученных из G04), SEQ ID NO: 27-50 (например, в случае вариабельных последовательностей легкой цепи, полученных из G04), SEQ ID NO: 107-117 (например, в случае вариабельной последовательности легкой цепи, полученной из E07), или SEQ ID NO: 119-129 (например, в случае вариабельной последовательности легкой цепи, полученной из E07). В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), состоящую из последовательности в любой из SEQ ID NO: 2-25 (например, в случае вариабельных последовательностей легкой цепи, полученных из G04), SEQ ID NO: 27-50 (например, в случае вариабельных последовательностей легкой цепи, полученных из G04), SEQ ID NO: 107-117 (например, в случае вариабельной последовательности легкой цепи, полученной из E07), или SEQ ID NO: 119-129 (например, в случае вариабельной последовательности легкой цепи, полученной из E07).

В некоторых вариантах осуществления антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать последовательность HFR1 (т.е. каркасную область 1 тяжелой цепи), содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 170 или 171; последовательность HFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 172; последовательность HFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 173; последовательность HFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 174; последовательность LFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 175; последовательность LFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 176; последовательность LFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 177 или 178; и/или последовательность LFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 179, 180, 181 или 182.

В некоторых вариантах осуществления антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать последовательность HFR1 (т.е. каркасную область 1 тяжелой цепи), содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 170 или 171; последовательность HFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 172; последовательность HFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 173; последовательность HFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 174; последовательность LFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 175; последовательность LFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 176; последовательность LFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 177; и/или последовательность LFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 179, 180, 181 или 182.

В некоторых вариантах осуществления антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий

фрагмент могут содержать последовательность HFR1 (т.е. каркасную область 1 тяжелой цепи), содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 170 или 171; последовательность HFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 172; последовательность HFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 173; последовательность HFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 174; последовательность LFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 175; последовательность LFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 176; последовательность LFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 177; и/или последовательность LFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 179 или 181.

В некоторых вариантах осуществления антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать последовательность HFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 189; последовательность HFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 190; последовательность HFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 191; последовательность HFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 192; последовательность LFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 193 и 194; последовательность LFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 195; последовательность LFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 196; и последовательность LFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 197.

В некоторых вариантах осуществления антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать последовательность HFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 189; последовательность HFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 190; последовательность HFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 191; последовательность HFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 192; последовательность LFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 193; последовательность LFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 195; последовательность LFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 196; и последовательность LFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 197.

Для фрагментов, содержащих как область VH, так и область VL, они могут быть связаны ковалентно (*например*, посредством дисульфидных связей или линкера) или нековалентно. Фрагмент антитела, описанный в настоящем документе, может содержать scFv, *т. е.* фрагмент, содержащий область VH и область VL, соединенные с помощью линкера. В одном варианте осуществления области VH и VL соединены с помощью (*например*, синтетического) полипептидного линкера. Полипептидный линкер может содержать линкер $(Gly_4Ser)_n$, где n=от 1 до 8, *например*, 2, 3, 4, 5 или 7. Полипептидный

линкер может содержать линкер $[(Gly_4Ser)_n(Gly_3AlaSer)_m]_p$, где n=от 1 до 8, *например*, 2, 3, 4, 5 или 7, m=от 1 до 8, *например*, 0, 1, 2 или 3, а p=от 1 до 8, *например*, 1, 2 или 3. В дополнительном варианте осуществления линкер содержит SEQ ID NO: 291. В дополнительном варианте осуществления линкер состоит из SEQ ID NO: 291.

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что конструкции scFv могут быть сконструированы и получены с включением N-концевых и C-концевых модификаций для содействия трансляции, очистке и обнаружению. Например, на N-конце последовательности scFv перед каноническими последовательностями VH может быть включен дополнительный аминокислотный остаток метионина и/или аланина (например, начальный QVQ или EVQ). На C-конце (т. е. на C-конце последовательности канонического домена зрелой VL, оканчивающейся в соответствии с определением IMGT) могут быть включены дополнительные последовательности, такие как (i) частичная последовательность константного домена и/или (ii) дополнительные синтетические последовательности, включая метки, такие как His-метки и Flag-метки, для облегчения очистки и обнаружения (например, метки любой из SEQ ID NO: 292-295).

Как описано в настоящем документе, антитела могут находиться в любом формате. В предпочтительном варианте осуществления антитело находится в формате IgG1 (например, IgG1 человека) (т.е. антитело представляет собой антитело IgG1 человека).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 296 или SEQ ID NO: 307 (или последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 296 или SEQ ID NO: 307) и/или константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 297 или SEQ ID NO: 298 (или последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 297 или SEQ ID NO: 298). В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция константной области тяжелой цепи может быть снижена или устранена (мутации, устраняющие эффекторную функцию). Подходящие мутации для ослабления эффекторных функций известны специалистам в данной области техники. Например, мутации L235A и/или G237A («LAGA») или мутации L234A и/или L235A («LALA») в соответствии с нумерацией EU. Например, в одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 296, и/или константную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 297 или

SEQ ID NO: 298.

Конкурирующие антитела

В одном варианте осуществления антитело связывается с тем же или по существу таким же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как определено в данном документе, или конкурирует с ним. Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, или конкурирует за связывание с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к Vδ1, с помощью обычных способов, известных в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к Vδ1 по изобретению, эталонному антителу позволяют связываться с белком или пептидом Vδ1 в условиях насыщения. Затем оценивается способность исследуемого антитела связываться с Vδ1-цепью. Если исследуемое антитело способно связываться с Vδ1 после насыщения связывания с эталонным антителом к Vδ1, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается эталонное антитело к Vδ1. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с Vδ1-цепью после насыщения связыванием с эталонным антителом к Vδ1, тогда исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом к Vδ1 по изобретению.

Настоящее изобретение также включает в себя антитела к Vδ1, которые конкурируют за связывание с Vδ1 с антителом или его антигенсвязывающий фрагментом, как определено в данном документе, или антителом, имеющим последовательности CDR любых иллюстративных антител, описанных в данном документе. Например, конкурентные анализы можно проводить с антителом по настоящему изобретению, чтобы определить, какие белки, антитела и другие антагонисты конкурируют за связывание с цепью Vδ1 с антителом по настоящему изобретению и/или имеют общий эпитоп. Такие анализы хорошо известны специалистам в данной области техники; они оценивают конкуренцию между антагонистами или лигандами за ограниченное количество сайтов связывания белка, *например,* Vδ1. Антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) иммобилизуют или приводят в нерастворимую форму до или после конкуренции, и образец, связанный с Vδ1-цепью, отделяют от несвязанного образца, например, путем декантации (когда антитело было предварительно приведено в нерастворимую форму) или центрифугирования (когда антитело осаждали после конкурирующей реакции). Также конкурентное связывание может быть определено на основании того, изменяется ли функция при связывании или отсутствии связывания антитела с белком, *например*, ингибирует или стимулирует молекула антитела ферментативную активность, например, метки. ELISA и другие функциональные анализы можно применять, как известно в данной области техники и описано в настоящем документе.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждый из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном-мишенью. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует

связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. В альтернативном варианте два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в антигене-мишени, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Затем можно провести дополнительные стандартные эксперименты (*например*, анализ пептидных мутаций и анализ связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, с которым связывается и эталонное антитело, или причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники.

Связывание антител и фармакологические свойства антител

Полиспецифические антитела по изобретению могут обладать благоприятными связывающими и/или фармакологическими свойствами, например, как описано ниже.

В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента устанавливают путем нанесения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента прямо или опосредовано (*например*, путем захвата антителом против Fc IgG человека) на поверхность сенсора (*например*, аминного чипа высокой емкости или эквивалентный), причем мишень, связанная антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (*т. е.* Vδ1-цепь γδ TCR или EGFR), протекает над чипом для обнаружения связывания. Предпочтительно, прибор MASS-2 (который также может называться Sierra SPR-32) используют при 25°C в рабочем буфере PBS+0,02% Tween 20 со скоростью 30 мкл/мин.

В данном документе описаны и другие анализы, которые можно применять для определения функций антител. Например, полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно оценивать путем вовлечения γδ TCR, например, измерения снижения количества γδ TCR при связывании с антителом. Поверхностную экспрессию γδ TCR после применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (необязательно присутствующих на поверхности клетки) можно измерить, *например*, с помощью проточной цитометрии. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, также можно оценить путем измерения дегрануляции γδ Т-клеток. Например, экспрессию CD107a, маркера дегрануляции клеток, можно измерить после нанесения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (необязательно присутствующих на поверхности клетки) на γδ Т-клетки, *например*, с помощью проточной цитометрии. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно также оценить путем измерения активности уничтожения, опосредованной γδ Т-клетками (чтобы

проверить, оказывает ли антитело влияние на активность уничтожения γδ Т-клетками). Например, целевые клетки можно инкубировать с ***γδ*** Т-клетками в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (необязательно присутствующих на поверхности клетки). После инкубации культуру могут окрашивать красителем для оценки жизнеспособности клеток, чтобы отличить живые целевые клетки от мертвых. Долю мертвых клеток затем можно измерить, *например*, с помощью проточной цитометрии.

Кроме того, в данном документе описаны анализы, которые можно использовать для определения функции полиспецифических антител, оцениваемой в анализах, включающих смесь по меньшей мере двух разных типов клеток, включающих отдельные γδ TCR+ клетки и EGFR+ клетки. Эти анализы помогают еще больше подчеркнуть некоторые из неожиданных технических эффектов полиспецифических антител, описанных в данном документе, при этом наблюдаются дополнительные усиленные эффекты (например, усиление снижения экспрессии TCR), если функция полиспецифических антител оценивается и определяется в анализах, включающих такие смеси клеток.

Аффинность связывания (K_D) с TRDV1 человека

Вообще говоря, клоны с созревшей аффинностью (и полиспецифические антитела, полученные из таких клонов или родственные таким клонам) будут иметь аффинность к своему антигену(-ам) выше, чем исходные клоны. Например, аффинность к TRDV1 человека (SEQ ID NO: 272 или 306) будет на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 100% или по меньшей мере 500% выше, чем аффинность у исходного антитела.

Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 человека (SEQ ID NO: 272 или 306) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ, предпочтительно менее около 50 нМ.

Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть дополнительно определены как связывающиеся с TRDV1 человека (SEQ ID NO: 272 или 306) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 10 нМ, предпочтительно менее около 5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-4 или полученные из нее (например, полиспецифические антитела по изобретению с областью Fab, относящейся к линии ADT1-4 или полученные из нее, например, в результате созревания аффинности или иным образом), полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 100 нМ, предпочтительно менее около 50 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-4 или производные из нее (но исключая ADT1-4-138), полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ,

предпочтительно менее около 5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к членам линии ADT1-4 или производные из них ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-53, ADT1-4-2, ADT1-4-86, ADT1-4-112, ADT1-4-143 и/или ADT1-4-1, полиспецифические антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ, предпочтительно менее около 1 нМ.

Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 яванского макака (SEQ ID NO 308) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ, предпочтительно менее около 50 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-4 или производные из нее, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 100 нМ, предпочтительно менее около 50 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к членам линии ADT1-4 или производным из них ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-53, ADT1-4-2, ADT1-4-86, ADT1-4-112, ADT1-4-143 и/или ADT1-4-1, полиспецифические антитела или из антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 50 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, таким, относящимся к линии ADT1-4 или производным из нее, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 100 нМ, предпочтительно менее около 50 нМ, и связываться с TRDV1 яванского макака с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ, предпочтительно менее около 50 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-4 или производные из нее (но исключая ADT1-4-138), полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ и связываться с TRDV1 яванского макака с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ. Предпочтительно в этом варианте осуществления полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 5 нМ и связываться с TRDV1 яванского макака с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 50 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к членам линии ADT1-4 или производные из них ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-53, ADT1-4-2, ADT1-4-86, ADT1-4-112, ADT1-4-143 и/или ADT1-4-1, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ и связываться с TRDV1 человека с K_D менее 50 нМ. Предпочтительно в этом варианте осуществления полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 1 нМ и связываться с TRDV1 яванского макака с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 50 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-7 или полученные из нее (например, полиспецифические антитела по изобретению с областью Fab, относящейся к линии ADT1-7 или полученные из нее, например, в результате созревания аффинности или иным образом), полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ, предпочтительно менее около 5 нМ.

Таблица 6: Краткие данные по аффинности иллюстративных полиспецифических антител по изобретению к TRDV1 человека, определенные методом SPR.

Антитело	**Аффинность к Vδ1 (нМ)**
ADT1-4-2xLEE	0,416
ADT1-4-6xLEE	3,24
ADT1-4-138xLEE	55

Показано, что увеличение аффинности связывания с TRDV1 человека до уровня менее около 10 нМ приводит к полезным техническим эффектам, таким как усиление связывания (MFI), усиленное снижение уровня vδ1 TCR, усиленное повышение уровня CD107A, повышение цитотоксичности и усиление пролиферации (см. Фиг. 35L).

Аффинность связывания (K_D) с EGFR

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут связываться с EGFR с K_D менее около 150 нМ, например, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2×747, ADT1-4-2xLEE3, ADT1-4-2xLEE2 и ADT1-4-2xLEE1.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут связываться с EGFR с K_D менее около 20 нМ, например, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2×747 и ADT1-4-2xLEE3.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут связываться с EGFR с K_D менее около 10 нМ, например, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE и ADT1-4-2x747.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут связываться с EGFR с K_D менее около 5 нМ, например, ADT1-4-2xFS1-

65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE и ADT1-4-2x747.

В любом варианте осуществления EGFR может представлять собой EGFR человека.

В таблице 7 представлены сводные данные об аффинности образцов полиспецифических антител по изобретению к EGFR, определенных методом SPR.

Таблица 7: Сводные данные об аффинности к TRDV1 и EGFR

Примерные значения аффинности для указанных молекул (примечание: вариабельность в пределах анализа обычно <2 раз)			
Антитело	**Условное название**	**Аффинность к EGFR человека (нМ)**	**Аффинность к TRDV1 человека (нМ)**
ADT1-4-2/ADT3-3	ADT1-4-2xFS1-65	1,35	0,464
ADT1-4-2/ADT3-1	ADT1-4-2xFS1-67	1,37	0,378
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	1,49	0,416
ADT1-4-2/ADT3-4	ADT1-4-2×747	2,35	0,511
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2xLEE3	8,63	0,462
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2xLEE2	19,2	0,818
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2xLEE1	142	0,883
ADT1-4/ADT3-1	G04xFS1-67	1,14	152
ADT1-4-138/ADT3-2	ADT1-4-138xLEE	2,78	55
ADT1-4-6/ADT3-2	ADT1-4-6xLEE	0,655	3,24
ADT1-4	G04	-	115
ADT1-4-2	-	-	0,522

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 5 нМ и могут связываться с EGFR с K_D менее около 150 нМ, например, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2×747, ADT1-4-2xLEE3, ADT1-4-2xLEE2 и ADT1-4-2xLEE1.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 5 нМ и могут связываться с EGFR с K_D менее около 20 нМ, например, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2×747 и ADT1-4-2xLEE3.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 5 нМ и могут связываться с EGFR с K_D менее около 10 нМ, например, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE и ADT1-4-2×747.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 5 нМ и могут связываться с EGFR с K_D менее около 5 нМ, например, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE и ADT1-4-2×747.

Показано, что повышение аффинности связывания с EGFR приводит к полезным техническим эффектам, таким как усиление связывания (MFI), усиление снижения уровня vδ1 TCR, усиление дегрануляции, повышение цитотоксичности, усиление повышение уровня 4-1BB и усиление пролиферации (см. Фиг. 36). Наблюдается эффект кластеризации, при котором полиспецифические антитела по изобретению со средней и высокой аффинностью к EGFR в диапазоне от около 1 нМ до около 20 нМ (ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE3, ADT1-4-2LEE2) функционально кластеризуются вместе, тогда как молекула с более низкой аффинностью около 142 нМ (ADT1-4-2xLEE1) имеет значительно сниженную функцию и в данном анализе эквивалентна несвязывающему (с TCR) контролю. Интересно, что самая высокая аффинность связывания EGFR (менее около 2 нМ) не обеспечивает самых высоких эффектов при насыщающих концентрациях для усиления снижения уровня vδ1 TCR, усиления дегрануляции, повышения цитотоксичности, усиления повышения уровня 41BB и увеличения пролиферации. Скорее, молекулы со средней аффинностью при около 9 нМ-19 нМ (ADT1-4-2xLEE3 и ADT1-4-2xLEE2, соответственно) обеспечивают самые высокие эффекты при насыщающих концентрациях антител. Этот более оптимальный эффект, обеспечиваемый полиспецифическими антителами со средней аффинностью по настоящему изобретению, обсуждается ниже. Результаты проиллюстрированы на Фиг. 36.

Увеличение и уменьшение аффинности связывающих доменов

Полиспецифические антитела, представленные в данном документе, содержат по меньшей мере один первый связывающий домен, который связывает домен TRDV1 Vδ1 TCR, и по меньшей мере один второй связывающий домен, который связывает EGFR. Каждый связывающий домен связывается со своей мишенью с разной аффинностью связывания (Kd). Эти аффинности связывания могут быть изменены независимо друг от друга. Тонкая настройка аффинности как первого связывающего домена, так и второго связывающего домена влияет на функциональность и обеспечиваемые технические эффекты.

Аффинность первого связывающего домена (к домену TRDV1 Vδ1 TCR):

1) Увеличение аффинности первого связывающего домена (более около 10 нМ) может дополнительно усиливать эффекты этих полиспецифических антител в определенных обстоятельствах. Это удивительно, учитывая, что все встречающиеся в природе лиганды человеческого TCR Vδ1, о которых сообщалось на сегодняшний день, обладают гораздо более низкой аффинностью в диапазоне от 2,9 мкМ (MART1) до 900 мкМ (MICA).

2) Увеличение концентрации полиспецифических антител с более низкой аффинностью к TRDV1 (менее 10 нМ) может преодолеть некоторые из наблюдаемых более

низких активностей, обеспечиваемых этими молекулами (например, пролиферативные эффекты), но, что интересно, не все эффекты могут быть воспроизведены увеличением концентрации варианта с более низкой аффинностью.

3) Раковые клетки с более высоким числом копий TAA могут еще больше усиливать наблюдаемые эффекты, оказываемые этими полиспецифическими антителами; особенно варианта с более низкой аффинностью (к TRDV1).

Аффинность второго связывающего домена (к EGFR)

1) Полиспецифические антитела по данному изобретению с более высокой аффинностью к EGFR показали себя более оптимально в ряде проведенных поисковых исследований (см. Примеры 13-17).

2) Наблюдали пороговый эффект, при котором аффинность к EGFR могла находиться в диапазоне от 1 нМ до 20 нМ без существенного влияния на многие функциональные эффекты (см. Примеры 13-17). Этот кластерный или пороговый эффект, наблюдаемый для полиспецифических антител с высокой и средней аффинностью, был неожиданным.

3) Более высокое число копий TAA в линии раковых клеток может преодолеть некоторые из сниженных эффектов, наблюдаемых для полиспецифических антител с более низкой аффинностью (к EGFR), однако, опять же, только при некоторых обстоятельствах (см. Примеры 13-17).

4) Некоторые полиспецифические антитела по изобретению со средней аффинностью к EGFR (от 9 до 20 нМ) в некоторых случаях проявляли себя более эффективно, чем варианты с самой высокой аффинностью (менее 2 нМ) при насыщающих концентрациях. Например, при работе с наномолярными концентрациями антител наблюдалось, что полиспецифические антитела со средней аффинностью к EGFR (приблизительно от 8 нМ до 20 нМ) обеспечивают усиленные пролиферативные эффекты и статус активации 41BB по сравнению с обоими вариантами с самой высокой аффинностью (менее 2 нМ, предпочтительно менее 1,5 нМ) и вариантами с наименьшей аффинностью (около 142 нМ) в описанных анализах.

Повышение и понижение аффинности обеспечивает «набор инструментов» для полиспецифических антител, некоторые из которых оптимальны для сценариев с меньшим числом копий TAA, другие более оптимальны для наномолярных концентраций/диапазонов доз при определенных обстоятельствах, а некоторые более селективны только для злокачественных новообразований с большим числом копий TAA.

Аффинность к TRDV1	**Аффинность к EGFR**	**Примеры молекул**	**Потенциальная применимость**
Более высокая аффинность	Более высокая аффинность	ADT1-4-2xFS1-65 ADT1-4-2xLEE ADT1-4-2xFS1-	Лечение EGFR-положительных злокачественных новообразований; наиболее мощный формат по ряду показателей. Очень эффективен

		67 ADT1-4-2×747	против раковых клеток как с низким, так и с высоким числом копий EGFR по многим показателям.
Более высокая аффинность	Средняя аффинность	ADT1-4-2xLEE2 ADT1-4-2xLEE3	Лечение EGFR-положительных злокачественных новообразований; показано, что он кластеризуется с высокоаффинными молекулами (см. выше) по нескольким показателям, но потенциально является более мощным форматом при насыщающих концентрациях (например, оказывает пролиферативное действие на Vδ1+ клетки)
Более высокая аффинность	Более низкая аффинность	ADT1-4-2xLEE1	Лечение EGFR-положительных злокачественных новообразований. Потенциально более селективен в отношении раковых клеток с большим числом копий EGFR. Этот формат, вероятно, будет смещать распределение в сторону Vδ1+ клеток.
Более низкая аффинность	Более высокая аффинность	ADT1-4-6xLEE	Лечение EGFR-положительных злокачественных новообразований. Потенциально более селективен в отношении раковых клеток с большим числом копий EGFR. Молекулы с более низкой аффинностью эквивалентны молекулам с более высокой аффинностью по некоторым показателям при насыщении (например, оказывают пролиферативное действие на Vδ1+ клетки). Этот формат с большей вероятностью будет смещать распределение в сторону клеток, несущих EGFR.

Ингибирующие концентрации (IC50)

Снижение уровня TCR

Снижение уровня TCR можно измерить в соответствии с анализами, описанными в данном документе. Например, исследуемое антитело можно инкубировать при различных концентрациях с культурой γδ Т-клеток и измерять снижение экспрессии. При измерении уничтожения клеток (например, уничтожения клеток THP-1 или уничтожения клеток A375) γδ Т-клетки совместно культивируют с подходящей линией клеток, например, клетками THP-1 или клетками A375. Снижение уровня TCR можно измерить с помощью проточной цитометрии. Уничтожение клеток может быть достигнуто любым подходящим способом, например, проточной цитометрией.

Для первоначальных исследований снижения уровня TCR с использованием исходных антител (например. ADT1-7 и ADT1-4), анализ снижения уровня TCR включал «загрузку» антитела в положительные по Fc-гамма-рецептору клетки THP-1 (см. Пример 1, Пример 6 и таблицу 5 WO2021/032963). Таким образом, антитела в этом случае представлены на клеточной поверхности перед совместной инкубацией с γδ Т-клетками. Таким образом, такая загрузка дает максимальную возможность использовать эффекты перекрестного связывания при взаимодействии с TCR. Помимо загрузки антител на положительные по Fc-рецептору клетки, альтернативные аналогичные подходы к презентации антитела на продаваемых поверхностях могут включать предварительную инкубацию антитела на планшете (так называемое связывание с планшетом) или применение частиц-носителей для презентации антитела. Во всех таких анализах после презентации на твердой поверхности обычно исследуют и измеряют технический эффект, обеспечиваемый антителом при взаимодействии с рецептором-мишенью (в данном случае рецептором γδ Т-клеток). Презентация антител таким образом является обычным явлением, особенно при изучении эффектов взаимодействия антител с рецепторами-мишенями и комплексами иммунных клеток, таких как взаимодействие антител с мишенями, такими как CD3, CD28 и т. д.

Напротив, для антител с созревшей аффинностью по изобретению, как описано в данном документе, мы хотели проанализировать и сравнить влияние созревания аффинности в самом полном объеме, и, следовательно, мы исследовали возможности этих антител в более форматах анализа снижения уровня TCR в растворе. Оценка эффекта в растворе также может быть более значимой с физиологической точки зрения. По этим причинам и если не указано иное, во всех клеточных экспериментах по исследованию снижения уровня TCR, в которых эффекты антител с созревшей аффинностью, полиспецифических антител или их фрагментов измеряются или характеризуются и сравниваются с исходными антителами (например, см. Фиг. 35), используется формат анализа в растворе. Разница в IC50 при использовании этого более строгого анализа в растворе представлена ниже, где приведены значения EC50 снижения уровня TCR для примера исходной молекулы (ADT1-4) с использованием обоих подходов.

Снижение уровня TCR: формат анализа «с презентацией» против формата анализа

«в растворе»:

IC50 ADT1-4 (загруженные на клетки THP-1): 0,01-0,05 мкг/мл=от 0,065 нМ до 0,325 нМ

(См. Пример 1, Пример 6 и таблицу 5 в WO2021/032963)

и

ADT1-4 IC50 (анализ в растворе, добавлено в раствор)=38,28 нМ

(См. Фиг. 12)

Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ, менее около 10 нМ или менее около 1 мМ. Предпочтительно IC50 составляет менее около 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-4 или полученные из нее (например, полиспецифические антитела по изобретению с областью Fab, относящейся к линии ADT1-4 или полученные из нее, например, в результате созревания аффинности или иным образом), полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ, менее около 10 нМ или менее около 1 мМ. Предпочтительно IC50 составляет менее около 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-4 или полученные из нее (но исключая ADT1-4-138), полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ. Предпочтительно IC50 составляет менее около 0,5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к членам линии ADT1-4 или полученные из них, ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-53, ADT1-4-2, ADT1-4-86, ADT1-4-112, ADT1-4-143 и/или ADT1-4-1, антитела или их полиспецифические антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ. Предпочтительно IC50 составляет менее около 0,5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-7 или полученные из нее (например, полиспецифические антитела по изобретению с областью Fab, относящейся к линии ADT1-7 или полученные из нее, например, в результате созревания аффинности или иным образом), полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ, менее около 10 нМ или менее около 1 мМ. Предпочтительно IC50 составляет менее около 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к членам линии ADT1-7 или производным из них, ADT1-7-20 или ADT1-7-3, или полученные от них, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 5 нМ. Предпочтительно IC50

составляет менее около 10 нМ.

Уничтожение клеток

Уничтожение клеток можно измерить в соответствии с анализами, описанными в данном документе. Например, исследуемое антитело можно инкубировать в различных концентрациях с совместной культурой γδ Т-клеток и опухолевых клеток (например, клеток THP-1 или клеткам A375). Уничтожение клеток может быть измерено любым подходящим способом, например, проточной цитометрией.

Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут иметь IC50 для уничтожения клеток A375 менее около 10 нМ, менее около 5 нМ, менее около 1 нМ, менее около 0,1 нМ или менее около 0,01 нМ. Предпочтительно IC50 составляет менее около 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-4 или полученные из нее (например, полиспецифические антитела по изобретению с областью Fab, относящейся к линии ADT1-4 или полученные из нее, например, в результате созревания аффинности или иным образом), полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут иметь IC50 в отношении уничтожения клеток A375 менее около 10 нМ, менее около 5 нМ, менее около 1 нМ, менее около 1 нМ, менее около 0,1 нМ или менее около 0,01 нМ. Предпочтительно IC50 составляет менее около 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-7 или полученные из нее (например, полиспецифические антитела по изобретению с областью Fab, относящейся к линии ADT1-7 или полученные из нее, например, в результате созревания аффинности или иным образом), полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут иметь IC50 для уничтожения клеток A375 составляет менее около 5 нМ, менее около 1 нМ или менее около 0,1 нМ. Предпочтительно IC50 составляет менее около 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к членам линии ADT1-7 или производным из них, ADT1-7-20 или ADT1-7-3, или полученные из них, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут иметь IC50 в отношении уничтожения клеток A375 менее около 10 нМ, менее около 5 нМ, менее около 1 нМ или менее около 0,1 нМ. Предпочтительно IC50 составляет менее около 1 нМ.

Конечно, выгодные фармакологические профили полиспецифических антител могут быть объединены таким образом, что антитела демонстрируют улучшенные значения K_D и улучшенные значения IC50 для различных тестируемых свойств.

Например, в некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут:

связываться с TRDV1 человека (SEQ ID NO: 272 или 306) с аффинностью

связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

необязательно связываться с TRDV1 яванского макака (SEQ ID NO 308) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ);

иметь IC50 для уничтожения клеток A375 менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

В некоторых вариантах осуществления, в частности относящихся к линии ADT1-4, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут:

связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

связываться с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ);

иметь IC50 для уничтожения клеток A375 менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к линии ADT1-4 или производные из нее (но исключая ADT1-4-138), полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут:

связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ);

связываться с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ)

иметь IC50 для уничтожения клеток A375 менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

.

В некоторых вариантах осуществления, например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относящиеся к членам линии ADT1-4 или производным из них ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-53, ADT1-4-2, ADT1-4-86, ADT1-4-112, ADT1-4-143 и/или ADT1-4-1, полиспецифические антитела или из антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут:

связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ);

связываться с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 50 нМ;

иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ)

иметь IC50 для уничтожения клеток A375 менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

.

В некоторых вариантах осуществления, в частности относящихся к линии ADT1-7, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут:

связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ);

иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ);

иметь IC50 для уничтожения клеток A375 менее около 5 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ).

В некоторых вариантах осуществления, в частности относящихся к линиям ADT1-7 ADT1-7-20 или ADT1-7-3, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут:

связываться с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ);

иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 5 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ);

иметь IC50 для уничтожения клеток A375 менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

Фармакологические свойства антител, содержащих области Fab или полученных из линии ADT1-4.

Фармакологические свойства антител в отношении их связывания (через область Fab) с TRDV1 могут находиться в пределах определенных параметров. Например, антитела ADT1-4-105 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-107 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-110 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-112 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ. Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

Антитела ADT1-4-117 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-19 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

Антитела ADT1-4-21 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

Антитела ADT1-4-31 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ). Альтернативно или дополнительно такие антитела могут иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

Антитела ADT1-4-139 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-4 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ

(предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-143 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

Антитела ADT1-4-53 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

Антитела ADT1-4-173 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-2 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

Антитела ADT1-4-8 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-82 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-83 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент

идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-3 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-84 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-86 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

Антитела ADT1-4-95 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 50 нМ.

Антитела ADT1-4-1 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

Антитела ADT1-4-6 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

Антитела ADT1-4-138 или производные из них (например, их фрагменты, варианты,

имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ) и/или K_D для TRDV1 яванского макака менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ).

Фармакологические свойства антител, содержащих области Fab линии ADT1-7.

Фармакологические свойства антител в отношении их связывания (через область Fab) с TRDV1 могут находиться в пределах определенных параметров. Например, антитела ADT1-7-10 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

Антитела ADT1-7-15 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

Антитела ADT1-7-17 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

Антитела ADT1-7-18 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

Антитела ADT1-7-19 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

Антитела ADT1-7-20 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 5 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ).

Антитела ADT1-7-22 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

Антитела ADT1-7-23 или производные из них (например, их фрагменты, варианты,

имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

Антитела ADT1-7-42 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ).

Антитела ADT1-7-3 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 5 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ).

Антитела ADT1-7-61 или производные из них (например, их фрагменты, варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен или имеющие определенный процент идентичности с ними) могут иметь K_D для TRDV1 человека менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ). Такие антитела могут альтернативно или дополнительно иметь IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ).

Другие функциональные свойства антител

Антитела по настоящему изобретению имеют предпочтительный функциональный профиль. В частности, в отличие от антител к Vδ1 предшествующего уровня техники, которые направлены на истощение Vδ1 Т-клеток, антитела по настоящему изобретению применимы для активации Vδ1 Т-клеток. Хотя они могут вызывать снижение количества TCR на Т-клетках, с которыми они связываются, они не вызывают истощения Т-клеток Vδ1, а скорее стимулируют Т-клетки и, следовательно, могут быть полезны в терапевтических условиях, которые могут быть полезны при активации этого компартмента Т-клеток. Активация Т-клеток Vδ1 проявляется в подавлении TCR, изменениях маркеров активации, таких как CD25 и Ki67, и маркера дегрануляции CD107a. Активация Vδ1 Т-клеток, в свою очередь, запускает высвобождение воспалительных цитокинов, таких как INFγ и TNFα, для стимулирования иммунного лицензирования. Удивительно, но антитела, имеющие подходящую высокую аффинность к TRDV1, вызывают повышенное уничтожение Vδ1 Т-клеток, и, в отличие (например) от антител, нацеленных на CD3, возможно получение антител с высокой аффинностью без побочных эффектов, связанных с массовой активацией через CD3. В свою очередь, высокоаффинные антитела способны вызывать сильный иммуностимулирующий эффект через опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL). Это может быть достигнуто с минимальным истощением или уничтожением Vδ1 клеток. Следовательно, антитела по настоящему изобретению можно считать агонистическими антителами.

В одном варианте осуществления изобретения предложено антитело к Vδ1 или его

антигенсвязывающий фрагмент, отличающиеся тем, что они:

вызывают снижение TCR на Vδ1 Т-клетках;

не проявляют CDC или ADCC; и

не истощают Vδ1 Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающие фрагменты также стимулируют пролиферацию Vδ1 Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по данному изобретению обеспечивают одно или более из

(a) усиления эффектов снижения уровня TCR;

(b) усиления эффектов профилирования Vδ1 Т-клеток; и/или

(c) усиления эффектов активации Vδ1 Т-клеток

на Vδ1 Т-клетки, когда указанные клетки находятся в присутствии (смешанных, проксимальных или соседних) EGFR+ клеток, таких как EGFR+ раковые клетки.

Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть дополнительно определены как связывающиеся с TRDV1 человека (SEQ ID NO: 272 или 306) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 10 нМ, предпочтительно менее около 5 нМ.

Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть дополнительно определены как имеющие предпочтительные значения K_D и/или IC50, как обсуждалось выше.

Истощение Т-клеток представляет собой процесс устранения или уменьшения гибели Т-клеток. Ссылки на антитела или антигенсвязывающие фрагменты, не вызывающие истощения Vδ1 Т-клеток, относятся к истощению менее около 30% или менее около 20% (предпочтительно менее около 10%) жизнеспособной популяции Vδ1+ Т-клеток при инкубации с одним или более полиспецифическими антителами по изобретению, как описано в данном документе (например, когда антитела представлены в виде антитела IgG1), и при измерении любым подходящим способом в контролируемом исследовании (например, с помощью методологии контролируемой проточной цитометрии или с помощью других установленных контролируемых анализов, таких как описано на Фиг. 18 и Фиг. 29).

ADCC и CDC представляют собой механизмы, посредством которых может происходить истощение Т-клеток.Ссылка на антитела или антигенсвязывающие фрагменты в данном документе, не вызывающие ADCC или CDC, относится к истощению менее около 30% или менее около 20% (предпочтительно менее около 10%) жизнеспособной популяции Vδ1+ Т-клеток посредством ADCC и/или CDC при инкубации с одним или более полиспецифическими антителами по изобретению, как описано в данном документе (например, когда антитела представлены в виде антитела IgG1), при измерении любым подходящим способом (например, с помощью методологии контролируемой проточной цитометрии или с помощью других установленных контролируемых анализов, таких как описано на Фиг. 18).

В одном варианте осуществления предложено антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, отличающиеся тем, что они не индуцируют секрецию IL-17A. IL-17A (интерлейкин-17A) представляет собой проонкогенный цитокин, продуцируемый активированными Т-клетками. IL-17A может усиливать рост опухоли и ослаблять противораковый иммунный ответ. Как показано на **Фиг. 40,** антитела к vδ1 не индуцируют секрецию IL-17A при добавлении к популяции клеток, включающих лимфоциты человека, которые включают Vδ1+ клетки, тогда как антитела к CD3 для сравнения, (такие как OKT 3), в таких обстоятельствах индуцируют IL17A. Следовательно, ссылка на антитела или антигенсвязывающие фрагменты в данном документе, не индуцирующие секрецию IL-17A, относится к индукции менее около 30%, или менее около 20%, или менее около 10% секреции IL-17A, индуцированной антителами к CD3 для сравнения в таких обстоятельствах (как, например, OKT 3; антитело к CD3 для сравнения, использованное на Фиг. 63 G-I).

Модификации антител

Антитела и их фрагменты можно модифицировать другими способами с использованием известных способов. Модификации последовательностей молекул антител, описанных в данном документе, могут быть легко включены специалистами в данной области техники. Следующие примеры не являются ограничивающими.

При обнаружении антител и извлечении последовательностей из фаговых библиотек вариабельные домены желаемых антител могут быть переформатированы в полноразмерный IgG путем субклонирования. Для ускорения процесса вариабельные домены часто переносят с помощью рестрикционных ферментов. Такие уникальные сайты рестрикции могут вводить дополнительные/альтернативные аминокислоты вдали от канонической последовательности (такие канонические последовательности можно найти, например, в международной информационной системе ImMunoGeneTics [IMGT], см. http://www.imgt.org). Они могут быть введены в виде модификаций последовательностей легкой цепи каппа или лямбда.

Модификации легкой цепи

Вариабельные последовательности легкой цепи могут быть клонированы с помощью сайтов рестрикции (*например*, Nhe1-Not1) в процессе переформатирования в полноразмерный IgG. Более конкретно, на N-конце легкой цепи была введена дополнительная последовательность Ala-Ser в исходные (не созревшие по аффинности) антитела для поддержки клонирования. Предпочтительно, эту дополнительную последовательность AS затем удаляют в ходе дальнейшей разработки, чтобы получить каноническую N-концевую последовательность. Следовательно, в одном варианте осуществления описанные в данном документе антитела, содержащие легкую цепь, не содержат последовательность AS на своих N-концах, *т. е.* SEQ ID NO: 26, 118, 282-290 или 313 не содержат исходную последовательность AS. N-концы последовательностей легкой цепи антител с созревшей аффинностью уже не содержат этот мотив AS.

Для поддержания клонирования могут быть внесены дополнительные

аминокислотные изменения. Например, для исходных антител, описанных в данном документе, имеющих легкие каппа-цепи (т. е. B07, C05, E04, F07, G06, G09, B09, G10, G04 и E07), на границе вариабельного/константного домена легкой каппа-цепи была введена замена валина на аланин для поддержки клонирования при получении полноразмерных последовательностей. Это привело к модификации константного домена каппа. В частности, это приводит к тому, что константный домен начинается с RTAAAPS (от сайта рестрикции NotI). Предпочтительно, эти последовательности можно модифицировать в ходе дальнейшей разработки для получения канонических константных областей легкой каппа-цепи, которые начинаются с RTVAAPS. Такие модификации не изменяют функциональные свойства антител. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие легкую каппа-цепь, описанные в данном документе, содержат константный домен, начинающийся с последовательности RTV (например, как в SEQ ID NO: 296).

В качестве еще одного примера, для антител, описанных в данном документе (в частности, E01 и C08), на границе вариабельного домена и константного домена легкой лямбда-цепи было введено изменение последовательности лизина на аланин для поддержания клонирования. Это привело к модификации константного домена лямбда. В частности, это привело к тому, что константный домен начинается с GQPAAAPS (от сайта рестрикции NotI). Предпочтительно, эту последовательность можно модифицировать в ходе дальнейшей разработки для получения канонической константной области легкой цепи лямбда, которая начинается с GQPKAAPS. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие легкую лямбда-цепь, описанные в данном документе, содержат константный домен, начинающийся с последовательности GQPK.

Модификации тяжелой цепи

Как правило, последовательности вариабельной тяжелой цепи человека начинаются либо с основного глутамина (Q), либо с кислого глутамата (E). Однако известно, что обе такие последовательности затем превращаются в кислый аминокислотный остаток пироглутамат (pE). Превращение Q в pE приводит к изменению заряда антитела, тогда как превращение E в pE не изменяет заряд антитела. Следовательно, чтобы избежать вариабельного изменения заряда со временем, одна возможность заключается в модификации начальной последовательности тяжелой цепи с Q на E в первую очередь. Следовательно, в одном варианте осуществления тяжелая цепь антитела, описанного в данном документе, имеющего остаток Q на N-конце тяжелой цепи, может содержать модификацию Q на E на N-конце. В частности, исходный остаток любой из SEQ ID NO: 1, 106, 276-279 или 312 может быть изменен с Q на E. Следует понимать, что этот вариант осуществления также применим к любому варианту осуществления, включающему эти последовательности, например, в полноразмерные полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления может быть выгодно заменить остаток E на N-конце тяжелой цепи на остаток E. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления остаток E на N-конце любой из SEQ ID NO: 2-25, 107-

117, 273-275, 280 или 281 может быть заменен остатком Q.

Более того, С-конец константного домена IgG1 заканчивается на PGK. Однако концевой основный лизин (K, положение 447 по EU) затем часто расщепляется во время экспрессии (*например*, в клетках CHO). Это в свою очередь приводит к изменению заряда антитела посредством различной утраты С-концевого остатка лизина. Таким образом, одна возможность заключается в удалении лизина в первую очередь, что приведет к однородной и стабильной С-концевой последовательности тяжелой цепи, заканчивающейся на PG. Альтернативным вариантом является также удаление концевого G (положение 446 по EU). Следовательно, в одном варианте осуществления тяжелая цепь антитела, описанного в данном документе, имеет концевой K или концевой GK, удаленный с его С-конца.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают модифицированной эффекторной функцией за счет изменения сахаров, связанных с Asn 297 (схема нумерации EU). В еще одной указанной модификации Asn 297 не является фукозилированным или демонстрирует пониженное фукозилирование (т.е. дефукозилированное антитело или нефукозилированное антитело). Фукозилирование включает добавление к молекуле сахара фукозы, например, присоединение фукозы к N-гликанам, О-гликанам и гликолипидам. Соответственно, в дефукозилированном антителе фукоза не присоединена к углеводным цепям константной области. Антитело можно модифицировать для предотвращения или ингибирования фукозилирования антитела. Как правило, модификации гликозилирования включают экспрессию указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине, обладающей альтернативными возможностями процессинга гликозилирования, либо посредством направленной инженерии, либо путем целенаправленной или случайной селекции хозяина или клона (например, см. Пример 13). Эти и другие эффекторные модификации обсуждаются в недавних обзорах, таких как Xinhua Wang et al. (2018) Protein & Cell 9: 63-73 and by Pereira et al. (2018) mAbs 10(5): 693-711, и которые включены в данный документ.

Необязательные модификации аллотипа

При обнаружении антител могут использоваться специфические человеческие аллотипы. Необязательно антитела могут быть переключены на другие человеческие аллотипы в ходе разработки. В качестве неограничивающего примера, для цепи каппа существует три человеческих аллотипа, обозначаемых Km1, Km1,2 и Km3, которые определяют три аллели Km (используя нумерацию аллотипов): Km1 коррелирует с валином 153 (IMGT V45.1) и лейцином 191 (IMGT L101); Km1,2 коррелирует с аланином 153 (IMGT A45.1) и лейцином 191 (IMGT L101); а Km3 коррелирует с аланином 153 (IMGT A45.1) и валином 191 (IMGT V101). Необязательно таким образом можно модифицировать последовательность с одного аллотипа на другой с помощью стандартных подходов клонирования. Например, изменение L191V (IMGT L101V) преобразует аллотип Km1,2 в аллотип Km3. Для получения дополнительной информации касательно таких аллотипов см. публикацию Jefferis and Lefranc (2009) *MAbs* 1(4):332-8, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Следовательно, в одном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, содержит аминокислотные замены, полученные от другого человеческого аллотипа одного и того же гена. В дополнительном варианте осуществления антитело содержит замену L191V (IMGT L101V) в цепи каппа для преобразования с-домена из аллотипа km1,2 в аллотип km3.

Полиспецифические антитела

Антитела по настоящему изобретению являются полиспецифическими. Они могут быть биспецифическими, полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфическими для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут быть специфическими для более чем одного целевого полипептида. Таким образом, в одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают первой специфичностью связывания в отношении Vδ1 и второй специфичностью связывания в отношении EGFR.

В частности, в настоящем изобретении предложен новый класс высокоаффинных антител, которые содержат множество антигенсвязывающих сайтов («полиспецифические антитела»), включая антигенсвязывающий сайт для вариабельного домена дельта-цепи 1 TCR (Vδ1) и антигенсвязывающий сайт для EGFR.

Полиспецифические антитела по настоящему изобретению имеют формат, известный как «антитела мкАт^2» или «антитело мкАт с двумя связывающими доменами», которые представляют собой антитела, содержащие область Fc, которая была сконструирована так, чтобы содержать антигенсвязывающие петли в своем домене CH3 - эта модифицированная область Fc называется «Fcab». Антитело мкАт^2 дополнительно содержит область Fab, содержащую пару доменов VH-VL, обеспечивающую антигенсвязывающий сайт. Молекулы мкАт^2 по настоящему изобретению содержат EGFR-связывающий Fcab и vδ1-связывающий Fab.

TCE по настоящему изобретению обеспечивают несколько преимуществ по сравнению с TCE предшествующего уровня техники. В частности, TCE могут преодолеть многие проблемы, связанные с TCE предшествующего уровня техники, путем нацеливания на комплекс Т-клеточного рецептора с помощью совершенно нового и дискретного механизма. Действительно, путем специфического нацеливания на (и активации) комплекс Т-клеточного рецептора исключительно посредством связывания с эпитопом в домене TRDV1 реализуется ряд преимуществ, включая:

Взаимодействие только с субпопуляцией Т-клеток, а не всеми Т-клетками (например, взаимодействие с регуляторными Т-клетками при злокачественном новообразовании может быть нежелательным);

Взаимодействие только с субпопуляцией Т-клеток (TRDV1+ Т-клетки), которые преимущественно «присущи тканям» и присутствие которых часто положительно коррелирует с хорошим прогнозом при злокачественном новообразовании/опухоли;

Активация комплекса Т-клеточного рецептора посредством взаимодействия с TRDV1, что обеспечивает большую необязательность (например, повышение аффинности

этого связывающего домена, как в антителах по настоящему изобретению). Например, путем разработки рекомбинантных TCE, которые взаимодействуют с комплексом Т-клеточного рецептора исключительно через домен TRDV1, а не через CD3, повышенная аффинность может способствовать более предпочтительной функциональности. Например, TCE, связывающие TRDV1 с высокой аффинностью, могут активировать, но не истощать Т-клетки; и/или

Взаимодействие с комплексом TCE с помощью указанных новых средств и с помощью рекомбинантных TRDV1-связывающих доменов может привести к менее вредным эффектам и, таким образом, снизить потребность в ослаблении функциональности Fc в указанных фрагментах TCE. Обычно ожидается, что TCE с неаттенуированной функцией Fc будет индуцировать эффект антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и тем самым истощать популяцию γδ Т-клеток, распознаваемых антителом. Однако, опять же, ослабляя такую функциональность, чтобы избежать сложностей с токсичностью/безопасностью, можно также ослабить потенциально важные аспекты эффективности, например, взаимодействие с CD16+ или CD32+ или CD64+ иммунными клетками, или уменьшение периода полужизни биспецифического соединения (например, при использовании меньших фрагментов биспецифических антител, таких как BITE). Ожидается, что способы уменьшения взаимодействия FcγR и TCE (такие как использование формата IgG, предназначенного для уменьшения указанного взаимодействия) уменьшат Fc-опосредованную иммобилизацию TCE и уменьшат кластеризацию TCR путем перекрестного связывания с иммобилизованным TCE. Уменьшение потребности в ослаблении функциональности Fc в указанных фрагментах TCE затем это может обеспечить дополнительные возможности, например, позволяя TCE к TRDV1 взаимодействовать с TRDV1+ клетками через один связывающий домен, вовлекая второй тип клеток (например, раковые клетки) с помощью второго связывающего плеча и привлекая другие эффекторные клетки, такие как CD16+ или CD32+ или CD64+ иммунные клетки через функционирующий домен Fc.

Активация vδ1 TCR без истощения vδ1+ Т-клеток. Таким образом, полиспецифические антитела, описанные в данном документе, могут взаимодействовать и активировать комплекс CD3/γδ TCR и вызывать снижение его уровня и потерю поверхностной экспрессии без нежелательного истощения vδ1 Т-клеток (см. **Фиг. 29**). Это позволяет использовать полиспецифические антитела, описанные в данном документе, в качестве лекарственных препаратов для лечения заболевания или нарушения, например, для облегчения по меньшей мере одного проявления или симптома заболевания или нарушения посредством механизма, включающего активацию Vδ1+ Т-клеток, присущих крови, ткани и опухоли.

Таким образом, благодаря открытиям, описанным в данном документе, авторы настоящего изобретения создали новый класс рекомбинантных TCE. В частности, авторы настоящего изобретения открыли новый класс TCE, которые взаимодействуют с Т-клеточным рецептором через домен TRDV1, а не через другие домены в указанных

сигнальных комплексах Т-клеточного рецептора. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили новый класс TCE, которые взаимодействуют с этим комплексом через активирующий эпитоп на TRDV1 и которые могут связываться с более высокой аффинностью, потенциально не вызывая некоторых из ранее описанных вредных эффектов, связанных с взаимодействием с высокоаффинным комплексом Т-клеточного рецептора. Кроме того, этот новый класс TCE может взаимодействовать таким образом, что также может обеспечиваться функциональность Fc дикого типа, что также обеспечивает дополнительный потенциал эффективности.

Полиспецифические антитела по изобретению также могут проявлять улучшенные свойства по сравнению с эквивалентными моноспецифическими антителами. Например, полиспецифические антитела по изобретению могут также проявлять улучшенные свойства по сравнению с моноспецифическими антителами, имеющими те же антигенсвязывающие домены, что и составные части полиспецифических антител. В некоторых вариантах осуществления, например, рекомбинантное полиспецифическое антитело придает повышенную опосредованную гамма-дельта-Т-клетками цитотоксичность по отношению к пораженной клетке, экспрессирующей второй эпитоп, по сравнению с цитотоксичностью, придаваемой эквивалентным количеством указанного первого моноспецифического антитела. Полиспецифические антитела по изобретению могут также проявлять улучшенную цитотоксичность по отношению к пораженным клеткам, сохраняя при этом здоровые клетки.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело представляет собой рекомбинантное антитело человека, кодируемое открытой рамкой считывания или открытыми рамками считывания рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая экспрессируется из рекомбинантной клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело не является антителом грызуна или другим нечеловеческим антителом, полученным с помощью гибридомных технологий на основе слияния В-клеток. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело не содержит последовательность константного домена нечеловеческого IgG, обнаруженную только у видов животных, отличных от человека, такую как последовательность, обнаруженная в гибридомах, полученных из грызунов.

В предпочтительных вариантах осуществления полиспецифические антитела (соответственно, биспецифические антитела) по изобретению специфически не связываются (или напрямую не взаимодействуют) с CD3.

Ссылки в данном документе на антиген, находящийся «на» клетке, относятся к антигенам, которые экспрессируются на поверхностной клеточной мембране или связаны с (внеклеточной стороной) поверхностной клеточной мембране таких клеток.

Вторым целевым эпитопом является EGFR. EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) представляет собой ассоциированный с раком антиген и является примером рецепторной тирозинкиназы в подсемействе ErbB. EGFR экспрессируется во многих органах и играет важную роль в инициации сигналинга, который управляет поведением

эпителиальных клеток и опухолей эпителиального происхождения. Опосредованный EGFR сигналинг также участвует в контроле клеточной пролиферации, миграции, выживаемости и метастазирования путем регуляции различных клеточных путей. Как и в случае с другими рецепторными тирозинкиназами, мутации, влияющие на активность EGFR или приводящие к повышению количества EGFR, связаны со многими злокачественными новообразованиями. Фактически, генетические изменения в EGFR наблюдаются в 30% солидных опухолей и, как правило, связаны с плохим прогнозом. Нарушение сигналинга EGFR путем ингибирования связывания EGF с внеклеточным доменом или путем ингибирования активности внутриклеточной тирозинкиназы может ограничивать рост опухоли, экспрессирующей EGFR. Таким образом, ингибиторы EGFR могут быть противораковыми агентами. Действительно, некоторые опухолевые клетки зависят от сигналинга EGFR и, таким образом, обладают «онкогенная аддикция», что делает этот рецептор привлекательной мишенью для терапии. Моноклональные антитела, специфически связывающиеся с эпитопами EGFR, хорошо известны в данной области техники. Например, цетуксимаб представляет собой моноклональное антитело, специфически связывающееся с эпитопом EGFR.

Сохранение здоровых клеток

Хотя механизмы, с помощью которых γδ Т-клетки распознают антигены и различают здоровые и пораженные клетки, до конца не изучены (Ming Heng and Madalene Heng, *Antigen Recognition by γδ T-Cells.* Madame Curie Bioscience Database [Internet], Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013), тот факт, что γδ Т-клетки способны различать здоровые клетки и пораженные клетки и проявляют заметную полицитотоксичность для пораженных клеток (см. неограничивающие примеры типов клеток в таблице 8), это означает, что их можно использовать для создания улучшенных лекарственных средств с улучшенными терапевтическими окнами. Кроме того, используя такие возможности γδ Т-клеток, появляется возможность лечить болезнь, не затрагивая здоровые клетки, путем колокализации γδ Т-клеток с пораженными клетками, даже если конкретный раковый антиген, воспалительный антиген или антиген патогена либо неизвестен, либо присутствует на здоровых клетках у конкретного пациента.

Таблица 8. Пример раковых клеток, убитых полицитотоксическими Vδ1+ клетками человека

Рак молочной железы	
M-CSF7, T47D, MDA-MB-231	Mahvi et al (1993) Cancer Imm. Immunother. (1993) 37:181-186 Dutta I et al (2017). Front. Immunol. 8:776
Рак легкого	
GLC1, N592	Ferrarini et al (1996) Jn of Nat. Cancer Inst., Volume 88 (7) pp 436-441

Рак поджелудочной железы	
panc89, QGP-1, PANC-1	Maeurer et al (1996) JEM 183 (4) 1681-1696 Kitayama 1993 Clin Exp Imm 93 (3) 442-7
Рак желудочно-кишечного тракта	
HT29, HCT116, Y, SKCO1, Caco2, HCT116, Lovo, DLD-1, SW480	Wu, et al. (2015), OncoImmunology, 4:3, e992749 Mikulak, et al (2019) JCI Insight. 4(24):e125884 Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Нейробластома	
LAN1, KELLY	Fisher et al (2014) Clin Cancer Res; 20(22); 5720-32
Меланома	
A375	Cordova (2012) Plos ONE 7 (11) e49878
Рак яичника	
OV-1063, SW626	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Рак печени	
HepG2	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Рак шейки матки	
HeLa	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Рак предстательной железы	
DV145, PC-3	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Множественная миелома	
ARH77, U266	Knight et al (2012) Cytotherapy, 14:9, 1110-1118,
AML	
KG-1, KASUMI-1, OCl-AML3, U937, HL60, MV4 11, AML193, HEL, THP-1	Lorenzo et al (2019) Canc Imm Res 7 (4)
CLL	
MEC-1	Almeida et al (2016) Clin Can Res 22 (23)

В качестве одного неограничивающего примера можно привести недавние исследования полиспецифических молекул к CD3xEGFR, подчеркивающие проблемы современных или традиционных подходов. В частности, использование таких традиционных подходов может привести к менее благоприятным профилям токсичности. Это связано с тем, что, как и многие другие опухолеассоциированные антигены (TAA), антиген EGFR не только экспрессируется при таких злокачественных новообразованиях,

как рак молочной железы, колоректальный рак и рак головы и шеи, но также экспрессируется в здоровых тканях, например, эпителиальных клетках. Следовательно, применение лекарственных препаратов к CD3xEGFR, которые задействуют и совместно локализуют все Т-клетки с EGFR-положительными клетками, может привести к менее благоприятным терапевтическим окнам или терапевтическим показателям. Это связано с тем, что такие лекарственные препараты будут взаимодействовать со всеми Т-клетками, из которых подавляющее большинство в кровотоке будет представлять собой αβ Т-клетки (CD4+ положительные, CD8+ положительные и т. д.). И как только αβ Т-клетки локализованы совместно с EGFR-положительными клетками, такие обычные αβ Т-клетки демонстрируют ограниченные возможности по сохранению здоровых EGFR+ клеток и ограниченные способности убивать только пораженные EGFR+ клетки. Эти препятствия дополнительно подчеркиваются на примере токсикологических исследований на яванских макаках (только самцов). В исследованиях 2010 (doi: 10.1073/pnas.1000976107), использовались малые биспецифические молекулы к CD3xEGFR в формате BITE®. И поскольку эти молекулы демонстрируют уменьшенный период полужизни/профили системной экспозиции по сравнению с более крупными молекулами на основе антител (которые составляют >70 кДа)) можно ожидать, что такие фрагменты будут относительно хорошо переноситься. Однако даже при умеренно «более высоких» дозах путем непрерывной в/в инфузией 31 и 154 мкг/кг/день тяжелые проявления токсичности наблюдались в течение 56 ч после начала инфузии. Это привело к умерщвлению животных по соображениям гуманности. Гистопатологический анализ животных, получивших дозу, выявил проявления токсичности для печени и почек, что может быть результатом перенаправленного лизиса клеток, экспрессирующих низкие уровни EGFR в этих органах. Кроме того, у животных в обеих группах, получавших высокие дозы, наблюдались повышенные уровни воспалительных цитокинов в сыворотке (т.е. TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-5 и IL-2), которые, предположительно, высвобождаются Т-клетками, встречающимися с EGFR-положительными клетками. Гистопатологические изменения, включая инфильтрацию лимфоцитов и гибель клеток, были отмечены во всех тканях, которые, как известно, экспрессируют EGFR, т.е. в слюнных железах, печени, желудке, тонком кишечнике, толстой кишке, прямой кишке, почках, надпочечниках, мочеточнике, мочевом пузыре, предстательной железе и придатках яичек.

Вместо использования таких традиционных подходов в настоящем документе предложены полиспецифические антитела, в которых по меньшей мере один первый связывающий домен способен специфически связывать Vδ1+ клетки, и по меньшей мере один второй связывающий домен способен специфически связываться с EGFR, мишенью, присутствующей на пораженных тканях и клетках. Таким образом, использование таких полиспецифических антител может привести к совместной локализации Vδ1+ клеток с пораженными клетками, экспрессирующими вторую мишень. Кроме того, учитывая, что такие ассоциированные с заболеванием мишени часто не являются на 100% специфичными для заболевания, такой подход к нацеливанию и колокализации эффекторных Vδ1+ клеток

может быть более предпочтительным по сравнению с обычными подходами. Это связано с тем, что эффекторные Vδ1+ клетки могут быть способны распознавать стрессовые паттерны в пораженных или инфицированных клетках и, таким образом, способны селективно убивать пораженные клетки, сохраняя при этом здоровые клетки, также экспрессирующие ту же мишень.

Поэтому представленные в данном документе полиспецифические антитела способны воздействовать на TCR vδ1 клеток, но полная активация происходит только в присутствии опухолевых клеток. Полное взаимодействие представленных в данное время антител с TCR приводит к частичному снижению количества, и считается, что vδ1 клетки, связанные с представленными в настоящее время антителами, полностью активируются и становятся цитотоксическими только в присутствии стрессированных клеток, таких как опухолевые клетки. Это показано, например, в Примере 18 и на Фиг. 40. Это представляет собой еще одно жизненно важное преимущество подхода, представленного в данном документе, с точки зрения безопасности, поскольку нецелевая цитотоксичность снижается, а полный потенциал полиспецифических антител для активации vδ1 клеток раскрывается только в присутствии опухолевых клеток, то есть здоровые клетки (даже здоровые клетки, экспрессирующие EGFR) сохраняются.

Считается, что один из механизмов, лежащих в основе способности γδ Т-клеток обнаруживать сигналы стресса на опухолевых клетках, связан с NCR (рецепторами естественной цитотоксичности), которые они экспрессируют. NCR способны взаимодействовать с лигандами NCR на опухолевых клетках. Таким образом, можно использовать двойной механизм активации, при котором γδ Т-клетки активируются посредством стимуляции TCR, в том числе посредством NCR, которые могут распознать опухолевые клетки, чтобы обеспечить полную активацию и цитотоксичность.

Это контрастирует со стимуляцией αß Т-клеток, например, через CD3, например, когда вся стимуляция осуществляется через TCR. Таким образом, такие клетки почти не различают здоровые или трансформированные клетки, потому что они не имеют таких механизмов, как распознавание опухолевых клеток, независимое от презентации антигена, например, посредством NCR. Следовательно, если антитела к CD3 содержат Fc, они будут привлекать другие иммунные клетки, что может вызвать каскад непредсказуемых и желательных событий, таких как цитокиновый шторм, истощение и даже сверхактивация иммунных клеток, что приводит, например, к тому, что NK-клетки убивают Т-клетки и т. д. В настоящем подходе стимуляция γδ Т-клеток представленными в настоящее время полиспецифическими антителами не вызывает таких проблем, поскольку γδ Т-клетки способны различать здоровые клетки и опухолевые клетки, в том числе с помощью своего механизма распознавания NCR, и поэтому селективно убивают стрессированные клетки, такие как раковые клетки или вирус-инфицированные клетки, благодаря этой специфичности для пораженных клеток

Второй целевой эпитоп может находиться на другой клетке, включая другую Т-клетку, В-клетку, опухолевую клетку, аутоиммунную клетку ткани или инфицированную

вирусом клетку.

Разные полиспецифические форматы, созданные на основе полиспецифических антител, были описаны ранее и обычно конструируются эмпирическим путем из составных связывающих частей. Как правило, после конструирования эффективность таких полиспецифических или связывающих множество мишеней форматов, как описано в данном документе, можно измерить в одной или более из вышеупомянутых модельных систем (гибель клеток, пролиферация клеток, модели, сохранение здоровых клеток/специфические для пораженных клеток и т. д.). Необязательно их также сравнивают с указанными составными частями и другими молекулами сравнения.

Несмотря на то, что этот подход не ограничивается этим подходом, в целом при конструировании антител в виде полиспецифических антител по данному изобретению модули связывающего домена для каждой мишени (первой и второй) создаются из связывающих модулей Fab и Fcab, которые объединяются в полноразмерные антитела. Модификацию и создание полиспецифических антител и желаемых связывающих доменов Fab и Fcab можно осуществлять с помощью обычной методологии молекулярной биологии, хорошо известной в данной области техники. В качестве неограничивающих примеров можно использовать подходы на основе олигонуклеотидов с помощью ПЦР-амплификации или без нее для создания синтетических последовательностей ДНК, кодирующих желаемый домен CH3 и/или другие элементы желаемого биспецифического антитела. Затем их можно корректно клонировать в открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую исходную тяжелую цепь антитела (например, описанную в данном документе), с помощью методик субклонирования на основе ферментов рестрикции, таких как замена исходной последовательности CH3 желаемой модифицированной последовательностью CH3. И наоборот, можно использовать подходы на основе олигонуклеотидов с помощью ПЦР-амплификации или без нее для создания элементов ОРС ДНК, предназначенных для кодирования желаемой области VH (например, описанной в данном документе), а затем субклонировать или включать ее в уже существующую кассету ОРС тяжелой цепи, уже экспрессирующую желаемую область, кодирующую домен CH3. Альтернативно, более крупные элементы или даже вся ОРС, кодирующая тяжелую цепь антитела, могут быть созданы de novo из исходной последовательности in silico с помощью методов синтеза олигонуклеотидов и/или ПЦР для создания всей конечной ОРС, кодирующей предпочтительную полноразмерную тяжелую цепь, содержащую связывающее плечо VH и модифицированный домен CH3 полиспецифического антитела, такого как описано в данном документе. Затем ее можно экспрессировать, выделить и очистить в сочетании с предпочтительной родственной легкой каппа-цепью, такой как описанная в данном документе, с целью создания конечного очищенного полиспецифического антитела, которое связывает домен TRDV1 человеческого Vδ1 TCR и функционально связано с модифицированными связывающими доменами CH3, которые связывают EGFR человека. Примечательно, что полиспецифические антитела, содержащие по меньшей мере один (первый) связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, как описано в данном

документе, дополнительно усиливаются, когда для указанный первый связывающий домен преобразуют в формат полиспецифического антитела, содержащего по меньшей мере один второй связывающий домен к EGFR.

Полиспецифические антитела - неограничивающие примеры:

Чтобы продемонстрировать применимость подхода, была сконструирована серия неограничивающих примеров полиспецифических антител. Эти полиспецифические антитела содержали по меньшей мере один (первый) связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, и по меньшей мере один (второй) связывающий домен, нацеленный на EGFR:

Полиспецифическое антитело к Vδ1-EGFR (LEE)

В этом аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и область Fc содержит EGFR-связывающий сайт. Область Fab конкретно содержит домен VH и родственный домен VL. Область Fc содержит связывающий домен внутри константного домена тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3), в частности домен CH3.

SEQ ID NO:	**Описание**
389	ADT1-4-2 x LEE (LAGA)
391	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля к EGFR (LEE) (LAGA)
392	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля к EGFR (LEE) (IgG1 дт)
400	ADT1-4-2 x LEE (дт)
432	HC ADT1-4-2 (LAGA) LEE к EGFR
436	HC ADT1-4-2 (дт) LEE к EGFR
562	Связывающий модуль CH3 LEE к EGFR
523	Замены AB LEE к EGFR остатки с 359 по 362 (нумерация EU)
511	Замены CD LEE к EGFR остатки с 384 по 386 (нумерация EU)
512	Замены EF LEE к EGFR остатки с 413 по 419 (нумерация EU)
524	петля AB LEE к EGFR остатки с 355 по 362 (нумерация EU)
514	петля CD LEE к EGFR остатки с 383 по 391 (нумерация EU)
515	петля EF LEE к EGFR остатки с 413 по 422 (нумерация EU)

563	IgG1 дт CH3 (остатки от 341 до 446 (нумерация EU)

В этом аспекте EGFR-связывающий сайт может быть обеспечен доменом CH3 IgG1, в котором остатки с 359 по 362 (нумерация EU) содержат EEGP (SEQ ID NO: 523), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) содержат TYG (SEQ ID NO: 511), а остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512).

В этом аспекте остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514), и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515).

В этом аспекте домен CH3 IgG1 может содержать следующие мутации (нумерация EU). В петле AB могут присутствовать следующие мутации: T359E.K360E.N361G.Q362P. В петле CD могут присутствовать следующие мутации: N384T.G385Y.Q386G. В петле EF могут присутствовать следующие мутации: D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K.

В этом аспекте аминокислотная последовательность домена CH3 может иметь по меньшей мере 90% идентичности, или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 562.

В этом аспекте константный домен тяжелой цепи может содержать SEQ ID NO: 391 или SEQ ID NO: 392.

В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 389; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 432. В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 400; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 436.

В этом аспекте область Fab может представлять собой любую из областей Fab, описанных в данном документе (см., например, таблицу 9). В частности, область Fab по этому аспекту может содержать VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 68, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности. SEQ ID NO: 79, 80 и 95, соответственно. Область Fab по этому аспекту может содержать VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления этого аспекта полиспецифическое антитело содержит область Fab, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc, включающую домен CH3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 562. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут содержать дополнительный остаток лизина (K) непосредственно на C-конце последовательности домена CH3 (K447, нумерация EU). В некоторых вариантах реализации полиспецифические антитела по изобретению могут иметь удаленный концевой остаток глицина (G) непосредственно наC-конце последовательности домена CH3 (G446, нумерация EU).

Таблица 9. LEE - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 vδ1-EGFR, имеющих CDR антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ

ID NO

Область Fab							Область Fc		
	VH			VL			Петля AB содержит	Петля CD содержит	Петля EF содержит
Получено из антитела	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3			
Исходное ADT1-4	51	53	54	79	80	81	Остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP SEQ ID NO: 523	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG SEQ ID NO:511	Остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
Исходное ADT1-7	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Настоящее изобретение в явном виде включает антитело, имеющее последовательности каждой строки приведенной выше таблицы. Например, настоящее

изобретение включает полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит специфический сайт, специфичный для эпитопа вариабельном домене дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR), при этом область Fab содержит VHCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 51, VHCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 53, VHCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 68, VLCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 79, VLCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 80, и VLCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 95; и область Fc содержит EGFR-связывающий сайт, причем EGFR-связывающий сайт представлен доменом CH3, в котором остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают SEQ ID NO: 523, остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают SEQ ID NO: 511 и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SEQ ID NO: 512. Каждая строка приведенной выше таблицы описывается таким же образом. Такие антитела представляют собой человеческие антитела IgG1. Следовательно, человеческие антитела IgG1 могут содержать домен CH3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 562.

Таблица 10. LEE - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 vδ1-EGFR, имеющих вариабельные области антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab			**Область Fc**		
Получено из антитела	**VH**	**VL**	**Петля AB содержит**	**Петля CD содержит**	**Петля EF содержит**
Исходное ADT1-4	1	26	Остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP SEQ ID NO: 523	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG SEQ ID NO:511	Остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			

ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
Исходное ADT1-7	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Настоящее изобретение в явном виде включает антитело, имеющее последовательности каждой строки приведенной выше таблицы. Например, настоящее изобретение включает полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит специфический сайт, специфичный для эпитопа вариабельном домене дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR), при этом область Fab содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 15, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит EGFR-связывающий домен, при этом EGFR-связывающий сайт представлен доменом CH3, в котором остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают SEQ ID NO: 523, остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают SEQ ID NO: 511 и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SEQ ID NO: 512. Каждая строка приведенной выше таблицы описывается таким же образом. Такие антитела представляют собой человеческие антитела IgG1. Следовательно, человеческие антитела IgG1 могут содержать домен CH3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 562.

Полиспецифическое антитело к Vδ1-EGFR (LEE1)

В этом аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело, содержащее

область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и область Fc содержит EGFR-связывающий сайт. Область Fab конкретно содержит домен VH и родственный домен VL. Область Fc содержит связывающий домен внутри константного домена тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3), в частности домен CH3.

SEQ ID NO:	**Описание**
504	ADT1-4-2 x LEE1 (LAGA)
505	ADT1-4-2 x LEE1 (дт)
506	HC ADT1-4-2 LEE1 к EGFR (LAGA)
507	HC ADT1-4-2 LEE1 к EGFR (дт)
508	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля LEE1 к EGFR (LAGA)
509	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля LEE1 к EGFR (дт)
510	Связывающий модуль CH3 LEE1 к EGFR
511	Замены CD LEE1 к EGFR остатки с 384 по 386 (нумерация EU)
512	Замены EF LEE1 к EGFR остатки с 413 по 419 (нумерация EU)
513	Петля AB LEE1 к EGFR (ДТ) остатки с 355 по 362 (нумерация EU)
514	Петля CD LEE1 к EGFR остатки с 383 по 391 (нумерация EU)
515	Петля EF LEE1 к EGFR остатки с 413 по 422 (нумерация EU)

В этом аспекте EGFR-связывающий сайт может быть обеспечен доменом CH3 IgG1, в котором остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511, а остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512).

В этом аспекте остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELTKNQ (SEQ ID NO: 513, остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514) и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515).

В этом аспекте домен CH3 IgG1 может содержать следующие мутации (нумерация EU). Петля AB может быть дикого типа (без мутаций). В петле CD могут присутствовать следующие мутации: N384T.G385Y.Q386G. В петле EF могут присутствовать следующие мутации: D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K.

В этом аспекте аминокислотная последовательность домена CH3 может иметь по меньшей мере 90% идентичности, или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 510.

В этом аспекте константный домен тяжелой цепи может содержать SEQ ID NO: 508 или SEQ ID NO: 509.

В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 504; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 506. В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 505; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 507.

В этом аспекте область Fab может представлять собой любую из областей Fab, описанных в данном документе (см., например, таблицу 11). В частности, область Fab по этому аспекту может содержать VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 68, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности. SEQ ID NO: 79, 80 и 95, соответственно. Область Fab по этому аспекту может содержать VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления этого аспекта полиспецифическое антитело содержит область Fab, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc, содержащую домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 510. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут содержать дополнительный остаток лизина (K) непосредственно на C-конце последовательности домена CH3 (K447, нумерация EU). В некоторых вариантах реализации полиспецифические антитела по изобретению могут иметь удаленный концевой остаток глицина (G) непосредственно наC-конце последовательности домена CH3 (G446, нумерация EU).

Таблица 11. LEE1-- Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих CDR антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab							**Область Fc**		
	VH			**VL**					
Получено из антитела	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	51	53	54	79	80	81	Остатки с 355 по 362 (нумерация EU) включают RDELTKNQ SEQ ID NO: 513	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG SEQ ID NO:511	Остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRW YK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			

ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
Исходное ADT1-7	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Таблица 12. LEE1 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих CDR антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab			**Область Fc**		
Получено из антитела	**VH**	**VL**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	1	26	Остатки с 355 по 362 (нумерация EU) включают RDELTKNQ SEQ ID NO: 513	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG SEQ ID NO:511	Остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			

ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
Исходное ADT1-7	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Полиспецифическое антитело к Vδ1-EGFR (LEE2)

В этом аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и область Fc содержит EGFR-связывающий сайт. Область Fab конкретно содержит домен VH и родственный домен VL. Область Fc содержит связывающий домен внутри константного домена тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3), в частности домен CH3.

SEQ ID NO:	Описание
516	ADT1-4-2 x LEE2 (LAGA)
517	ADT1-4-2 x LEE2 (дт)
518	HC ADT1-4-2 LEE2 к EGFR (LAGA)
519	HC ADT1-4-2 LEE2 к EGFR (дт)
520	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля LEE2 к EGFR (LAGA)
521	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля LEE2 к EGFR (дт)
522	Связывающий модуль CH3 LEE2 к EGFR
523	Замены AB LEE2 к EGFR остатки с 359 по 362 (нумерация EU)
512	Замены EF LEE2 к EGFR остатки с 413 по 419 (нумерация EU)
524	Петля AB LEE2 к EGFR остатки с 355 по 362 (нумерация EU)
525	Петля CD LEE2 к EGFR (ДТ) остатки с 383 по 391 (нумерация EU)
515	Петля EF LEE2 к EGFR остатки с 413 по 422 (нумерация EU)

В этом аспекте EGFR-связывающий сайт может быть обеспечен доменом CH3 IgG1, в котором остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP (SEQ ID NO: 523), а остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512).

В этом аспекте остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую SNGQPENNY (SEQ ID NO: 525) и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515).

В этом аспекте домен CH3 IgG1 может содержать следующие мутации (нумерация EU). В петле AB могут присутствовать следующие мутации: T359E.K360E.N361G.Q362P. Петля CD может быть дикого типа (без мутаций). В петле EF могут присутствовать следующие мутации: D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K.

В этом аспекте аминокислотная последовательность домена CH3 может иметь по меньшей мере 90% идентичности, или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 522.

В этом аспекте константный домен тяжелой цепи может содержать SEQ ID NO: 520 или SEQ ID NO: 521. В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 516; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 518. В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 517; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 519.

В этом аспекте область Fab может представлять собой любую из областей Fab,

описанных в данном документе (см., например, таблицу 13). В частности, область Fab по этому аспекту может содержать VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 68, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности. SEQ ID NO: 79, 80 и 95, соответственно. Область Fab по этому аспекту может содержать VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления этого аспекта полиспецифическое антитело содержит область Fab, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc, содержащую домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 522. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут содержать дополнительный остаток лизина (K) непосредственно на C-конце последовательности домена CH3 (K447, нумерация EU). В некоторых вариантах реализации полиспецифические антитела по изобретению могут иметь удаленный концевой остаток глицина (G) непосредственно наC-конце последовательности домена CH3 (G446, нумерация EU).

Таблица 13. LEE2 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих CDR антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab							**Область Fc**		
	VH			**VL**					
Получено из антитела	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	51	53	54	79	80	81	Остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP SEQ ID NO: 523	Дикий тип остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, включают SNGQPENNY SEQ ID NO: 525	Остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			

ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
Исходное ADT1-7	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Таблица 14. LEE2 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих вариабельные области антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab			**Область Fc**		
Получено из антитела	**VH**	**VL**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	1	26	Остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP SEQ ID NO: 523	Дикий тип остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, включают SNGQPENNY SEQ ID NO: 525	Остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			

ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
Исходное ADT1-7	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Полиспецифическое антитело к Vδ1-EGFR (LEE3)

В этом аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и область Fc содержит EGFR-связывающий сайт. Область Fab конкретно содержит домен VH и родственный домен VL. Область Fc содержит связывающий домен внутри константного домена тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3), в частности домен CH3.

SEQ ID NO:	**Описание**
526	ADT1-4-2 x LEE3 (LAGA)
527	ADT1-4-2 x LEE3 (дт)
528	HC ADT1-4-2 LEE3 к EGFR (LAGA)
529	HC ADT1-4-2 LEE3 к EGFR (дт)
530	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля LEE3 к EGFR (LAGA)

531	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля к LEE3 EGFR (дт)
532	Связывающий модуль CH3 LEE3 к EGFR
523	Замены AB LEE3 к EGFR остатки с 359 по 362 (нумерация EU)
511	Замены CD LEE3 к EGFR остатки с 384 по 386 (нумерация EU)
533	Замены EF LEE3 к EGFR остатки с 413 по 415 (нумерация EU)
524	Петля AB LEE3 к EGFR остатки с 355 по 362 (нумерация EU)
514	Петля CD LEE3 к EGFR остатки с 383 по 391 (нумерация EU)
534	Петля EF LEE3 к EGFR остатки с 413 по 422 (нумерация EU)

В этом аспекте EGFR-связывающий сайт может быть обеспечен доменом CH3 IgG1, в котором остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP (SEQ ID NO: 523), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), а остатки с 413 по 415 (нумерация EU) включают SYW (SEQ ID NO: 533).

В этом аспекте остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514), и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWQQGNV (SEQ ID NO: 534).

В этом аспекте домен CH3 IgG1 может содержать следующие мутации (нумерация EU). В петле AB могут присутствовать следующие мутации: T359E.K360E.N361G.Q362P. В петле CD могут присутствовать следующие мутации: N384T.G385Y.Q386G. В петле EF могут присутствовать следующие мутации D413S.K414Y.S415W.

В этом аспекте аминокислотная последовательность домена CH3 может иметь по меньшей мере 90% идентичности, или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 532.

В этом аспекте константный домен тяжелой цепи может содержать SEQ ID NO: 530 или SEQ ID NO: 531.

В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 526; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 528. В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 527; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 529.

В этом аспекте область Fab может представлять собой любую из областей Fab, описанных в данном документе (см., например, таблицу 15). В частности, область Fab по этому аспекту может содержать VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 68, соответственно, и VLCDR1,

VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности. SEQ ID NO: 79, 80 и 95, соответственно. Область Fab по этому аспекту может содержать VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления этого аспекта полиспецифическое антитело содержит область Fab, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc, содержащую домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 532. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут содержать дополнительный остаток лизина (K) непосредственно на C-конце последовательности домена CH3 (K447, нумерация EU). В некоторых вариантах реализации полиспецифические антитела по изобретению могут иметь удаленный концевой остаток глицина (G) непосредственно на C-конце последовательности домена CH3 (G446, нумерация EU).

Таблица 15. LEE3 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих CDR антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab							**Область Fc**		
	VH			**VL**					
Получено из антитела	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	51	53	54	79	80	81	Остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP SEQ ID NO: 523	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG SEQ ID NO:511	Остатки с 413 по 415 (нумерация EU) включают SYW SEQ ID NO: 533
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			

ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
Исходное ADT1-7	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Таблица 16. LEE3 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих вариабельные области антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab			**Область Fc**		
Получено из антитела	**VH**	**VL**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	1	26	Остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP SEQ ID NO: 523	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG SEQ ID NO:511	Остатки с 413 по 415 (нумерация EU) включают SYW SEQ ID NO: 533
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			

ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
Исходное ADT1-7	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Полиспецифическое антитело к Vδ1-EGFR (FS1-67)

В этом аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и область Fc содержит EGFR-связывающий сайт. Область Fab конкретно содержит домен VH и родственный домен VL. Область Fc содержит связывающий домен внутри константного домена тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3), в частности домен CH3.

SEQ ID NO:	**Описание**
377	Антитело к куриному лизоциму x FS1-67 (EGFR-связывающий домен)
378	Исходное C08 x FS1-67 (LAGA)
379	Исходное G04 x FS1-67 (LAGA)
380	Исходное E07 x FS1-67 (LAGA)
385	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля (FS-167) к EGFR (IgG1 дт)
386	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля (FS-167) к EGFR (LAGA)
388	ADT1-4-2 x FS1-67 к EGFR (LAGA)

399	ADT1-4-2 x FS1-67 к EGFR (дт)
426	HC C08 (LAGA) FS1-67 к EGFR
427	HC E07 (LAGA) FS1-67 к EGFR
431	HC ADT1-4-2 (LAGA) FS1-67 к EGFR
435	HC ADT1-4-2 (дт) FS1-67 к EGFR
437	HC G04 (LAGA) FS1-67 к EGFR
559	Связывающий модуль CH3 FS1-67 к EGFR
560	Замены AB FS1-67 к EGFR остатки с 358 по 362 (нумерация EU)
511	Замены CD FS1-67 к EGFR остатки с 384 по 386 (нумерация EU)
512	Замены EF FS1-67 к EGFR остатки с 413 по 419 (нумерация EU)
561	Петля AB FS1-67 к EGFR остатки с 355 по 362 (нумерация EU)
514	Петля CD FS1-67 к EGFR остатки с 383 по 391 (нумерация EU)
515	Петля EF FS1-67 к EGFR остатки с 413 по 422 (нумерация EU)

В этом аспекте EGFR-связывающий сайт может быть обеспечен доменом CH3 IgG1, в котором остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TDDGP (SEQ ID NO: 560), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512).

В этом аспекте остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDETDDGP (SEQ ID NO: 561), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514), и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515).

В этом аспекте домен CH3 IgG1 может содержать следующие мутации (нумерация EU). В петле AB могут присутствовать следующие мутации: L358T.T359D.K360D.N361G.Q362P. В петле CD могут присутствовать следующие мутации: N384T.G385Y.Q386G. В петле EF могут присутствовать следующие мутации: D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K.

В этом аспекте аминокислотная последовательность домена CH3 может иметь по меньшей мере 90% идентичности, или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 559.

В этом аспекте константный домен тяжелой цепи может содержать SEQ ID NO: 385 или SEQ ID NO: 386.

В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 388; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 431. В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 399; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 435.

В этом аспекте область Fab может представлять собой любую из областей Fab, описанных в данном документе (см., например, таблицу 17). В частности, область Fab по этому аспекту может содержать VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 68, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности. SEQ ID NO: 79, 80 и 95, соответственно. Область Fab по этому аспекту может содержать VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления этого аспекта полиспецифическое антитело содержит область Fab, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc, содержащую домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут содержать дополнительный остаток лизина (K) непосредственно на C-конце последовательности домена CH3 (K447, нумерация EU). В некоторых вариантах реализации полиспецифические антитела по изобретению могут иметь удаленный концевой остаток глицина (G) непосредственно наC-конце последовательности домена CH3 (G446, нумерация EU).

В одном варианте полиспецифическое антитело по изобретению не является ADT1-4xFS1-67.

Область Fab							**Область Fc**		
	VH			**VL**					
Получено из антитела	**CDR 1**	**CDR 2**	**CDR 3**	**CDR 1**	**CDR 2**	**CDR 3**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	51	53	54	79	80	81	Остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TDDGP SEQ ID NO: 560	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG SEQ ID NO:511	Остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			

ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
Исходное ADT1-7	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Таблица 17. FS1-67 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих CDR антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Таблица 18. FS1-67 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 vδ1-EGFR, имеющих вариабельные области антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab			**Область Fc**		
Получено из антитела	**VH**	**VL**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	1	26	Остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TDDGP SEQ ID NO: 560	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG SEQ ID NO:511	Остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			

ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
Исходное ADT1-7	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Полиспецифическое антитело к Vδ1-EGFR (FS1-65)

В этом аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и область Fc содержит EGFR-связывающий сайт. Область Fab конкретно содержит домен VH и родственный домен VL. Область Fc содержит связывающий домен внутри константного домена тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3), в частности домен CH3.

SEQ ID NO:	**Описание**
535	ADT1-4-2 x FS1-65 (LAGA)

536	ADT1-4-2 x FS1-65 (дт)
537	HC ADT1-4-2 FS1-65 к EGFR (LAGA)
538	HC ADT1-4-2 FS1-65 к EGFR (дт)
539	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля FS1-65 к EGFR (LAGA)
540	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля FS1-65 к EGFR (дт)
541	Связывающий модуль CH3 FS1-65 к EGFR
542	Замены AB FS1-65 к EGFR остатки с 358 по 362 **(включая 361.1)** (нумерация EU)
511	Замены CD FS1-65 к EGFR остатки с 384 по 386 (нумерация EU)
543	Замены EF FS1-65 к EGFR остатки с 413 по 419 (нумерация EU)
544	Петля AB FS1-65 к EGFR остатки с 355 по 362 (включая 361.1) (нумерация EU)
514	Петля CD FS1-65 к EGFR остатки с 383 по 391 (нумерация EU)
545	Петля EF FS1-65 к EGFR остатки с 413 по 422 (нумерация EU)

В этом аспекте EGFR-связывающий сайт может быть обеспечен доменом CH3 IgG1, в котором остатки с 358 по 361, 361.1 и 362 (нумерация EU) включают LDEGGP (SEQ ID NO: 542), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 543). При этом остаток 361.1 обозначает дополнительный остаток между остатками 361 и 362 (нумерация EU).

В этом аспекте остатки с 355 по 362, включая остаток 361.1 (нумерация EU), образуют петлю AB, содержащую RDELDEGGP (SEQ ID NO: 544), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514), и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWVKGNV (SEQ ID NO: 545). При этом остаток 361.1 обозначает дополнительный остаток между остатками 361 и 362 (нумерация EU).

В этом аспекте домен CH3 IgG1 может содержать следующие мутации (нумерация EU). В петле AB могут присутствовать следующие мутации: T359D.K360E.N361G.361-1G.Q362P. В петле CD могут присутствовать следующие мутации: N384K.G385F.Q386G. В петле EF могут присутствовать следующие мутации: D413S.K414Y.S415W.Q418V.Q419K. При этом остаток 361-1 обозначает дополнительный остаток между остатками 361 и 362 (нумерация EU).

В этом аспекте аминокислотная последовательность домена CH3 может иметь по меньшей мере 90% идентичности, или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с

SEQ ID NO: 541.

В этом аспекте константный домен тяжелой цепи может содержать SEQ ID NO: 539 или SEQ ID NO: 540.

В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 535; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 537. В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 536; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 538.

В этом аспекте область Fab может представлять собой любую из областей Fab, описанных в данном документе (см., например, таблицу 19). В частности, область Fab по этому аспекту может содержать VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 68, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности. SEQ ID NO: 79, 80 и 95, соответственно. Область Fab по этому аспекту может содержать VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления этого аспекта полиспецифическое антитело содержит область Fab, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc, содержащую домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 541. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут содержать дополнительный остаток лизина (K) непосредственно на C-конце последовательности домена CH3 (K447, нумерация EU). В некоторых вариантах реализации полиспецифические антитела по изобретению могут иметь удаленный концевой остаток глицина (G) непосредственно на C-конце последовательности домена CH3 (G446, нумерация EU).

Таблица 19. FS1-65 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих CDR антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab							**Область Fc**		
	VH			**VL**					
Получено из антитела	**CDR 1**	**CDR 2**	**CDR 3**	**CDR 1**	**CDR 2**	**CDR3**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	51	53	54	79	80	81	Остатки с 358 по 361, 361.1 и 362 (нумерация EU) включают LDEGGP SEQ ID NO: 542	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG SEQ ID NO:511	Остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWVK SEQ ID NO: 543
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			

ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
Исходное ADT1-7	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Таблица 20. FS1-65 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих вариабельные области антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab			**Область Fc**		
Получено из антитела	**VH**	**VL**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	1	26	Остатки с 358 по 361, 361.1 и 362 (нумерация EU) включают LDEGGP SEQ ID NO: 542	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG SEQ ID NO:511	Остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWVK SEQ ID NO: 543
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			

ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
Исходное ADT1-7	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Полиспецифическое антитело к Vδ1-EGFR (747)

В этом аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и область Fc содержит EGFR-связывающий сайт. Область Fab конкретно содержит домен VH и родственный домен VL. Область Fc содержит связывающий домен внутри константного домена тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3), в частности домен CH3.

SEQ ID NO:	**Описание**
546	ADT1-4-2×747 (LAGA)

547	ADT1-4-2×747 (дт)
548	HC ADT1-4-2 747 к EGFR (LAGA)
549	HC ADT1-4-2 747 к EGFR (дт)
550	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля 747 к EGFR (LAGA)
551	CH1-CH2-CH3 связывающего модуля 747 к EGFR (дт)
552	Связывающий модуль CH3 747 - Плюс дополнительная мутация в каркасной области A378V
553	Замены AB 747 к EGFR остатки с 358 по 362 (нумерация EU)
554	Замены CD 747 к EGFR остатки с 384 по 386 (нумерация EU)
555	Замены EF 747 к EGFR остатки с 413 по 421 (нумерация EU)
556	Петля AB 747 к EGFR остатки с 355 по 362 (нумерация EU)
557	Петля CD 747 к EGFR остатки с 383 по 391 (нумерация EU)
558	Петля EF 747 к EGFR остатки с 413 по 422 (нумерация EU)

В этом аспекте EGFR-связывающий сайт может быть обеспечен доменом CH3 IgG1, в котором остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TESGP (SEQ ID NO: 553), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают KFG (SEQ ID NO: 554), остатки с 413 по 421 (нумерация EU) включают SNLRWTKGH (SEQ ID NO: 555), а остаток 378 представляет собой валин.

В этом аспекте остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDETESGP (SEQ ID NO: 556), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую SKFGPENNY (SEQ ID NO: 557), остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SNLRWTKGHV (SEQ ID NO: 558), а остаток 378 представляет собой валин.

В этом аспекте домен CH3 IgG1 может содержать следующие мутации (нумерация EU). В петле AB могут присутствовать следующие мутации: L358T.T359E.K360S.N361G.Q362P. В петле CD могут присутствовать следующие мутации: N384K.G385F.Q386G. В петле EF могут присутствовать следующие мутации: D413S.K414N.S415L.Q418T.Q419K.N421H. Также присутствует следующая мутация A378V.

В этом аспекте аминокислотная последовательность домена CH3 может иметь по меньшей мере 90% идентичности, или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 552.

В этом аспекте константный домен тяжелой цепи может содержать SEQ ID NO: 550 или SEQ ID NO: 551.

В этом аспекте полиспецифическое антитело может содержать SEQ ID NO: 546; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 548. В этом аспекте полиспецифическое антитело может

содержать SEQ ID NO: 547; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 549.

В этом аспекте область Fab может представлять собой любую из областей Fab, описанных в данном документе (см., например, таблицу 21). В частности, область Fab по этому аспекту может содержать VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 68, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности. SEQ ID NO: 79, 80 и 95, соответственно. Область Fab по этому аспекту может содержать VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления этого аспекта полиспецифическое антитело содержит область Fab, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc, содержащую домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 552. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению могут содержать дополнительный остаток лизина (K) непосредственно на C-конце последовательности домена CH3 (K447, нумерация EU). В некоторых вариантах реализации полиспецифические антитела по изобретению могут иметь удаленный концевой остаток глицина (G) непосредственно на C-конце последовательности домена CH3 (G446, нумерация EU).

Таблица 21. 747 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих CDR антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab							**Область Fc**		
	VH			**VL**					
Получено из антитела	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**CDR1**	**CDR2**	**CDR 3**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	51	53	54	79	80	81	Остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TESGP SEQ ID NO: 553 и остаток 378 представляет собой валин	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают KFG SEQ ID NO: 554	Остатки с 413 по 421 (нумерация EU) включают SNLRWTKGH SEQ ID NO: 555
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			

ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
Исходное ADT1-7	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Таблица 22. 747 - Примеры человеческих полиспецифических антител IgG1 к vδ1-EGFR, имеющих CDR антител, полученных из ADT1-4 и ADT1-7, и соответствующие SEQ ID NO

Область Fab			**Область Fc**		
Получено из антитела	**VH**	**VL**	**Петля AB**	**Петля CD**	**Петля EF**
Исходное ADT1-4	1	26	Остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TESGP SEQ ID NO: 553 и остаток 378 представляет собой валин	Остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают KFG SEQ ID NO: 554	Остатки с 413 по 421 (нумерация EU) включают SNLRWTKGH SEQ ID NO: 555
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			

ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
Исходное ADT1-7	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Примечательно, что во всех указанных примерах, содержащих по меньшей мере один (первый) связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, и по меньшей мере один (второй) связывающий домен, нацеленный на EGFR, наблюдалась повышенная функциональность по сравнению с контролями и составными частями (см. Примеры 2 и 6-10 в данном документе).

В совокупности эти неограничивающие примеры подчеркивают гибкость полиспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе. В этих неограничивающих примерах показано, что подход полиспецифических антител, при котором антитела или их фрагменты, нацеленные на Vδ1-цепь зародышевой линии (аминокислоты 1-90, например, SEQ ID NO:272), могут быть дополнительно усилены путем объединения со EGFR-связывающими доменами с образованием полиспецифических антитела.

В одном варианте осуществления связывающие домены полиспецифических

антител, нацеленные на Vδ1-цепь γδ TCR (первая мишень), могут содержать (i) один или два или более связывающих доменов антител, каждый из которых содержит тяжелую цепь (VH-CH1-CH2-CH3) и родственный партнер легкой цепи (VL-CL) и/или (ii) один, два или более связывающих доменов антитела, каждый из которых содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH или VH-CH1) и родственный партнер вариабельного домена легкой цепи (VL, или VL-VC) и/или (iii) один, два или более связывающих доменов антител, каждый из которых содержит CDR-содержащий фрагмент антитела.

В одном варианте осуществления предложено полиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один первый связывающий домен, полученный из антитела, нацеленного на Vδ1-цепь γδ TCR, и которое функционально связано по меньшей мере с одним вторым связывающим доменом антитела, нацеленным на EGFR. Необязательно указанные связывающие домены содержат по меньшей мере один или более связывающих доменов VH и родственных VL, или один или более связывающих доменов VH-CH1-CH2-CH3 и родственных связывающих доменов VL-CL, или один или более связывающих доменов фрагментов антител. Указанное полиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один первый связывающий домен, полученный из антитела, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, функционально связанный со вторым связывающим доменом, связывающим рецептор EGF, и содержит одну или более из следующих модификаций тяжелой цепи в соответствии с нумерацией EU; L358T и/или (T359D или T359E), и/или (K360D или K360E [«LEE»] или K360S), и/или N361G, и/или Q362P, и/или 361.1G (где 361.1 представляет собой дополнительный остаток между 361 и 362), и/или A378V, и/или (N384T или N384K), и/или (G385Y или G385F), и/или Q386G, и/или D413S, и/или (K414Y или K414N), и/или (S415W или S415L), и/или (Q418Y или Q418T, или Q418V), и/или Q419K, и/или N421H.

Обнаружено, что такие модификации тяжелой цепи являются выгодными. Например, полиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере полученный из первого антитела один связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, функционально связанный со вторым связывающим доменом, связывающим EGFR, и который включает модификации тяжелой цепи L358 дикого типа и T359E и K360E, имеет ряд преимуществ. Во-первых, такие модификации тяжелой цепи устраняют риск двойной изомеризации, присутствующий в немодифицированной последовательности тяжелой цепи. Мотивы изомеризации представляют собой обязательства, которые потенциально могут снизить аффинность, эффективность, стабильность и гомогенность антитела, что может привести к осложнениям при разработке или производстве продукта. Кроме того, изменение T358L превращает треонин обратно в лейцин в петле AB из молекул, таких как ADT1-4-2xFS1-67. Лейцин соответствует канонической человеческой последовательности дикого типа в этом положении и приводит к более консервативной последовательности модифицированной петли AB. Дополнительным неожиданным открытием является то, что полиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один первый связывающий домен, полученный из антитела, нацеленный на цепь Vδ1 γδ TCR, функционально

связанный со вторым связывающим доменом, связывающим рецептор EGF, и содержащий L358, а также с модификациями тяжелых цепей T359E и K360E, приводит к улучшенной транзиентной экспрессии в клетках CHO по сравнению с исходным антителом, содержащим T358, D359 и D360 и которое в остальном идентично. Этот улучшенный профиль экспрессии означает, что титр продукции CH3-модифицированных полиспецифических антител по данному изобретению из клеток CHO, содержащих домены CH3 тяжелой цепи с L358 и E359 и E360 (например, включенные в SEQ ID NO: 389), может быть значительно увеличен по сравнению с антителами с модификациями тяжелой цепи T358, D359 и D360, например, включенными в SEQ ID NO: 388, и которые в остальном идентичны. Это удивительно, поскольку не следовало бы ожидать, что устранение рисков изомеризации приведет к улучшению экспрессии. См. Фиг. 34A. В любом варианте осуществления полиспецифическое антитело по изобретению может не содержать дополнительные двойные аминокислотные мотивы DD и DG с повышенным риском изомеризации в положениях 359, 360 и 361 (нумерация EU). Скорее и более конкретно, в любом варианте осуществления полиспецифическое антитело по изобретению может содержать модифицированную петлю AB, которая включает модификации T359E, K360E, N361G. Более конкретно, в любом варианте осуществления полиспецифическое антитело по изобретению может содержать CH3-модифицированную петлю AB, содержащую двойной отрицательный заряд в положениях 359 и 360, причем этот двойной отрицательный заряд обеспечивается глутаминовой кислотой (E, Glu) вместо аспаргиновой кислоты (D, Asp).

Полиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один первый связывающий домен, полученный из антитела, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, функционально связанный со вторым связывающим доменом, содержащим SEQ ID NO: 385 или SEQ ID NO: 386, или SEQ ID NO: 391, или SEQ ID NO: 392, или SEQ ID NO: 520, или SEQ ID NO: 521, или SEQ ID NO: 530, или SEQ ID NO: 531, или SEQ ID NO: 539, или SEQ ID NO: 540, или SEQ ID NO: 508, или SEQ ID NO: 509, или SEQ ID NO: 550, или SEQ ID NO: 551, или их функционально эквивалентными связывающими вариантами, которые нацелены на EGFR. Необязательно, полиспецифические антитела включают SEQ ID NO: 389; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 432; или SEQ ID NO: 400; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 436; или SEQ ID NO: 516; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 518; или SEQ ID NO: 517; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 519; SEQ ID NO: 526; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 528; или SEQ ID NO: 527; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 529; или SEQ ID NO: 535; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 537; или SEQ ID NO: 536; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 538; или SEQ ID NO: 504; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 506; или SEQ ID NO: 505; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 507; или SEQ ID NO: 388; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 431; или SEQ ID NO: 399; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 435; или SEQ ID NO: 546; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 548; или SEQ ID NO: 547; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 549; или SEQ ID NO: 378; или SEQ ID NO: 425 и SEQ ID NO: 426; или SEQ ID NO: 379; или SEQ ID NO: 421 и SEQ ID NO: 437; или SEQ ID NO: 380; или SEQ

ID NO: 423 и SEQ ID NO: 427.

В одном аспекте изобретения полиспецифические антитела по изобретению можно использовать в терапевтически эффективных количествах для лечения заболевания или нарушения, например, для облегчения по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения.

В одном варианте осуществления предложен способ селекции, определения характеристик или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR в формате полиспецифического антитела, где указанное полиспецифическое антитело применяют к Vδ1+ клеткам для измерения эффекта, оказываемого указанными полиспецифическими соединениями на Vδ1+ клетки (например, на указанный фенотип Vδ1+ и/или цитотоксичность, и/или специфичность к пораженным клеткам и/или их усиление).

Комбинированные виды терапии

Полиспецифические антитела по изобретению можно использовать в некоторых комбинированных методах лечения. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела можно комбинировать с модулятором ракового антигена или ассоциированного с раком антигена, например, выбранного из группы, состоящей из AFP, AKAP-4, ALK, альфа-фетопротеина, андрогенового рецептора, B7H3, BAGE, BCA225, BCAA, Bcr-abl, бета-катенина, бета-HCG, человеческого хорионического гонадотропина бета, BORIS, BTAA, CA 125, CA 15-3, CA 195, CA 19-9, CA 242, CA 27.29, CA 72-4, CA-50, CAM 17.1, CAM43, карбоангидразы IX, карциноэмбрионального антигена, CD22, CD33/IL3Ra, CD68\P1, CDK4, CEA, хондроитинсульфатного протеогликана 4 (CSPG4), c-Met, CO-029, CSPG4, циклина B1, ассоциированного с циклофилином C белка, CYP1B1, E2A-PRL, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, эфрина B2, антигена вируса Эпштейна - Барра EBVA, ERG (слитого гена TMPRSS2ETS), ETV6-AML, FAP, FGF-5, Fos-родственного антигена 1, фукозил GM1, G250, Ga733\EpCAM, GAGE-1, GAGE-2, GD2, GD3, ассоциированного с глиомой антигена, GloboH, гликолипида F77, GM3, GP 100, GP 100 (Pmel 17), H4-RET, HER-2/neu, HER-2/Neu/ErbB-2, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена (HMW-MAA), HPV E6, HPV E7, hTERT, HTgp-175, обратной транскриптазы теломеразы человека, идиотипа, рецептора IGF-I, IGF-II, IGH-IGK, фактора роста инсулина (IGF)-I, кишечной карбоксиэстеразы, K-ras, LAGE-1a, LCK, лектин-реактивного AFP, легумаина, LMP2, M344, MA-50, Mac-2-связывающего белка, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, MART-1, MART-1/MelanA, M-CSF, ассоциированного с меланомой протеогликан хондроитинсульфата (MCSP), мезотелина, MG7-Ag, ML-IAP, MN-CA IX, MOV18, MUC1, Mum-1, hsp70-2, MYCN, MYL-RAR, NA17, NB/70K, нейрон-глиального антигена 2 (NG2), нейтрофильной эластазы, nm-23H1, NuMa, NY-BR-1, NY-CO-1, NY-ESO, NY-ESO-1, NY-ESO-1, OY-TES1, p15, p16, p180erbB3, p185erbB2, p53, мутанта p53, Page4, PAX3, PAX5, PDGFR-бета, PLAC1, полисиаловой кислоты, опухолевого антигена-1 карциномы предстательной железы (PCTA-1), простатспецифического антигена,

простатической кислой фосфатазы (PAP), протеиназы-3 (PR1), PSA, PSCA, PSMA, RAGE-1, Ras, Ras-мутанта, RCAS1, RGS5, RhoC, ROR1, RU1, RU2 (AS), SART3, SDCCAG16, sLe(a), белка спермы 17, SSX2, STn, сурвивина, TA-90, TAAL6, a TAG-72, теломеразы, тиреоглобулина, Tie 2, TLP, Tn, TPS, TRP-1, TRP-2, TRP-2, TSP-180, тирозиназы, VEGF, VEGFR2, VISTA, WT1, XAGE 1, 43-9F, 5T4 и 791Tgp72;

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела можно комбинировать с модулятором иммуномодулирующего антигена, например, выбранного из группы, состоящей из B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-DC (CD273), B7-H1 (CD274), B7-H2 (CD275), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), B7-H5 (VISTA), BTLA (CD272), CD137, CD137L, CD24, CD27, CD28, CD38, CD40, CD40L (CD154), CD54, CD59, CD70, CTLA4 (CD152), CXCL9, GITR (CD357), HVEM (CD270), ICAM-1 (CD54), ICOS (CD278), LAG-3 (CD223), OX40 (CD134), OX40L (CD252), PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274), TIGIT, CD314, CD334, CD335, CD337, и TIM-3 (CD366).

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела можно комбинировать с модулятором антигена CD, например, выбранным из группы, состоящей из CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32A, CD32B, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85B, CD85C, CD85D, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD85M, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140A, CD140B, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158, CD158A, CD158B1, CD158B2, CD158C, CD158D, CD158E1, CD158E2, CD158F1, CD158F2, CD158G, CD158H, CD158I, CD158J, CD158K, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210a, CDw210b, CD211, CD212, CD213a1, CD213a2, CD214, CD215, CD216, CD217,

CD218a, CD218b, CD219, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255, CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300A, CD300C, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370 и CD371.

В некоторых вариантах осуществления модуляторы могут быть антагонистами или агонистами. Подходящие модуляторы включают антитела, слитые белки или малые молекулы.

Иммуноконъюгаты

Полиспецифические антитела по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин или химиотерапевтический агент. Такие конъюгаты можно назвать иммуноконъюгатами. В контексте данного документа термин «иммуноконъюгат» относится к антителу, которое химически или биологически связано с другим фрагментом, таким как цитотоксин, радиоактивный агент, цитокин, интерферон, целевой или репортерный фрагмент, фермент, токсин, пептид или белок, или терапевтический агент. Антитело может быть связано с цитотоксином, радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или терапевтическим агентом в любом месте молекулы при условии, что оно способно связываться со своей мишенью. Примеры иммуноконъюгатов включают в себя конъюгаты антитела с лекарственным средством и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте осуществления агент может представлять собой второе другое антитело к Vδ1. В определенных вариантах осуществления антитело может быть конъюгировано с агентом, специфичным для опухолевой клетки или вирусно-инфицированной клетки. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к Vδ1, и будет учитывать заболевание, подлежащее лечению, и желаемый терапевтический эффект, которого нужно достичь. В одном варианте осуществления агент может представлять собой второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с молекулой, отличной от Vδ1.

Перекрестная реактивность для яванского макака

Соответственно, полиспецифические антитела проявляют перекрестную

реактивность как с человеческим TRDV1 SEQ ID NO: 272 (включая полиморфный вариант, т.е. SEQ ID NO: 306), так и с TRDV1 яванского макака (SEQ ID NO: 308). Перекрестная реактивность, безусловно, полезна для получения антител, которые можно использовать в исследованиях на животных *in vivo* во время доклинической оценки.

Авторы настоящего изобретения неожиданно идентифицировали мутацию в каркасной области, которая может обеспечивать повышенное связывание антител, например, антител к Vδ1xEGFR и их антигенсвязывающих фрагментов, с антигенами яванского макака. Мутация в каркасной области не оказывает неблагоприятного воздействия на аффинность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к соответствующему варианту антигена человека. Мутация представляет собой мутацию остатка серина в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT вариабельной последовательности легкой каппа-цепи в остаток, не являющийся серином (например, остаток, отличный от остатка аминокислоты зародышевой линии человека, и/или неполярный остаток). Неполярные аминокислоты могут быть выбраны из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, метионина, лейцина и изолейцина. Аминокислоты, отличные от аминокислот зародышевой линии, могут быть выбраны из группы, состоящей из аргинина, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, треонина, триптофана, тирозина и валина. Неполярные аминокислоты, отличные от аминокислот зародышевой линии, (т.е. аминокислоты, которые являются одновременно неполярными и аминокислотами, отличными от аминокислот зародышевой линии) могут быть выбраны из группы, состоящей из глицина, валина, метионина, лейцина и изолейцина). В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой мутацию остатка серина в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT вариабельной последовательности легкой каппа-цепи в остаток лейцина. Мутация представляет собой прямую замену, так что общая длина цепи не меняется. Следовательно, серин а в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT удаляется и непосредственно заменяется другой аминокислотой (например, аминокислотой, отличной от аминокислоты зародышевой линии человека, и/или неполярной аминокислотой, такой как лейцин). Замена может быть осуществлена любым подходящим способом, известным специалисту в данной области техники.

Ссылки в данном документе на антитела, содержащие последовательность вариабельной области легкой каппа-цепи, содержащую остаток в положении 74 в соответствии с нумерацией IMGT, который не является серином, могут альтернативно определяться как антитела, содержащие последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую область LFR1, область LCDR1, область LFR2, область LCDR2, область LFR3, область LCDR3 и область LFR4, где область LFR3 содержит остаток в положении 74 в соответствии с нумерацией IMGT, который не является серином (например, аминокислоту, отличную от аминокислоты зародышевой линии человека, и/или неполярную аминокислоту, такую как остаток лейцина). Такое альтернативное определение применимо ко всем описанным в данном документе антителам, содержащим

вариабельную последовательность легкой каппа-цепи, содержащую остаток в положении 74 в соответствии с нумерацией IMGT, который не является серином (например, аминокислоту, отличную от аминокислоты зародышевой линии человека, и/или неполярную аминокислоту, например, остаток лейцина).

Соответственно, настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам к вариабельному домену дельта-цепи 1 TCR (анти-Vδ1)xEGFR или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим вариабельную последовательность легкой каппа-цепи, в которой остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT последовательности вариабельной области легкой цепи не является серином (например, аминокислота, отличная от аминокислоты зародышевой линии человека, и/или неполярная аминокислота, например, остаток лейцина). В некоторых вариантах осуществления остаток в положении 74 по системе нумерации IMGT вариабельной последовательности легкой цепи представляет собой лейцин. Соответственно, антитело может представлять собой антитело IgG. Например, антитело может представлять собой антитело IgG1.

Полиспецифические антитела к Vδ1xEGFR и их антигенсвязывающие фрагменты, предусмотренные в данном документе, могут быть обеспечены заменой в положении 74 (в соответствии с системой нумерации IMGT) последовательности вариабельной области легкой цепи. Например, полиспецифические антитела к Vδ1xEGFR и их антигенсвязывающие фрагменты и варианты, описанные в данном документе, могут содержать последовательность вариабельной области легкой каппа-цепи, содержащую остаток, отличный от серина, в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT (например, аминокислоту, отличную от аминокислоты зародышевой линии человека, и/или неполярную аминокислоту, такую как остаток лейцина). В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела к Vδ1xEGFR и их антигенсвязывающие фрагменты и варианты, описанные в данном документе, могут содержать последовательность вариабельной области легкой каппа-цепи, содержащую остаток лейцина в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT. Варианты осуществления, содержащие мутацию в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT легкой каппа-цепи, могут быть особенно применимы к антителам, полученным из ADT1-4, хотя мутация в равной степени применима к другим антителам. Например, наблюдается, что положение 74 легкой цепи не является в высокой степени консервативным в различных зародышевых линиях легкой цепи каппа/лямбда. Кроме того, отмечено, что разные зародышевые линии легких цепей содержат по-разному поляризованные и/или заряженные аминокислоты в этом положении, варьирующиеся от неполярных (например, аланин) до полярно-нейтральных (например, серин) и до отрицательно или положительно заряженных (например, аспартат или аспарагин, соответственно). Хорошо известно, что полярность/заряд аминокислоты в любом заданном положении может влиять на структуру белка. Например, хорошо известно, что изменение полярности и заряда может повлиять на гидрофобность и склонность аминокислоты к тому, чтобы быть более экспонированной на поверхности или более скрытой. Тем не менее, это

замечательное открытие подчеркивает, что неконсервативные замены аминокислот в положении 74 легкой цепи могут изменять аффинность к выбранной мишени более чем в 10 раз. Следовательно, помимо улучшения аффинности, как описано в данном документе, использование этих знаний может предложить новый подход к увеличению или снижению аффинности в более широком смысле. Например, способ, включающий замену остатка в положении 74 с более полярного на неполярный или, например, с неполярного на более заряженный, может быть более предпочтительным по сравнению со сложными/обременительными методами мутагенеза, такими как насыщающий мутагенез и т. д., когда требуется повысить или понизить аффинность для любого данного антитела.

В дополнительном варианте осуществления изобретения также предложен способ мутирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий получение антитела, содержащего легкую каппа-цепь, имеющую серин в положении 74 последовательности вариабельной области легкой цепи в соответствии с системой нумерации IMGT, и мутацию серина на другой остаток, например, аминокислоту, отличную от аминокислоты зародышевой линии человека, и/или неполярную аминокислоту, такую как лейцин. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к вариабельному домену дельта-цепи 1 TCR (анти-Vδ1) или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, имеющее VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 1, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 26, как до, так и после введения мутации в положении 74 последовательности вариабельной области легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, имеющее VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет 100% идентичности с SEQ ID NO: 1, за исключением мутации в положении 74, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет 100% идентичности с SEQ ID NO: 26, за исключением мутации в положении 74.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, имеющее VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 106, и VL,

включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 118, как до, так и после введения мутации в положении 74 последовательности вариабельной области легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, имеющее VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет 100% идентичности с SEQ ID NO: 106, за исключением мутации в положении 74, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет 100% идентичности с SEQ ID NO: 118, за исключением мутации в положении 74.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, содержащее:

VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 273, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 282 как до, так и после введения мутации;

VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 274, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 283 как до, так и после введения мутации;

VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO: 275, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95% по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 284 как до, так и после введения мутации;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 276 и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95% по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 285 как до, так и после введения мутации;

VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 277, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95% по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 286 как до, так и после введения мутации;

VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 278, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%,

по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 287 как до, так и после введения мутации;

VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 279, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 288 как до, так и после введения мутации;

VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 280, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 289 как до, так и после введения мутации;

VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 281, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 290 как до, так и после введения мутации; или

VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 312, и VL, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 313 как до, так и после введения мутации.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, содержащее:

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:273; и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:282;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 283;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 275, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 284;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 276, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 285;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 277, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 286;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 287;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 288;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 289;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290; или

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 313.

Антитело, полученное такими способами, имеет 100% идентичности с указанными последовательностями VH и VL, за исключением мутации в положении 74.

В некоторых вариантах осуществления мутация в положении 74 увеличивает аффинность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к гомологичному антигену яванского макака (cyno). Повышение аффинности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связано с аффинностью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до введения мутации (при измерении в тех же или по существу в тех же условиях). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело к вариабельному домену дельта-цепи TCR 1 (анти-Vδ1) или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с человеческим вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR) (например, SEQ ID NO: 272 и 306) до и после введения мутации, и антитело обладает повышенной аффинностью к

вариабельному домену дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR) яванского макака (например, SEQ ID NO: 308) после введения мутации.

Полинуклеотидные последовательности и векторы экспрессии

В одном аспекте изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий полиспецифическое антитело по изобретению. В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 199-222, 224-247, 249-259 или 261-271. В дополнительном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из любой из SEQ ID NO: 199-222, 224-247, 249-259 или 261-271. В дополнительном аспекте предлагается кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

В одном аспекте изобретения предложен полинуклеотид, содержащий или состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 199-222, 224-247, 249-259 или 261-271, которая кодирует CDR1, CDR2 и/или CDR3 кодируемого вариабельного домена цепи иммуноглобулина.

В одном аспекте изобретения предложен полинуклеотид, содержащий или состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 199-222, 224-247, 249-259 или 261-271, которая кодирует FR1, FR2, FR3 и/или FR4 кодируемого вариабельного домена цепи иммуноглобулина.

Настоящее изобретение также относится к векторам экспрессии и плазмидам, содержащим полинуклеотидные последовательности по изобретению. В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии содержат последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 199-222 или 249-259 (кодирующих вариабельные области тяжелой цепи). В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии содержат последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 224-247 или 261-271 (кодирующие вариабельные области легкой цепи). Такие векторы экспрессии могут использоваться парами, предпочтительно спаривая вариабельные последовательности тяжелой и легкой цепей в соответствии со спариванием различных аминокислотных последовательностей, обеспечивая полиспецифические антитела по изобретению, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии содержат

последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 199-222 или 249-259 (кодирующей вариабельную область тяжелой цепи), и дополнительно содержат последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 224-247 или 261-271 (кодирующей вариабельную область легкой цепи). Опять же, последовательности могут быть предложены в специфических парах, как описано в настоящем документе, для кодирования полиспецифические антител по изобретению.

В настоящем изобретении также предложены полинуклеотидные последовательности, и векторы экспрессии, и плазмиды, кодирующие все последовательности антител, описанные в настоящем документе, включая любые варианты последовательностей антител, описанные в настоящем документе, необязательно содержащие одну или более аминокислотные замены.

Полинуклеотиды и векторы экспрессии по настоящему изобретению также могут быть описаны для кодируемой аминокислотной последовательности. Таким образом, в одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-197.

Для экспрессии полиспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов полинуклеотиды, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, как описано в данном документе, вставляют в векторы экспрессии таким образом, чтобы гены были оперативно связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. Таким образом, в одном аспекте изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, как определено в данном документе. В одном варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VH любой из SEQ ID NO: 199-222 или 249-259. В другом варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VL любой из SEQ ID NO: 224-247 или 261-271.

Следует понимать, что нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, могут содержат дополнительные последовательности, кодирующие аминокислотные остатки, чтобы облегчить трансляцию, очистку и обнаружение, однако могут использоваться альтернативные последовательности в зависимости от используемой системы экспрессии. Эти необязательные последовательности могут быть удалены, модифицированы или заменены, если будут приняты альтернативные стратегии дизайна, трансляции, очистки или обнаружения.

Мутации могут быть внесены в ДНК или кДНК, которые кодируют полипептиды, являющиеся молчащими для аминокислотной последовательности полипептида, однако которые обеспечивают предпочтительные кодоны для трансляции в конкретном хозяине.

Известны предпочтительные кодоны для трансляции нуклеиновой кислоты в, *например*, *E. coli* и *S. cerevisiae*, а также млекопитающих, в частности человека.

Мутации полипептидов могут достигаться, например, путем замен, добавлений или делеций в нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид. Замены, добавления или делеции в нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид, могут быть введены многими способами, включая, например, ПЦР сниженной точности, перетасовку, олигонуклеотид-направленный мутагенез, сборочную ПЦР, ПЦР-мутагенез, мутагенез *in vivo*, кассетный мутагенез, рекурсивный множественный мутагенез, экспоненциальный множественный мутагенез, сайт-специфический мутагенез, повторную сборку генов, синтез искусственных генов, насыщающий мутагенез участка гена (Gene Site Saturation Mutagenesis - GSSM), искусственную перестройку с лигированием (synthetic ligation reassembly - SLR) или комбинацию этих способов. Модификации, добавления или делеции в нуклеиновой кислоте также могут быть введены способом, включающим рекомбинацию, рекомбинацию возвратной последовательности, мутагенез модифицированной фосфоротиоатом ДНК, мутагенез на урацил-содержащей матрице, мутагенез с применением дуплексной ДНК с гэпом, точечный мутагенез с исправлением ошибок спаривания, мутагенез штамма-хозяина с дефицитом репарации, химический мутагенез, радиогенный мутагенез, делеционный мутагенез, мутагенез на основе рестрикционной селекции, мутагенез на основе рестрикционной очистки, множественный мутагенез, создание мультимеров химерных нуклеиновых кислот и их комбинации.

В частности, можно использовать синтез искусственных генов. Ген, кодирующий полипептид по изобретению, может быть получен синтетическим путем, например, при помощи твердофазного синтеза ДНК. Целые гены могут быть синтезированы *de novo* без необходимости в предшественнике ДНК-матрицы. Для получения желаемого олигонуклеотида структурные звенья последовательно связывают с растущей олигонуклеотидной цепью в порядке, требуемом последовательностью продукта. По завершении сборки цепи продукт высвобождают из твердой фазы в раствор, снимают защиту и собирают. Продукты могут быть выделены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для получения желаемых олигонуклеотидов высокой чистоты.

Векторы экспрессии включают в себя, например, плазмиды, ретровирусы, космиды, дрожжевые искусственные хромосомы (YAC) и эписомы, полученные из вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ). Полинуклеотид лигируется в вектор таким образом, чтобы транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности в векторе выполняли свою предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции полинуклеотида. Последовательности экспрессии и/или регуляции могут включать промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции, стартовый кодон (*m.e.* ATG) 5' к кодирующей последовательности, сигналы сплайсинга для интронов и стоп-кодоны. Вектор экспрессии и последовательности регуляции экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимыми с используемой клеткой-хозяином экспрессии. Например, последовательности могут

содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие варианты одноцепочечных вариабельных фрагментов антител по изобретению, содержащие область VH и область VL, соединенные синтетическим линкером (например, кодирующие SEQ ID NO: 291). Следует понимать, что полинуклеотиды или векторы экспрессии по настоящему изобретению могут содержать область VH, область VL или и ту, и другую (необязательно включая линкер). Таким образом, полинуклеотиды, кодирующие области VH и VL, могут быть вставлены в отдельные векторы, в качестве альтернативны, последовательности, кодирующие обе области, вставляют в один и тот же вектор экспрессии. Полинуклеотид(-ы) вставляют в вектор экспрессии стандартными способами (*например*, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на полинуклеотиде и векторе или лигированием тупого конца в случае отсутствия сайтов рестрикции).

Удобным является вектор, который кодирует функционально полную последовательность CH или CL иммуноглобулина человека, с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, чтобы можно было легко вставить и экспрессировать любую последовательность VH или VL, как описано в данном документе. Вектор экспрессии может также кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) из клетки-хозяина. Полинуклеотид может быть клонирован в вектор так, чтобы сигнальный пептид в рамке был связан с аминоконцом антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (*т. е.* сигнальный пептид из белка, не являющегося иммуноглобулином).

В одном аспекте изобретения предложена клетка (*например*, клетка-хозяин, такая как рекомбинантная клетка-хозяин), содержащая полинуклеотид или вектор экспрессии, как определено в данном документе. Понятно, что клетка может содержать первый вектор, кодирующий легкую цепь антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, и второй вектор, кодирующий тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающий фрагмент. В альтернативном варианте как тяжелая, так и легкая цепи кодируются в одном и том же векторе экспрессии, введенном в клетку.

В одном варианте осуществления полинуклеотид или вектор экспрессии кодирует мембранный якорь или трансмембранный домен, слитый с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент присутствуют на внеклеточной поверхности клетки.

Для введения полинуклеотидов в клетку-хозяина трансформацию можно проводить любым известным способом. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают в себя опосредованную декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, опосредованную полибреном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(-ов) в липосомы, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в клетки млекопитающих посредством вирусных векторов.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области техники и включают в себя многие иммортализованные клеточные линии, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Эти клетки включают в себя, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NSO, SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (*например*, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3 и ряд других линий клеток. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, крупного рогатого скота, лошади и хомяка. Особенно предпочтительные клеточные линии выбирают путем определения того, какие клеточные линии обладают высокими уровнями экспрессии. Другими клеточными линиями, которые можно использовать, являются клеточные линии насекомых, такие как клетки Sf9, клетки земноводного, бактериальные клетки, клетки растения и клетки гриба. Антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как фрагменты scFv и Fv, могут быть выделены и экспрессированы в *E. Coli* с помощью способов, известных в данной области техники.

Антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения возможности экспрессии антитела в клетках-хозяевах или более предпочтительно секреции антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных методов очистки белка.

Антитела (или фрагменты) по изобретению можно получать и подвергать манипуляции с помощью методов, описанных например, в Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2012) 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомной технологии путем слияния B-клетки, продуцирующей специфические антитела, с клеткой миеломы (B-клеточное злокачественное новообразование), выбранной по способности расти в культуре тканей и отсутствию синтеза цепей антител.

Моноклональное антитело, направленное против определенного антигена, можно, например, получить путем:

a) иммортализации лимфоцитов, полученных из периферической крови животного, ранее иммунизированного определенным антигеном, с помощью иммортализованной клетки и предпочтительно клеток миеломы с целью образования гибридомы,

b) культивирования полученных иммортализованных клеток (гибридомы) и выделения клеток, продуцирующих антитела, имеющие желаемую специфичность.

В альтернативном варианте использование клетки гибридомы не требуется. Антитела, способные связываться с антигенами-мишенями, как описано в настоящем документе, могут быть выделены из подходящей библиотеки антител путем стандартной практики, например, используя технологии фагового дисплея, дрожжевого дисплея, рибосомного дисплея или дисплея на клетках млекопитающих, известные в данной области техники. Соответственно, моноклональные антитела могут быть получены, например, в

результате процесса, включающего следующие этапы:

a) клонирование в векторы, особенно в фаги и, в частности, в нитчатые бактериофаги, последовательности ДНК или кДНК, полученные из лимфоцитов, особенно лимфоцитов периферической крови животного (предпочтительно предварительно иммунизированных определенными антигенами),

b) трансформация прокариотических клеток указанными выше векторами в условиях, позволяющих продуцировать антитела,

c) селекция антител путем их отбора по аффинности к антигену,

d) выделение антител, имеющих желаемую специфичность.

Необязательно выделенный полинуклеотид, кодирующий антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, который связывается с Vδ1-цепью γδ, также можно легко изготовить в достаточных количествах для применения в качестве лекарственных препаратов для облегчения проявлений или симптомов заболевания. При использовании в качестве лекарственного препарата таким образом, как правило, представляющие интерес полинуклеотиды сначала функционально связывают с вектором экспрессии или кассетой экспрессии, предназначенными для экспрессии указанных антител или их антигенсвязывающего фрагмента у субъекта или пациента. Такие кассеты экспрессии и способы доставки полинуклеотидов или того, что иногда называют лекарственными препаратами «на основе нуклеиновой кислоты», хорошо известны в данной области техники. Недавний обзор см. в Hollevoet and Declerck (2017) J. Transl. Med. 15(1): 131.

Также предложен способ изготовления антитела к Vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в клеточной культуральной среде в условиях для экспрессии кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты плазмиды или вектора внутри клетки. Способ может дополнительно включать получение антитела к Vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта из супернатанта клеточной культуры. Затем полученное антитело может быть включено в фармацевтическую композицию. Кроме того, предложен способ получения клетки, которая экспрессирует антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, включающий трансфекцию указанной клетки плазмидой или вектором по изобретению. Затем указанные клетки можно культивировать для продукции антитела к Vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта.

Фармацевтические композиции

Согласно следующему аспекту изобретения предложена композиция, содержащая полиспецифические антитела, как определено в данном документе. В таких вариантах осуществления композиция может содержать антитело необязательно в комбинации с другими вспомогательными веществами. Также включены композиции, содержащие один или более дополнительных активных агентов (например, активных агентов, пригодных для лечения заболеваний, упомянутых в настоящем документе).

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена

фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как определено в данном документе, вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. Полиспецифические антитела по изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, пригодные для введения субъекту. Как правило, фармацевтическая композиция содержит антитело по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают в себя одно или более из воды, физиологического раствора, солей, фосфатно-солевого буфера, декстрозы, глицерина, этанола и т. п., а также их комбинации. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие или незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Композиции по данному изобретению быть в различных формах. Эти формы включают в себя, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные формы, такие как жидкие растворы (*например*, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции находятся в форме растворов для инъекций или инфузий.

Предпочтительным способом введения является парентеральный (*например* , внутривенный, подкожный, внутрибрюшинный, внутримышечный, интратекальный). В предпочтительном варианте осуществления антитело вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства.

В пределах объема изобретения находится применение фармацевтической композиции по изобретению в терапевтических способах для лечения заболеваний, как описано в настоящем документе, в качестве дополнения или в сочетании с другими общепринятыми методами, обычно применяемыми для лечения таких заболеваний.

В дополнительном аспекте изобретения антитело, композицию или фармацевтическую композицию вводят последовательно, одновременно или отдельно с по

меньшей мере одним активным агентом.

Способы лечения

Согласно следующему аспекту изобретения предложено выделенное полиспецифическое антитело, как определено в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата. Ссылки в данном документе на антитело «для применения» в качестве лекарственного препарата или в терапии ограничиваются введением антитела субъекту.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело предназначено для лечения злокачественного новообразования. В одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела. В различных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование. В одном варианте полиспецифическое антитело, предназначенное для применения при лечении злокачественного новообразования, приводит к гибели пораженных клеток, сохраняя при этом здоровые клетки. В дополнительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяются при лечении злокачественного новообразования.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяются при лечении злокачественного новообразования. В дополнительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяются при лечении злокачественного новообразования.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, как определено в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного препарата. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция применяется при лечении злокачественное новообразование. В дополнительном варианте осуществления фармацевтическая композиция применяется при лечении рака.

Согласно дополнительному аспекту изобретения предложен способ модуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного полиспецифического антитела, как определено в данном документе. В различных вариантах осуществления модулирование иммунного ответа у субъекта включает связывание или нацеливание γδ Т-клеток, активацию γδ Т-клеток, инициирование или усиление пролиферации γδ Т-клеток, инициирование или усиление экспансии γδ Т-клеток, инициирование или усиление дегрануляции γδ Т-клеток, инициирование или увеличение опосредованной γδ Т-клетками активности уничтожения, инициирование или увеличение опосредованной γδ Т-клетками активность уничтожения, сохраняя при этом здоровые клетки, инициирование или увеличение цитотоксичности γδ Т, инициирование или увеличение цитотоксичности γδ Т, сохраняя при этом здоровые клетки, инициирование или увеличение мобилизации γδ Т-клеток, повышение выживаемости γδ Т-клеток или повышение устойчивости к истощению γδ Т-клеток. Модуляция иммунного

ответа у субъекта может дополнительно включать связывание или нацеливание на второй антиген. Например, в некоторых вариантах осуществления связывание второго антигена, в частности, когда он представляет собой иммуномодулирующий антиген, может стимулировать иммуномодуляцию посредством второго антигена в дополнение к иммуномодуляции посредством связывания полиспецифического антитела к TRDV1. Следовательно, модуляция иммунного ответа может включать модуляцию посредством двух различных сигнальных путей: первого сигнального пути, модулируемого посредством взаимодействия с антигеном TRDV1, и второго сигнального пути, модулируемого посредством взаимодействия со вторым иммуномодулирующим антигеном.

Согласно дополнительному аспекту изобретения предложен способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества полиспецифического антитела, как определено в данном документе. В качестве альтернативы, вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.

Согласно дополнительным аспектам изобретения предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в данном документе, для производства лекарственного средства, например, при лечении злокачественного новообразования.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту, который имеет злокачественное новообразование.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, как определено в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного препарата. В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту, который имеет злокачественное новообразование.

Согласно дополнительному аспекту изобретения предложен способ введения терапевтически эффективного количества выделенного полиспецифического антитела, как определено в данном документе, субъекту, который имеет злокачественное новообразование. В качестве альтернативы, вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.

Согласно дополнительным аспектам изобретения предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в данном документе, для производства лекарственного препарата, например, для введения субъекту, который имеет злокачественное новообразование.

В различных вариантах осуществления злокачественное новообразование, которое можно лечить описанными способами и композициями, включает, но не ограничивается ими, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, адренокортикальную карциному, рак аппендикса, базально-клеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому ствола головного мозга, опухоль головного мозга, опухоль головного мозга, глиому ствола головного мозга, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной

нервной системы, эмбриомы центральной нервной системы, астроцитому мозжечка, астроцитому головного мозга/злокачественную глиому, краниофарингиому, эпендимобластому, эпендимому, медуллобластому, медуллоэпителиому, паренхиматозные опухоли пинеальной области промежуточной дифференцировки, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластому, глиому зрительного пути и гипоталамуса, опухоли головного и спинного мозга, рак молочной железы, опухоли бронхов, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной нервной системы, эмбриональные опухоли центральной нервной системы, лимфому центральной нервной системы, астроцитому мозжечка, астроцитому головного мозга/злокачественную глиому, рак шейки матки, хордому, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные заболевания, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, кожную Т-клеточную лимфому, рак пищевода, опухоли семейства Юинга, внегонадную герминогенную опухоль, рак внепеченочных желчных протоков, интраокулярную меланому, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка (желудочный), карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальную стромальную опухоль (ГИСО), герминому, гестационную трофобластическую опухоль, глиому, глиому ствола головного мозга, глиому церебральную астроцитому, глиому зрительного пути и гипоталамуса, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный (печени) рак, лангергансоклеточный гистиоцитоз, лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, глиому гипоталамуса и зрительного пути, интраокулярную меланому, опухоли островковых клеток, рак почки (почечно-клеточный), лангергансоклеточный гистиоцитоз, рак гортани, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, хронический миелогенный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, рак губы и полости рта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, лимфому, связанную со СПИДом, лимфому Беркитта, кожную Т-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, макроглобулинемию Вальденстрема, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости и остеосаркому, медуллобластому, меланому, карциному из клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным поражением, рак ротовой полости, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому/плазмоклеточное новообразование, микозы, фунгоидный микоз, миелодиспластические синдромы миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, миелоидный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, миелопролиферативные заболевания, рак полости носа и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластому, немелкоклеточный рак легкого, рак полости рта, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичников, эпителиальный рак яичников, герминогенные опухоли яичников, низкозлокачественные опухоли яичников, рак поджелудочной железы, рак

поджелудочной железы, папилломатоз, рак паращитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому, паренхиматозные опухоли пинеальной области промежуточной дифференцировки, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль гипофиза, плазмоклеточное новообразование/множественную миелому, плевропульмональную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки и мочеточника, рак дыхательных путей с вовлечением гена nut на хромосоме 15, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому, опухоли семейства Юинга, саркому Капоши, саркому мягких тканей, саркому матки, синдром Сезари, рак кожи (немеланомный), рак кожи (меланому), карциному кожи из клеток Меркеля, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточный рак шеи, рак желудка (желудочный), супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, Т-клеточную лимфому, рак яичка, рак горла, тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, гестационную трофобластическую опухоль, рак уретры, рак матки, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса. В различных вариантах осуществления злокачественное новообразование, которое можно лечить описанными способами и композициями, лечат, сохраняя при этом здоровые клетки.

В различных вариантах осуществления злокачественное новообразование, которое можно лечить с помощью раскрытых способов и композиций, включает EGFR-положительные (EGFR+) злокачественные новообразования.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу активации по меньшей мере одной γδ Т-клетки у субъекта, включающий стадию введения полиспецифического антитела, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или увеличения пролиферации γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или усиления дегрануляции γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или повышения активности γδ Т-лимфоцитов (например, активности, опосредованной Т-клетками) у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к Vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в данном документе. В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или повышения активности γδ Т-клеток (например, активности, опосредованной Т-клетками) у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к Vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или повышения цитотоксичности γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к Vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в данном документе. В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или повышения цитотоксичности γδ Т-клеток у субъекта при сохранении здоровых клеток, включающий стадию введения субъекту антитела к Vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или усиления дегрануляции γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ повышения выживаемости γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ повышения устойчивости к истощению γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту полипецифического антитела, как определено в данном документе.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела в количестве, эффективном для стимуляции иммунного ответа.

Применение **ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИХ** антител или их антигенсвязывающих фрагментов

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложено применение полиспецифического антитела, как описано в данном документе, для изучения распознавания антигена, активации, сигнальной трансдукции или функции γδ Т-клеток (в частности, Vδ1 Т-клеток). Как описано в настоящем документе, антитела продемонстрировали активность в анализах, которые можно использовать для исследования функции γδ Т-клеток. Такие антитела также могут быть пригодны для индуцирования пролиферации γδ Т-клеток, таким образом, они могут использоваться в способах экспансии γδ Т-клеток (например, Vδ1 Т-клеток).

Антитела, которые связываются с Vδ1-цепью, можно использовать для обнаружения γδ Т-клеток. Например, антитела могут быть мечены обнаруживаемой меткой или репортерной молекулой или использоваться в качестве захватывающего лиганда для селективного обнаружения и/или выделения Vδ1 Т-клеток в образце. Меченные антитела находят применение во многих способах, известных в данной области техники, например, иммуногистохимии и ELISA.

Обнаруживаемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоизотоп, такой как ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S или ^{125}I; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза.

Флуоресцентные метки, применяемые к полиспецифическим антителам по изобретению, можно затем использовать в методах сортировки клеток с активацией флуоресценцией (FACS).

Таким образом, в различных вариантах осуществления изобретение включает *in vivo* способы модуляции γδ Т-клеток, способы связывания γδ Т-клеток, способы нацеливания на γδ Т-клетки, способы активации γδ Т-клеток, способы пролиферации γδ Т-клеток, способы экспансии γδ Т-клеток, способы обнаружения γδ Т-клеток, способы инициирования дегрануляции γδ Т-клеток, способы инициирования активности уничтожения, опосредованной γδ Т-клетками, способы селекции антител или их антигенсвязывающих фрагментов, способы, включающие стадию введения полиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, как описано в данном документе.

Лекарственные препараты для модуляции гамма-дельта Т-клеток

Полиспецифические антитела, как описано в данном документе, могут быть использованы для модулирования или применимы для модулирования Т-клеток с вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) у пациента *in situ* (т.е. *in vivo*). Полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть включены в состав лекарственных препаратов для таких целей.

Модуляция Vδ1 Т-клеток может включать:

- экспансию Vδ1 Т-клеток, т.е. путем селективного увеличения количества Vδ1 Т-клеток или стимуляции выживаемости Vδ1 Т-клеток;

- стимуляцию Vδ1 Т-клеток, например, путем повышения активности Vδ1 Т-клеток, т. е. повышения уничтожения целевых клеток;

- предотвращение истощения Vδ1 Т-клеток, например, за счет увеличения персистенции Vδ1 Т-клеток;

- дегрануляцию Vδ1 Т-клеток;

- увеличение экспрессии NCR;

- иммуномодуляцию Vδ1 Т-клеток, т.е. путем снижения экспрессии Vδ1 TCR на клеточной поверхности, т.е. вызывая интернализацию Vδ1 TCR или снижая экспрессию белка Vδ1 TCR, или блокируя связывание Vδ1 TCR; и/или

- снижение уровня комплекса TCR/CD3.

В отличие от антител к Vδ1 предшествующего уровня техники, которые сосредоточены на истощении Vδ1 Т-клеток, антитела по настоящему изобретению применимы для активации Vδ1 Т-клеток через TRDV1-связывающий домен. Хотя они могут вызывать снижение количества TCR на Т-клетках, с которыми они связываются, они не вызывают истощения Т-клеток Vδ1, а скорее стимулируют Т-клетки и, следовательно, могут быть полезны в терапевтических условиях, которые могут быть полезны при активации этого компартмента Т-клеток. Активация Vδ1 Т-клеток проявляется в снижении количества TCR, снижении количества CD3, изменениях в маркерах активации, таких как CD25 и Ki67, и маркере дегрануляции CD107a. Активация Vδ1 Т-клеток, в свою очередь, запускает высвобождение воспалительных цитокинов, таких как INFɣ и TNFα, для

стимулирования иммунного лицензирования.

Лекарственные препараты, которые модулируют маркеры иммунных клеток на Vδ1+ клетках

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут модулировать маркеры иммунных клеток, таких как Vδ1+ клетки, при введении пациенту.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, также могут быть оценены на предмет их пригодности для терапевтического применения путем измерения модуляции γδ Т-клеток. Например, путем измерения изменения уровней CD25, или CD69, или CD107a, присутствующих на Vδ1+ Т-клетке или клетках в модельной системе. Такие маркеры часто используются в качестве маркеров модуляции лимфоцитов (например, пролиферации или дегрануляции) и могут быть измерены после применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, например, методом проточной цитометрии. Неожиданно во время таких оценок (например, см., например, Примеры 7, 17, 18) было обнаружено, что описанные в данном документе антитела обеспечивают значительно более высокие уровни CD25, или CD69, или CD107a на целевых Vδ1+ Т-клетках. Необязательно, изменение фенотипа Vδ1+ клеток или их популяции, тестируемых в модельной системе, затем можно сравнить с изменением фенотипа при применении альтернативного антитела сравнения (например, OKT-3, TS8.2 и т. д.) к указанным эквивалентным γδ Т-клеткам.

Таким образом, в одном из аспектов изобретения предложен способ оценки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающегося с Vδ1-цепью γδ TCR, для терапевтического применения, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клеточную популяцию, содержащую Vδ1+ клетки, и определение влияние на уровень CD25, и/или CD69, и/или CD107a на поверхности Vδ1+ клеток. Влияние на уровень CD25, CD69 и/или CD107a можно определить/измерить в течение определенного периода времени. Будет понятно, что эффект можно измерить по сравнению с уровнем CD25, и/или CD69, и/или CD107a на поверхности Vδ1+ клетки, когда указанное антитело не применяется к указанной клетке в течение того же периода времени. В еще одном аспекте изобретения предложен способ селекции, характеристики или сравнения полиспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем добавления указанных антител к клеточной популяции, содержащей Vδ1+ клетки, и последующего измерения уровня (или экспрессии) CD25, или CD69, или CD107a на поверхности указанных Vδ1+ клеток.

Лекарственные препараты, которые модулируют свойства роста или количество Vδ1+ клеток

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут модулировать свойства роста Vδ1+ клеток при введении пациенту. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут размножать Vδ1+ клетки.

Альтернативный подход к измерению пролиферации γδ Т может включать

измерение изменения относительного количества Vδ1+ клеток в зависимости от времени при применении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, к модельным системам, содержащим указанные клетки. Удивительно, но в ходе оценивания было замечено, что антитела, описанные в данном документе, способны измеримо увеличивать количество указанных Vδ1+ Т-клеток (например, см. Примеры 10, 17 и 18), по желанию это изменение числа можно затем сравнить с изменением числа, наблюдаемым при применении альтернативного антитела сравнения (например, анти-OKT3) в указанных модельных системах.

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его фрагмента в клеточную популяцию, содержащую Vδ1+ клетки, и определение эффекта на количество Vδ1+ клеток в популяции. Влияние на количество клеток можно определить/измерить в течение определенного периода времени. Будет понятно, что эффект можно измерить по сравнению с эффектом на количество клеток, наблюдаемым, когда указанное антитело не применяется к клеточной популяции в течение того же периода времени. В еще одном аспекте изобретения предложен способ селекции или определения характеристик, или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанных антител к клеточной популяции, содержащей Vδ1+ клетки, и последующего измерения количества указанных клеток в зависимости от времени.

Лекарственные препараты, модулирующие пролиферативный потенциал и количество Vδ1+ клеток

Идеальное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, могут быть такими, которые способны усиливать пролиферацию Vδ1+ клеток *in vivo*. Затем такие антитела можно использовать в качестве лекарственных препаратов, предназначенных для специфического увеличения числа Vδ1+ клеток у субъекта или пациента. Например:

Рак:

Сообщается, что относительное увеличение количества Vδ1+ клеток является положительным прогностическим показателем, связанным с улучшением результатов лечения многих злокачественных новообразований (например, см. Gentles *et al* (2015) Nature Immunology 21: 938-945; Wu et al. (2019) Sci. Trans. Med. 11(513): eaax9364; Catellani et al. (2007) Blood 109(5): 2078-2085). В одном варианте осуществления в данном документе представлен лекарственный препарат, способный увеличивать относительное или абсолютное количество Vδ1+ клеток *in situ* у пациента со злокачественным новообразованием.

Патогенные/паразитарные/вирусные инфекции:

Обогащение Vδ1+ клеток наблюдается во время защиты хозяина от многочисленных приобретенных патогенных/паразитарных/вирусных инфекций. Последний общий обзор см. Zhao *et al.* (2018) Immunol. Res. 2018:5081634. Кроме того, повышенное количество

Vδ1+ также считается показателем защиты против различных ДНК- и РНК-вирусных инфекций. Например, повышенное количество также считается показателем защиты при ЦМВ-инфекциях, связанных с аллогенными трансплантатами (см. van Dorp et al. (2011) Biology of Blood and Marrow Transplantation 17(2): S217). Кроме того, у пациентов с коронавирусной инфекцией увеличивается количество Vδ+ клеток (Poccia et al. (2006) J. Infect. Dis. 193(9): 1244-1249).

В еще одном варианте осуществления в данном документе представлен лекарственный препарат, способный увеличивать относительное или абсолютное количество Vδ1+ клеток у субъекта или пациента с патогенной инфекцией.

Трансплантация стволовых клеток:

Увеличение количества Vδ1+ клеток также было связано с меньшим количеством рецидивов заболевания, меньшим количеством вирусных инфекций, более высокой общей и безрецидивной выживаемостью и благоприятными клиническими исходами в целом во время трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (например, см. Aruda et al. (2019) Blood 3(21): 3436-3448 and see Godder et al. (2007) Bone Marrow Transplantation 39: 751-757). Следовательно, другой вариант осуществления, представленный в данном документе, представляет собой лекарственный препарат, способный увеличивать относительное или абсолютное количество Vδ1+ клеток у субъекта как часть схемы лечения, поддерживающей трансплантацию стволовых клеток.

Следовательно, лекарственный препарат, способный предпочтительно или специфически увеличивать количество Vδ1+ клеток *in situ*, является весьма желательным.

Лекарственные препараты, которые поддерживают, индуцируют или увеличивают секрецию цитокинов Vδ1+ клетками

Цитокины представляют собой большую группу белков, пептидов или гликопротеинов, которые секретируются специфическими клетками иммунной системы. Они представляют собой категорию сигнальных молекул, которые опосредуют и регулируют иммунитет, воспаление и кроветворение. Ряд цитокинов участвует в уменьшении признаков и симптомов заболевания посредством прямой или косвенной модуляции опухолевого и клеточного микроокружения, аутоиммунной ткани и связанного с ней микроокружения или инфицированной вирусом ткани или клеточного окружения. Примеры провоспалительных цитокинов включают фактор некроза опухоли-альфа (TNFα) и интерферон-гамма (IFNγ).

Однако многие такие цитокины проявляют неблагоприятную токсичность при системном введении. Например, в то время как TNFα может вызывать геморрагический некроз трансплантированных опухолей и, как сообщается, оказывает синергическое противоопухолевое действие в сочетании с другими химиотерапевтическими препаратами, различные клинические испытания рекомбинантного человеческого TNFα (rhTNFα) для системного введения выявили значительные дозолимитирующие побочные эффекты, включая гипотонию, ригидность, флебит, тромбоцитопению, лейкопению и гепатотоксичность, лихорадку, утомляемость, тошноту/рвоту, недомогание и слабость,

головную боль, чувство сдавленности в груди, боль в пояснице, диарею и одышку.

Применение рекомбинантного IFNγ также сопряжено с аналогичными проблемами системной токсичности. Например, при злокачественном новообразовании IFNγ может оказывать благоприятные плейотропные эффекты, включая повышенную регуляцию MHC класса I и II для стимуляции противоопухолевого иммунитета, увеличения инфильтрации Т-клеток, усиление антиангиогенного эффекта, индуцирование секреции хемокинов/цитокинов и оказание прямого антипролиферативного эффекта на раковые клетки, также наблюдаются неблагоприятные побочные эффекты. К ним относятся лихорадка, головная боль, озноб, утомляемость, диарея, тошнота, рвота, анорексия, транзиторное повышение активности печеночных трансаминаз и транзиторное снижение количества гранулоцитов и лейкоцитов.

В недавнем обзоре о потенциале и ограничениях системных рекомбинантных TNFα и IFNγ см. в Shen et al. (2018) Cell Prolif. 51(4): e12441.

Следовательно, существует потребность в более контролируемой *in situ*, более локализованной, более специфичной для тканей или клеток продукции таких цитокинов. Например, в качестве одного из подходов предлагается более контролируемая экспрессия или индукция провоспалительных цитокинов, с помощью которой «холодные» опухоли можно превратить в «горячие». Горячие опухоли также иногда называют «воспаленными Т-клетками» из-за наблюдаемого увеличения количества или плотности CD45+ Т-клеток. См. Bonaventura et al. (2019) Front. Immunol. 10: 168 для ознакомления с последним обзором.

По этим причинам идеальным терапевтическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в данном документе, которое связывается с Vδ1-цепью γδ TCR, может быть такое антитело, которое может поддерживать, усиливать или индуцировать секрецию цитокинов в Vδ1+ клетках *in vivo*. Затем такие антитела можно использовать в качестве лекарственных препаратов, предназначенных для специфического увеличения или индукции цитокинов у субъекта или пациента и более локализованным, менее системным образом, который лучше коррелирует с распределением Vδ1+ клеток у указанного субъекта или пациента.

Примечательно, что когда описанных в данном документе антител, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, применяются к Vδ1+ клеткам, наблюдается значительно более высокий уровень секретируемых цитокинов. Более конкретно, и в качестве неограничивающего примера, наблюдается значительно более высокий уровень TNFα и IFNγ. См., например, Пример 15.

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клеточную популяцию, содержащую Vδ1+ клетки, и определение количества по крайней мере одного цитокина, продуцируемого клеточной популяцией. Количество продуцируемого цитокина можно определить/измерить за определенный период времени и, необязательно, сравнить с количеством, наблюдаемым, когда указанное антитело не применяют к клеточной

популяции в течение того же периода времени. В одном варианте осуществления наблюдаемый уровень цитокина, продуцируемого при введении антитела в клеточную популяцию, составляет более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 50%, более чем около 100%, более чем около 150%, более чем около 200%, более чем около 250%, более чем около 300%, более чем около 350%, более чем около 400%, более чем около 450%, более чем около 500%, более чем около 1000% по отношению к уровню продукции цитокинов, когда антитело не применяется. В дополнительном аспекте изобретения цитокин представляет собой провоспалительный цитокин. В дополнительном аспекте изобретения цитокин представляет собой цитокин TNF-α. В дополнительном аспекте изобретения речь идет о цитокине IFN-γ.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ селекции, или определения характеристик или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанных антител к клеточной популяции, содержащей Vδ1+ клетки, и последующего измерения уровня по меньшей мере одного образовавшегося цитокина. В дополнительном аспекте изобретения измеряемый цитокин представляет собой цитокин TNF-α и/или цитокин IFN-γ.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к клеточной популяции, содержащей Vδ1+ клетки, и измерения эффект антитела на модулирование более холодной или холодной опухоли, чтобы она стала более горячей или горячей опухолью, путем определения количества продуцируемых провоспалительных цитокинов и/или количества или плотности CD45+ Т-клеток, присутствующих в опухоли или микроокружении опухоли.

Лекарственный препарат, которые поддерживают, индуцируют или повышают активность гранзима В Vδ1+ клеток

Гранзим В представляет собой сериновую протеазу, обычно встречающуюся в гранулах натуральных клеток-киллеров (NK-клеток) и цитотоксических Т-клеток. Он секретируется этими клетками вместе с порообразующим белком перфорином, чтобы опосредовать апоптоз в целевых клетках, таких как пораженные клетки.

Когда Vδ1+ клетки инкубируют в совместных культурах с пораженными целевыми клетками (такими как раковые клетки) в модельных системах, уровни и активность гранзима В можно измерить в пораженных целевых клетках до лизиса. Примечательно, что когда антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, которое связывается с Vδ1-цепью γδ TCR, то применяется к таким совместным культурам Vδ1+ клеток и раковых клеток в таких модельных системах, в пораженных раковых клетках наблюдается более высокий уровень и активность гранзима В, что предшествует гибели клеток (см., например, Пример 16).

Следовательно, в другом аспекте изобретения предложен способ оценки антитела

или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью TCR γδ, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в совместную культуру, содержащую Vδ1+ клетки и пораженные клетки (такие как раковые клетки), и измерение влияния на количество гранзима B, продуцируемого пораженными клетками в совместной культуре. Количество продуцируемого цитокина можно определить/измерить в течение определенного периода времени и, необязательно, сравнить с количеством, наблюдаемым, когда указанное антитело не применялось к указанным совместным культурам в течение того же периода времени. В одном варианте осуществления уровень гранзима B, измеренный при применении указанного антитела к указанной совместной культуре, составляет более около 10%, более около 20%, более около 30%, более около 40%, более около 50%, более около 70%, более около 80%, более около 90%, более около 100%, более около 200% относительно уровня гранзима B, наблюдаемого, когда указанное антитело не применяется.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ селекции или определения характеристик или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанных антител к совместной культуре, содержащей Vδ1+ клетки и пораженные клетки, и затем измерения количества или активности гранзима B в пораженной клетке.

Лекарственные препараты, которые способствуют экспансии популяций поликлональных Vδ1+ клеток

Идеальный лекарственный препарат на основе антитела также может быть разработан для обеспечения того, чтобы размножающиеся Vδ1+ клетки не становились слишком клональными на уровне гипервариабельной последовательности CDR3. Следовательно, идеальный лекарственный препарат на основе антител может быть разработан таким образом, чтобы избежать индукции пролиферации Vδ1+ клеток путем связывания со специфическими или «частными» паратопами последовательности CDR3 δ1+. Скорее, антитело может связываться через консервативные последовательности зародышевой линии, присутствующие на всех рецепторах Vδ1+ Т-клеток, и независимым от гамма-цепи образом, а не связываться с последовательностями, презентированными только субпопуляцией Vδ1+ клеток.

Следовательно, идеальный лекарственный препарат на основе антител может стимулировать экспансию Vδ1+ клеток с образованием множества Vδ1+ клеток, содержащих смесь последовательностей CDR3. Это, в свою очередь, привело бы к количественно увеличенной *in vivo* гетерогенной поликлональной популяции Vδ1+ клеток, демонстрирующих различные последовательности CDR3 на вариабельных доменах дельта-цепи 1. Примечательно, что во время анализа количественно увеличенных популяций Vδ1+ клеток, полученных методом добавления антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, к исходной популяции иммунных клеток, содержащей Vδ1+ клетки, наблюдается экстенсивная поликлональность с помощью

методологий, основанных на РНК-секвенировании, разработанных для секвенирования по гипервариабельным областям CDR3 выделенной РНК (см., например, Пример 10).

Соответственно, в одном аспекте предложен способ оценки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в популяцию клеток, содержащую Vδ1+ клетки, и определение поликлональности размноженных Vδ1+ клеток. Предпочтительно, чтобы лекарственный препарат на основе антител способствовал получению увеличенной количественно поликлональной популяции, содержащей множество последовательностей CDR3 Vδ1+. Поликлональность можно определить с использованием способов, известных в данной области техники, таких как подходы к секвенированию нуклеиновых кислот, позволяющие анализировать содержание гипервариабельных CDR3 Vδ1-цепи в указанных Vδ1+ клетках.

Лекарственные препараты, которые способствуют экспансии поликлональных Vδ1+ клеток в течение длительных периодов времени

Идеальный лекарственный препарат на основе антитела может усиливать или способствовать, или стимулировать пролиферацию первичных Vδ1+ клеток без истощения таких клеток *in vivo*. Например, для сравнения, лекарственные препараты на основе антител к CD3, такие как OKT3 (например, муромонаб), хотя и способны увеличивать количество CD3-положительных Т-клеток, могут также истощать или вызывать анергию. Для оценки способности антител, как описано в данном документе и которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, стимулировать непрерывное клеточное деление жизнеспособных Vδ1+ клеток, были проведены более длительные исследования пролиферации. Примечательно, что эти исследования показали, что антитела, как описано в данном документе, и антитела, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, способны управлять клеточным делением/пролиферацией жизнеспособных и все еще функционально цитотоксических Vδ1+ клеток в течение более 40 дней (см., например, Пример 10).

В одном варианте осуществления предложен способ оценки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к популяции клеток и отслеживание продолжительности времени, в течение которого происходит деление Vδ1+ клеток . В идеале антитело способно стимулировать деление Vδ1+ клеток в течение периода от 5 до 60 дней, например, по меньшей мере, от 7 до 45 дней, от 7 до 21 дня или от 7 до 18 дней.

В другом варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR и которые при введении пациенту способны стимулировать деление Vδ1+ клеток, увеличивая количество в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 25 раз, по меньшей мере 50 раз, по меньшей мере 60 раз, по меньшей мере 70 раз, по меньшей мере 80 раз, по меньшей мере 90 раз, по меньшей мере 100 раз, по меньшей мере 200 раз, по меньшей мере 300 раз, по меньшей мере

400 раз, по меньшей мере 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 1000 раз.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ селекции или определения характеристик, или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанных антител к Vδ1+ клеткам или смешанной популяцию клеток, содержащей Vδ1+ клетки, и затем измерения количества Vδ1+ клеток в зависимости от времени.

Лекарственные препараты, которые модулируют иммунные клетки, отличные от Vδ1+ клеток, путем нацеливания на Vδ1+ иммунные клетки

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения модуляции, опосредованной Vδ1+ клетками, других иммунных клеток. Например, изменение, наблюдаемое во «фракции» Т-клеток, отличных от γδ Т-клеток, можно измерить после применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, в модельной системе, содержащей смешанную популяцию иммунных клеток, такой как система, содержащая αβ клетки ткани человека и γδ Т-клетки. Кроме того, эффект на типы Т-клеток, отличных от γδ клеток, в указанных моделях можно измерить с помощью проточной цитометрии. Например, путем измерения относительного изменения количества CD8+ αβ Т-клеток при добавлении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, к смешанным культурам, содержащим γδ Т-клетки и Т-клетки, отличные от γδ Т-клеток. Необязательно наблюдаемое изменение количества или фенотипа популяции CD8+ лимфоцитов, отличных от γδ Т-клеток, затем можно сравнить с изменением количества, когда к указанной смешанной популяции применяется альтернативное антитело сравнения (например, OKT-3).

Следовательно, в другом аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в смешанную популяцию иммунных клеток или тканей, содержащих Vδ1+ клетки и Vδ1-отрицательные иммунные клетки и измерение влияния на Vδ1-отрицательные иммунные клетки. Эффект можно определить/измерить в течение определенного периода времени и, необязательно, сравнить с эффектом, наблюдаемым для Vδ1-отрицательных клеток, когда указанное антитело не применяется в течение того же периода времени. Эффект можно измерить как изменение количества Vδ1-отрицательных иммунных клеток. Например, антитело может увеличить количество Vδ1-отрицательных иммунных клеток более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 40%, более чем около 50%, более чем около 70%, более чем около 80%, более чем около 90%, более чем около 100%, более чем около 500% относительно уровней, наблюдаемых, если указанное антитело не применяется.

В дополнительном аспекте изобретения модулируемая Vδ1-отрицательная клетка представляет собой CD45+ клетку. В дополнительном аспекте изобретения модулируемая

клетка представляет собой αβ Т-клетку. В дополнительном аспекте изобретения модулируемая αβ+ клетка представляет собой CD8+ лимфоцит. В дополнительном аспекте изобретения модулируемые αβ Т-клетки или их популяция проявляют признаки усиленного клеточного деления. В дополнительном аспекте изобретения предложен способ селекции или определения характеристик или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем введения указанных антител в популяцию смешанных иммунных клеток, содержащих Vδ1+ клетки и Vδ1-отрицательные иммунные клетки, а затем измерение эффекта, оказываемого на Vδ1-отрицательную клеточную популяцию Vδ1+ клетками, модулированными указанными полиспецифическими антителами или их антигенсвязывающими фрагментами.

Необязательно и во время «опосредованной Vδ1+ клетками модуляции иммунной системы», которая обеспечивается антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в данном документе, также наблюдается сопутствующее увеличение количества Vδ1+ клеток. И хотя это не связано с этой теорией, возможно, что указанное увеличение числа Vδ1+ клеток может быть причиной сопутствующей экспансии одновременно присутствующих Vδ1-отрицательных иммунных клеток, таких как αβ Т-клетки. Альтернативная гипотеза может заключаться в том, что индуцированная антителами секреция цитокинов Vδ1+ Т-клетками стимулирует экспансию Vδ1-отрицательных иммунных клеток.

В дополнительном аспекте изобретения наблюдаемое увеличение популяции αβ+ CD8+ лимфоцитов сравнивают с антителом сравнения, таким как антитело OKT3 или альтернативное антитело к Vδ1. В еще одном аспекте изобретения предложен способ селекции, характеристики или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в настоящем документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанных антител к популяции смешанных иммунных клеток, содержащих Vδ1+ Т- клеток и αβ Т-клеток, а затем измеряли количество CD8+ αβ+ лимфоцитов в зависимости от времени.

Лекарственные препараты, которые модулируют инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL)

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения эффекта, оказываемого на инфильтрирующие опухоль популяции (TIL) в модельных системах. Неожиданно (см., например, Пример 18) во время таких исследований антитела, как описано в данном документе, заметно модулировали популяции TIL в опухолях человека. Например, изменение количества или фенотипа популяции TIL γδ+ лимфоцитов или популяции TIL, отличных от γδ лимфоцитов, измеряют после применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, к опухоли человека, такой как почечно-клеточная карцинома человека. Необязательно наблюдаемое изменение числа или фенотипа либо популяции TIL γδ+-лимфоцитов, либо популяции TIL, отличных от γδ лимфоцитов, можно затем сравнить

с изменением, наблюдаемым при применении альтернативного антитела сравнения (например, OKT-3) к указанной модельной системе.

Следовательно, в еще одном аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в TIL, расположенные в опухоли человека или полученные из нее, и определение эффекта на количество TIL. Эффект можно определить/измерить в течение определенного периода времени и, необязательно, можно сравнить с числом TIL, наблюдаемым, если указанное антитело не применялось в течение того же периода времени. Эффектом может быть увеличение количества TIL. Например, антитело может увеличить количество TIL на более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 40%, более чем около 50%, более чем около 70%, более чем около 80%, более чем около 90%, более чем около 100% относительно количества TIL, наблюдаемых, если указанное антитело не применялось. В другом аспекте, TIL, для которых отмечено указанное количество, представляют собой γδ+ лимфоциты TIL и/или TIL, отличные от γδ клеток.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ выбора или определения характеристик, или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью клеток с γδ TCR, путем применения указанных антител к TIL или TIL, расположенным в или происходящим из опухоли человека, и последующего измерения изменения количества клеток TIL или TIL в течение определенного периода времени.

Лекарственные препараты, которые модулируют цитотоксичность человеческих Vδ1+

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения эффекта на опосредованную Vδ1+ клеточную цитотоксичность. Неожиданно, во время таких оценок антител, как описано в данном документе, (например, см., например, Примеры 19 и 27), наблюдалась заметно повышенная Vδ1+-опосредованная клеточная цитотоксичность. Например, после применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в модельной системе, содержащей смешанную культуру, содержащую Vδ1+ клетки и указанные раковые клетки, наблюдается снижение количества раковых клеток или увеличение количества убитых раковых клеток. Необязательно, снижение количества раковых клеток или увеличение количества убитых раковых клеток можно затем сравнить с результатом, когда к указанным модельным системам применяется альтернативное антитело сравнения (например, OKT-3).

Следовательно, в еще одном аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к смешанной популяции клеток, состоящей из Vδ1+ клеток и раковых клеток, и измерение цитотоксичности Vδ1+ клеток по отношению к раковым клеткам. Цитотоксичность может быть измерена по увеличению количества мертвых раковых клеток в течение

определенного периода времени, необязательно по сравнению с количеством мертвых раковых клеток, наблюдаемым, если указанное антитело не применялось к смешанной популяции клеток в течение того же периода времени. Например, наблюдаемое увеличение количества мертвых клеток при применении указанного антитела может составлять более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 40%, более чем около 50%, более чем около 70%, более чем около 80%, более чем около 90%, более чем около 100%, более чем около 200%, более чем около 500% относительно количества мертвых клеток, наблюдаемых, если указанное антитело не применяется.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ селекции или определения характеристик, или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью клеток с γδ TCR, путем добавления указанных антител к указанной популяции смешанных иммунных клеток, содержащих Vδ1+ клеток человека и раковых клеток, и последующего измерения увеличения количества мертвых раковых клеток в зависимости от времени.

Лекарственные препараты, которые модулируют соотношение целевых клеток и Vδ1+ эффекторных клеток (соотношения T:E)

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения того, как указанные антитела усиливают опосредованную Vδ1+ цитотоксичность для раковых клеток, путем определения соотношения целевых клеток и эффекторных клеток, при котором 50% целевых клеток (EC50) погибают в модельной системе для оценки указанных антител в качестве потенциальных лекарственных препаратов. Например, смешанные культуры, содержащие целевые раковые клетки с Vδ1+ эффекторными клетками человека. Неожиданно во время таких исследований (например, см., например, Пример 19) антитела, как описано в данном документе, положительно изменяют соотношение EC50 T:E в модельных системах. Такие модификации могут быть измерены как количество Vδ1+ клеток, необходимое для наблюдения 50% уничтожения раковых клеток в течение определенного времени. Об этом также можно сообщать как об изменении, или как многократное улучшение, или как процентное улучшение цитотоксичности по отношению к указанным раковым клеткам. Необязательно соотношение T:E, придаваемое антителами по настоящему изобретению, можно затем сравнить с соотношениями T:E, когда к указанным модельным системам применяется альтернативное антитело сравнения (например, OKT-3). В некоторых сценариях полиспецифические антитела по изобретению предоставляют возможности для повышения цитотоксичности для раковых клеток даже при более низких соотношениях E:T по сравнению с моноспецифическими антителами.

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к популяции смешанных клеток, содержащей Vδ1+ клетки человека и раковые клетки, и измерение количества Vδ1+ клеток, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток. Это может

быть измерено относительно количества Vδ1+ клеток, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток без применения указанного антитела, необязательно за тот же период времени. Например, снижение количества Vδ1+ клеток, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток, при применении указанного антитела может составлять более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 40%, более чем около 50%, более чем около 70%, более чем около 80%, более чем около 90%, более чем около 100%, более чем около 200%, более чем около 500% относительно требуемого количества Vδ1+ клеток для уничтожения 50% раковых клеток, если указанное антитело не применяется.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ селекции или определения характеристик, или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью, путем добавления указанных антител к указанной популяции клеток, состоящей из Vδ1+ клеток и раковых клеток, и последующего измерения количества Vδ1+ клеток, необходимое для уничтожения 50% раковых клеток.

Лекарственные препараты, которые усиливают цитотоксичность Vδ1+ клеток в EC50

Альтернативный способ измерения наблюдаемой повышенной цитотоксичности Vδ1+ клеток человека или их популяции состоит в измерении количества клеток, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток в течение заданного периода времени в условиях A (например, в начальном контроле), и сравнении этого к количеству клеток, необходимому для уничтожения 50% раковых клеток в течение установленного периода времени в условии B (например, при применении антитела по изобретению, как описано в данном документе).

Хотя известно, что существует множество способов измерения таких параметров, для облегчения понимания будет приведен следующий неограничивающий гипотетический пример:

Гипотетически, усиление цитотоксичности эффекторных клеток может быть измерено следующим образом:- в условии A (контрольная обработка) наблюдается, что 1000 Vδ1+ клеток требуется для уничтожения 50% раковых клеток в течение заданного периода времени (например, 5 часов). В условии B (например, применение антитела по изобретению, описанного в данном документе) наблюдается, что требуется 500 Vδ1+ клеток для уничтожения 50% раковых клеток за тот же период времени. Следовательно, в этом примере применение антител увеличило цитотоксичность Vδ1+ клеточной популяции на 200%:

(1000/500) x 100= 200%

Например (см., например, Примеры 19-21), к удивлению, такое процентное увеличение наблюдалось для полиспецифических антител по изобретению, как описано в данном документе.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ селекции или

определения характеристик, или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем добавления указанных антител к указанной смешанной популяции иммунных клеток, содержащей Vδ1+ клетки и раковые клетки, и определения относительного или процентного изменения цитотоксичности по сравнению с эквивалентным или контрольным экспериментом, в котором указанное антитело не применялось к указанной смеси клеток.

Лекарственные препараты, которые повышают специфичность Vδ1+ клеток для пораженных клеток, сохраняя при этом здоровые клетки

Другой подход к оценке их осуществления полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, как описано в данном документе, заключается в измерении того, как указанные антитела модулируют цитотоксичность, специфичную для пораженных клеток. Неожиданно в ходе таких исследований было обнаружено, что такие антитела могут специфически усиливать специфическое уничтожение Vδ1+ клетками пораженных леток, таких как раковые клетки (например, см. Примеры 19 и 27), при этом сохраняя здоровые или непораженные клетки. Идеальные лекарственные препараты на основе антител, вводимые пациенту для облегчения симптома злокачественного новообразования, будут придавать повышенную цитотоксичность конкретно по отношению к пораженным клеткам, сохраняя при этом здоровые клетки. И можно сказать, что лекарственные препараты, которые усиливают цитотоксичность эффекторных клеток конкретно по отношению к пораженным клеткам, таким как раковые клетки, демонстрируют повышенный терапевтический индекс (TI) по сравнению с лекарственными препаратами, которые не повышают селективно цитотоксичность эффекторных клеток конкретно по отношению к указанным пораженным клеткам. Терапевтический индекс также называют терапевтическим соотношением и представляет собой количественную меру относительной безопасности лекарственного средства. Это сравнение количества терапевтического агента, который вызывает терапевтический эффект, с количеством, вызывающим токсичность, т.е. вызывая нежелательную гибель родственных или соответствующих здоровых клеточных популяций. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, можно оценить путем измерения его способности изменять или усиливать или многократно улучшать способность Vδ1+ клеток селективно убивать пораженные клетки по сравнению со здоровыми клетками в модельных системах. Например, указанные модельные системы могут содержать Vδ1+ эффекторные клетки, раковые клетки и контрольные клетки (такие как здоровые клетки). Необязательно, кратное улучшение селективного уничтожения пораженных клеток, обеспечиваемое полиспецифическими антителами по изобретению, затем можно сравнить с кратным улучшением, наблюдаемым при применении альтернативного антитела сравнения (например, OKT-3) к указанным модельным системам.

Специфичность к пораженным клеткам и усиление специфичности к пораженным клеткам Vδ1+ клеток можно измерить в культурах, содержащих Vδ1+ клетки, пораженные клетки и здоровые клетки. Например, специфичность Vδ1+ к пораженным клеткам можно

измерить, путем определения количество раковых клеток, убитых Vδ1+ клетками, и последующего сравнения количества здоровых клеток, убитых Vδ1+ клетками. Такие сравнения можно контролировать, включив эквивалентное количество пораженных клеток и здоровых клеток в модельную систему, также содержащую Vδ1+ клетки, например, «тройные культуры». Также можно рассмотреть альтернативную методологию сравнения, например, когда аналитические или аппаратные ограничения снижают способность различать и отслеживать все три или более типов клеток параллельно в одном анализе (включая Vδ1+ клетки, пораженные клетки и непораженные клетки). В указанных случаях сравнение цитотоксичности Vδ1+ клеток по отношению к пораженным клеткам в одном эксперименте, а затем сравнение цитотоксичности Vδ1+ клеток по отношению к здоровым клеткам в отдельном эквивалентном эксперименте предлагает альтернативный подход к таким исследованиям.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клеточную популяцию, содержащую Vδ1+ клетки и целевые клетки, и измерение цитотоксической специфичности клеток по отношению к целевым клеткам. В одном варианте осуществления специфичность клеточной цитотоксичности для первого типа целевых клеток можно сравнить с цитотоксичностью, наблюдаемой для второго типа целевых клеток, поэтому способ можно повторить с использованием разных типов целевых клеток. В дополнительном аспекте изобретения первый тип целевых клеток представляет собой пораженные клетки, а второй тип целевых клеток представляет собой контрольные клетки, такие как здоровые клетки или клетки с заболеванием, отличным от заболевания для первого типа целевых клеток.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ селекции или определения характеристик, или сравнения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, при этом эффект, оказываемый указанным антителом на цитотоксичность Vδ1+ клеток для (i) измеряют и сравнивают первый тип клеток и (ii) второй тип клеток. В дополнительном аспекте изобретения таким образом выбирают антитело, которое усиливает специфическую цитотоксичность по отношению к первому типу клеток в большей степени, чем по отношению ко второму типу клеток. В дополнительном аспекте изобретения первый тип клеток представляет собой пораженную клетку, а второй тип клеток представляет собой здоровую клетку.

Как описано в данном документе, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, используемые в анализах, могут присутствовать на поверхности, например, поверхности клетки, такой как клетка, содержащая Fc-рецептор. Например, полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут присутствовать на поверхности клеток THP-1, таких как клетки TIB-202™ (доступны от Американской коллекции типовых культур (ATCC)). В альтернативном варианте полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно

непосредственно использовать в анализах.

В таких функциональных анализах выход можно измерить путем расчета полумаксимальной концентрации, также называемой «EC50» или «эффективная концентрация при 50 процентах». Термин «IC50» относится к ингибирующей концентрации. EC50 и IC50 можно измерить с помощью способов, известных в данной области техники, таких как способы проточной цитометрии. В некоторых случаях EC50 и IC50 являются одним и тем же значением или могут считаться эквивалентными. Например, эффективная концентрация (EC) эффекторных клеток, необходимая для ингибирования (например, уничтожения) 50% определенного типа клеток, также может считаться 50%-ной ингибирующей концентрацией (IC). Во избежание сомнений, значения EC50 в настоящей заявке приведены с помощью антитела в формате IgG1, когда речь идет об антителе. Такие значения можно легко преобразовать на основании молекулярной массы формата антитела в эквивалентные значения следующим образом:

(мкг/мл) / (мол. масса в кДа)=мкМ

EC50 для снижения уровня γδ TCR при связывании с антителом (или фрагментом) для исходных клонов, описанных в данном документе, может составлять менее чем 0,50 мкг/мл, например, менее чем 0,40 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,15 мкг/мл, 0,10 мкг/мл, 0,06 мкг/мл или 0,05 мкг/мл. В предпочтительном варианте осуществления EC50 для снижения уровня γδ TCR при связывании с антителом (или его фрагментом) составляет менее чем 0,10 мкг/мл. В частности, EC50 для снижения уровня γδ TCR при связывании антитела (или его фрагмента) может составлять менее чем 0,06 мкг/мл, например, менее чем 0,05 мкг/мл, 0,04 мкг/мл или 0,03 мкг/мл. В частности, указанные значения EC50 имеют место тогда, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение EC50 снижения уровня γδ TCR можно измерить с помощью проточной цитометрии (*например*, как описано в анализе из примеров 6 и 27).

Значение EC50 при дегрануляции γδ Т-клеток при связывании с антителом (или фрагментом) может составлять менее чем 0,050 мкг/мл, например, менее чем 0,040 мкг/мл, 0,030 мкг/мл, 0,020 мкг/мл, 0,015 мкг/мл, 0,010 мкг/мл или 0,008 мкг/мл. В частности, значение EC50 при дегрануляции γδ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) может составлять менее чем 0,005 мкг/мл, например, менее чем 0,002 мкг/мл.В предпочтительном варианте осуществления значение EC50 при дегрануляции γδ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) составляет менее чем 0,007 мкг/мл. В частности, указанные значения EC50 имеют место тогда, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение EC50 при дегрануляции γδ Т-клеток можно измерить путем обнаружения экспрессии CD107a (*т. е.* маркера дегрануляции клеток) с помощью проточной цитометрии (*например*, как описано в анализе Примера 7). В одном варианте осуществления экспрессию CD107a измеряют с помощью антитела анти-CD107a, такого как антитело BV421 против человеческого CD107a (клон H4A3) (BD Biosciences).

Значение EC50 при уничтожении γδ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) может составлять менее чем 0,50 мкг/мл, например, менее чем 0,40 мкг/мл,

0,30 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,15 мкг/мл, 0,10 мкг/мл или 0,07 мкг/мл. В предпочтительном варианте осуществления значение EC50 при уничтожении γδ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) составляет менее чем 0,10 мкг/мл.В частности, значение EC50 при уничтожении γδ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) может составлять менее чем 0,060 мкг/мл, например, менее чем 0,055 мкг/мл, в частности менее чем 0,020 мкг/мл.В частности, указанные значения EC50 имеют место тогда, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение EC50 при уничтожении γδ Т-клеток можно измерить путем определения доли мертвых клеток (т. е. с использованием красителя для определения жизнеспособности клеток) с помощью проточной цитометрии после инкубации антитела, γδ Т-клеток и целевых клеток (например, как описано в анализе из Примера 8). В одном варианте осуществления уничтожение целевых клеток измеряют с помощью красителя для оценки жизнеспособности клеток Viability Dye eFluor™ 520 (ThermoFisher).

В анализах, описанных в этих аспектах, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут присутствовать на поверхности клетки, такой как клетка THP-1, например, TIB-202™ (ATCC). Клетки THP-1 необязательно помечены красителем, таким как CellTracker™ Orange CMTMR (ThermoFisher).

Лекарственные препараты, которые снижают уровень молекул CD3, ассоциированных с Vδ1 TCR.

В данном документе представлены антитела, которые по-разному взаимодействуют с комплексом Т-клетка/CD3. В частности, эти антитела могут взаимодействовать через домен TRDV1 TCR Vδ1, экспрессируемых только на Vδ1+ клетках. При этом такие лекарственные препараты действуют по-разному. В свою очередь, это событие взаимодействия может снижать количество ассоциированных с TCR комплексов молекул CD3. Такое снижение количества CD3 может быть синонимом активации Т-клеток. Однако при таком взаимодействия с комплексом Т-клетка/CD3 через домен TRDV1 снижается уровень только ассоциированных с Vδ1 TCR молекул CDR3. Этот механизм наглядно показан на Фиг. 29.

Таким образом, в одном варианте осуществления предложен способ снижения количества TRDV1-содержащего Vδ1 TCR и связанного с ним комплекса молекул CD3 на поверхности клетки с антителом, а также применение таких антител для этой цели.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе также представлены полиспецифические TCE, способные взаимодействовать с комплексом Т-клетка/CD3 через домен TRDV1. Современные лекарственные препараты в формате полиспецифических TCE обычно взаимодействуют с Т-клеткой и активируют ее посредством событий связывания CD3. Это может привести к снижению уровней комплексов молекул CD3 на поверхности Т-клетки. Однако также хорошо известно, что TCE также могут чрезмерно стимулировать Т-клетки посредством такого взаимодействия и подавления. Комплексы молекул CD3 не специфичны для одного типа Т-клеток и, следовательно, не являются точной мишенью, на которую можно нацеливаться. Стимуляция всех Т-клеток (в основном подтипа αß) через

CD3 может, в свою очередь, привести к сверхвыработке цитокинов, что приведет к острым цитокиновым штормам (так называемым гиперцитокинемией). Кроме того, в нецелевых подходах, которые взаимодействуют со всеми Т-клетками и активируют их через CD3, как это ни парадоксально, Т-клетки могут стать чрезмерно активными, что приводит к хроническому истощению Т-клеток и/или гибели Т-клеток. Действительно, эта неспецифическая активация пан-Т-клеток приводит к активации как эффекторных, так и регуляторных Т-клеток, тогда как представленный в настоящее время подход специфически взаимодействует с эффекторной популяцией. Поэтому такой подход по типу «кувалды» далеко не идеален, когда необходимо повысить уровень регуляции только селективных Т-клеток.

Напротив, в данном документе представлены полиспецифические антитела, в частности привлекающие Т-клетки активаторы, которые по-разному взаимодействуют с комплексом Т-клетка/CD3. В частности, эти TCE могут взаимодействовать через домен TRDV1 Vδ1 TCR, экспрессируемых только на Vδ1+ клетках. При этом такие лекарственные препараты на основе TCE действуют по-разному. Во-первых, эти TCE способны снижать количество TCR посредством взаимодействия с эпитопом TRDV-1. В свою очередь, это событие взаимодействия снижать количество ассоциированных с TCR комплексов молекул CD3. Такое снижение количества CD3 может быть синонимом активации Т-клеток. Однако при таком взаимодействия с комплексом Т-клетка/CD3 через домен TRDV1 снижается уровень только ассоциированных с Vδ1 TCR молекул CDR3. Этот подход специфического нацеливания и активации Vδ1 клеток позволяет избежать многих из вышеперечисленных проблем (например, цитокиновый шторм, истощение/деплеция Т-клеток и ADCC). Опять же, этот механизм наглядно показан на Фиг. 29.

Стимуляция Т-клеток с помощью «кувалды» для CD3 также может способствовать истощению Т-клеток с помощью механизмов, управляемых Fc-гамма-рецептором, таких как ADCC. Поэтому большинство нацеленных на CD3 биспецифических антител, которые в настоящее время используются в клинической практике, имеют домены Fc со сниженной активностью связывания с FcγR или преднамеренно представляют собой биспецифические фрагменты без области Fc. Терапия, нацеленная на CD3, также может иметь сниженную аффинность связывания плеча, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора.

Это снижение сходства может привести к снижению эффективности и меньшей опциональности с точки зрения дизайна и функциональности TCE. Например, известно, что аффинность связывающих доменов в таких TCE определяет профиль распределения in vivo. В частности, как правило, наблюдается, что распределение TCE смещено в сторону мишени с наивысшей аффинностью. Следовательно, за счет снижения аффинности связывающего домена TCE к Т-клеточному комплексу обычно происходит смещение распределения от Т-клеток - тех самых клеток, которые необходимы для обеспечения эффективности таких TCE. Частично по этим причинам терапевтические окна для TCE были названы «запредельно узкими». Представленный в данном документе подход специально нацеливается и активирует vδ1 клетки, избегая необходимости устранения функции Fc или

снижения аффинности. Это показано, например, на Фиг. 37 и в Примере 15, которые демонстрируют потенциал дальнейшего снижения дозолимитирующей кожной токсичности по сравнению, например, с вариантами EGFR с более высокой аффинностью по данному изобретению.

Кроме того, в представленном в данном документе подходе антитела взаимодействуют с TCR vδ1 клеток, но полная активация происходит только в присутствии опухолевых клеток. Полное взаимодействие представленных в настоящее время антител с TCR приводит к частичному снижению количества, и vδ1 клетки, связанные с представленными в настоящее время антителами, становятся полностью активированными и становятся цитотоксическими только в микроокружении опухоли. Это представляет собой еще одно жизненно важное преимущество с точки зрения безопасности для настоящего подхода, поскольку нецелевая цитотоксичность снижается, а полная эффективность настоящих антител для активации vδ1 клеток проявляется только в присутствии опухолевых клеток.

Считается, что один из механизмов, лежащих в основе способности γδ Т-клеток обнаруживать сигналы стресса на опухолевых клетках, связан с NCR (рецепторами естественной цитотоксичности), которые они экспрессируют. NCR способны взаимодействовать с лигандами NCR на опухолевых клетках. Таким образом, используется двойной механизм активации, при котором γδ Т-клетки активируются посредством стимуляции TCR, а NCR распознают опухолевые клетки, чтобы обеспечить полную активацию и цитотоксичность.

Это отличается от стимуляции αß Т-клеток через CD3, где вся стимуляция осуществляется через TCR. Таким образом, такие клетки почти не различают здоровые или трансформированные клетки, потому что у них нет этого независимого от антигенной презентации распознавания опухолевых клеток через NCR. Следовательно, если антитела к CD3 содержат Fc, они будут привлекать другие иммунные клетки, что может вызвать каскад непредсказуемых и желательных событий, таких как цитокиновый шторм, истощение и даже сверхактивация иммунных клеток, что приводит, например, к тому, что NK-клетки убивают Т-клетки и т. д. В настоящем подходе стимуляция γδ Т-клеток представленными в настоящее время антителами не вызывает таких проблем, поскольку γδ Т-клетки (и другие иммунные клетки, такие как NK-клетки) способны различать здоровые клетки и опухолевые клетки, в том числе с помощью своего механизма распознавания NCR, и поэтому селективно убивают стрессированные клетки, такие как раковые клетки или вирус-инфицированные клетки, благодаря этой специфичности для пораженных клеток.

Например, в первоначальных исследованиях на яванских макаках с полиспецифическим антителом к vδ1 с функциональным Fc, представленным в данном документе, со специфичностью к антигену vδ1 как человека, так и яванского макака (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 172), было обнаружено, что оно безопасно и хорошо переносится, в исследованиях с многократным введением препарата и эскалацией дозы*in-vivo* по всем измеренным параметрам. Не наблюдалось ни одного из побочных эффектов, обычно

связанных с активацией Т-клеток, таких как высвобождение цитокинов или потеря веса.

Эти результаты также подчеркивают еще одно преимущество описанного в данном документе подхода. В частности, в отличие от TCE, типичных для привлекающих клетки активаторов к CD3 и т.п., биспецифические TCE по изобретению могут быть разработаны в виде полноразмерного антитела, например, включающего тяжелые цепи в формате VH-CH1-CH2-CH3 с когнатными легкими цепями в формате VL-CL. В отличие от меньших биспецифических форматов (например, менее 70 кДа), такой полноразмерный биспецифический формат может демонстрировать более длительное время полужизни in vivo и, таким образом, требует режимов с менее частым дозированием. Более длительные периоды полужизни, наблюдаемые у таких форматов, обусловлены рядом причин, включая увеличенный размер (>70 кДа), что означает, что такие форматы не фильтруются почками (пороговое значение размера пор клубочков 60-70 кДа). В одном варианте осуществления полиспецифические антитела могут быть больше около 70 кДа и могут содержать последовательность IGHC человека (например, последовательность IGHA, IGHD, IGHD, IGHM, IGHG), как указано IMGT. Такие форматы IgG1 также могут быть рециклированы с помощью механизма FcRn. Явным недостатком таких полноразмерных форматов антител для биспецифических TCE, в частности, является то, что такой формат демонстрирует неблагоприятные профили безопасности из-за снижения скорости клиренса, увеличения и более длительного воздействия.

Таким образом, настоящий подход допускает возможность функционирования Fc без опасения нецелевых эффектов, например, NK-клетки, убивающие γδ Т-клетки, или наоборот. Таким образом, настоящий подход превосходит подходы, направленные на CD3, которые ограничены необходимостью применения обходных путей, таких как снижение аффинности к CD3, устранение функции Fc и т. д., чтобы ограничить побочное повреждение вне опухолевого окружения. Представленные в данном документе полиспецифические антитела, в частности привлекающие Т-клетки активаторы, способны связываться с vδ1 клетками без какого-либо потенциального повреждения, а полная активация и усиление цитотоксичности происходит только тогда, когда vδ1 клетки находятся в непосредственном контакте с опухолевыми клетками.

Таким образом, в одном варианте осуществления предложен способ снижения количества TRDV1-содержащего Vδ1 TCR и связанного с ним комплекса молекул CD3 на поверхности клетки с полиспецифическим антителом TCE, а также применение таких полиспецифических антител для этой цели.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из описания, предложенного в данном документе. Однако следует понимать, что описание и конкретные примеры, указывающие на предпочтительные варианты осуществления изобретения, представлены только с целью иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации станут очевидными для специалистов в данной области техники. Далее изобретение будет описано с помощью следующих неограничивающих примеров:

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Таблицы

Клоны исходных антител получали, как описано в Примерах с 1 по 19 в WO2021/032963.

Последовательности CDR исходных клонов показаны ниже в таблице 24.

Таблица 23. DV1-связывающие вещества для превращения IgG

ID клона	**CDR1 тяжелой цепи**	**SEQ ID NO.**	**CDR2 тяжелой цепи**	**SEQ ID NO.**	**CDR3 тяжелой цепи**	**SEQ ID NO.**	**CDR1 легкой цепи**	**SEQ ID NO.**	**CDR2 легкой цепи**	**SEQ**	**CDR3 легкой цепи**	**SEQ ID NO.**	**100 нМ L1**
1245_P02_G04	GDSVSSKSAA	51	TYYRSKWST	53	TWSGYVDV	54	QDINDW	79	DAS	80	QQSYSTPQVT	81	5896
1245_P01_E07	GFTFSDYY	130	ISSSGSTI	131	VDYADAFDI	132	QSIGTY	144	VAS	145	QQSYSTLLT	146	162591
1252_P01_C08	GFTVSSNY	317	IYSGGST	318	PIELGAFDI	319	NIGSQS	347	YDS	348	QVWDSSSDHVV	349	1977
1245_P01_B07	GFTFSDYY	320	ISSSGSTI	321	ENYLNAFDI	322	QSLSNY	350	AAS	351	QQSYSTPLT	352	64271
1251_P02_C05	GFTFSSYA	323	ISGGGGTT	324	DSGVAFDI	325	QNIRTW	353	DAS	354	QQFKRYPPT	355	65269
1139_P01_E04	GDSVSSNSAA	326	TYYRSKWYN	327	SWNDAFDI	328	QSISTW	356	DAS	357	QQSYSTPLT	358	23786
1245_P02_F07	GDSVSSNSAA	329	TYYRSKWYN	330	DYYYSMDV	331	QSISSW	359	DAS	360	QQSHSHPPT	361	10450
1245_P01_G06	GFTFSDYY	332	ISSSGSTI	333	HSWNDAFDV	334	QSISSY	362	AAS	363	QQSYSTPDT	364	22474
1245_P01_G09	GDSVSSNSAA	335	TYYGSKWYN	336	DYYYSMDV	337	QSISTW	365	DAS	366	QQSYSTPVT	367	18430
1138_P01_B09	GFTFSDYY	338	ISSSGSTI	339	HSWSDAFDI	340	QDISNY	368	DAS	369	QQSYSTPLT	370	29193
1251_P02_G10	GFTFSDYY	341	ISSSGSTI	342	HSWNDAFDI	343	QSISSH	371	AAS	372	QQSYSTLLT	373	17053
1141_P01_E01	GYSFTSYW	344	IYPGDSDT	345	HQVDTRTADY	346	RSDVGGYNY	374	EVS	375	SSYTSTSTLV	376	136780

Значения K_D исходных клонов, определенные с помощью анализа методом SPR, были следующими:

Таблица 24. Результаты захвата IgG

Анализируемое вещество	ID клона	K_D (нМ)	K_D (М)
L1 (DV1-GV4)	**1245_P01_E07**	12,4	1.24e-08
L1 (DV1-GV4)	**1252_P01_C08**	100	1.00e-07
L1 (DV1-GV4)	**1245_P02_G04**	126	1.26e-07
L1 (DV1-GV4)	**1245_P01_B07**	341	3.41e-07
L1 (DV1-GV4)	**1251_P02_C05**	1967*	1.97e-06
L1 (DV1-GV4)	**1139_P01_E04**	251	2.51e-07
L1 (DV1-GV4)	**1245_P02_F07**	193	1.93e-07
L1 (DV1-GV4)	**1245_P01_G06**	264	2.64e-07
L1 (DV1-GV4)	**1245_P01_G09**	208	2.08e-07
L1 (DV1-GV4)	**1138_P01_B09**	290	2.90e-07
L1 (DV1-GV4)	**1251_P02_G10**	829	8.29e-07
L1 (DV1-GV4)	**TS8.2** (коммерческое антитело к Vδ1)	44	4.40e-08

*Связывание 1252_P02_C05 не достигло насыщения, поэтому данные были экстраполированы

Картирование эпитопов было проведено для 5 исходных клонов с использованием водородно-дейтериевого обмена. Краткое изложение результатов картирования эпитопов представлена в **таблице 25**.

Таблица 25. Результаты картирования эпитопов для комплексов антиген/антитело

ID клона	Картирование эпитопов, нумерация аминокислот в SEQ ID NO: 272
1245_P01_E07	5, 9, 16, 20, 62, 64, 72, 77
1252_P01_C08	50, 53, 59, 62, 64
1245_P02_G04	37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73, 77
1251_P02_C05	59, 60, 68, 72
1141_P01_E01	3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68, 69

ПРИМЕР 2. Полиспецифическое антитело вызывало усиление цитотоксичности, опосредованной эффекторными Vδ1+ клетками; нацеливание на антиген, ассоциированный с заболеванием соединительной ткани.

Для изучения влияния полиспецифических антител на совместные культуры эффекторных Vδ1+ клеток и раковых клеток A-431 были проведены исследования цитотоксичности/активности. Целевые клетки A-431 ($EGFR^{++}$; ATCC) высевали в 384-луночный планшет для визуализации (Perkin Elmer) по 1000 клеток на лунку и инкубировали при 37˚C в течение ночи в среде DMEM (10% FCS). Антитела и полиспецифические антитела, как указано, разводили до 10 мкг/мл и добавляли планшет

для анализа (конечная анализируемая концентрация 2 мкг/мл). Размноженные Vδ1 γδ Т-клетки, полученные из кожи, отделяли от колб для тканевой культуры и серийно разводили для получения ряда соотношений E:T (максимальное соотношение E:T 60:1) перед добавлением в планшет для анализа. Клетки A-431 инкубировали с Vδ1 γδ Т-клетками в присутствии антител или контролей при 30˚C, 5% CO_2. После инкубации в течение 24 часов к окрашенным клеткам добавляли Hoechst 33342 (ThermoFisher) (конечная концентрация 2 мкМ). Чтобы определить количество живых клеток A-431, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Количество живых клеток определяли количественно на основе размера, морфологии, микроструктуры, и интенсивности окрашивания живых клеток. Исследования зависимости эффектор/мишень (E:T) для определения соотношения ET, при котором 50% целевых клеток погибают в модельных системах +/- контроли, препараты сравнения, антитела и полиспецифические антитела, как указано. Результаты представлены на **Фиг. 31**.

Во-первых, на **Фиг. 31 (A-D)** представлены примеры результатов совместного культивирования, в которых изучались совместные культуры Vδ1+/A-431 +/- полиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты к Vδ1 x TAA (EGFR), при этом связывающий домен VL+VH к Vδ1 (к первой мишени) объединяется с доменом CH1-CH2-CH3 связывающего фрагмента к EGFR (ко второй мишени). Используемые контроли и компараторы, как указано; слева направо: отсутствие мкАт=антитело не добавлено; D1.3=контроль D1.3; D1.3 IgG LAGA=D1.3+L235A, G237A; D1.3 FS1-67=вариабельный домен D1.3 с EGFR-связывающим константным доменом плюс L235A, G237A; цетуксимаб (собственного производства). Более конкретно, на **Фиг. 31 (A)** представлены результаты пятичасового совместного культивирования с вышеупомянутыми контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: C08-LAGA=1252_P01_C08 с L235A, G237A; C08 FS1-67=1252_P01_C08 в сочетании с EGFR-связывающим доменом, содержащим L235A, G237A. На **Фиг. 31 (B)** представлены эквивалентные данные пятичасового совместного культивирования с вышеупомянутыми контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: G04-LAGA=1245_P02_G04 с L235A, G237A; G04 FS1-67=1245_P02_G04 в сочетании с EGFR-связывающим доменом, содержащим L235A, G237A. На **Фиг. 31 (C)** представлены эквивалентные данные пятичасового совместного культивирования с контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: E07-LAGA=1245_P01_E07 с L235A, G237A; E07 FS1-67=1245_P01_E07 в сочетании с EGFR-связывающим доменом, содержащим L235A, G237A. На **Фиг. 31 (D)** представлена таблица, обобщающая процентное улучшение цитотоксичности Vδ1 γδ Т-клеток в присутствии контролей, препаратов сравнения и тестируемых соединений в течение 5, 12 и 24 часов. Можно наблюдать усиление более чем на 450%, когда антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, как описано в данном документе, представлены в полиспецифическом формате.

Во-вторых, на **Фиг. 31 (E-H)** представлены примеры результатов, в которых изучались совместные культуры Vδ1+/A-431 +/- полиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты к Vδ1 x TAA (EGFR), где связывающий домен к Vδ1 (к первой мишени) содержит полноразмерное антитело (VH-CH1-CH2-CH3/VL-CL), затем объединенное со связывающим фрагментом scFv к EGFR (ко второй мишени). Используемые контроли и препараты сравнения, как указано**;** слева направо: отсутствие мкАт=антитело не добавлено; D1.3=контроль; D1.3 IgG LAGA=D1.3+L235A, G237A; D1.3 LAGA цетуксимаб=D1.3 с L235A, G237A плюс C-концевой scFv, полученный из цетуксимаба; цетуксимаб (собственного производства). Более конкретно, на **Фиг. 31 (E)** представлены пятичасовые совместные культуры с вышеупомянутыми контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: C08-LAGA=1252_P01_C08 с L235A, G237A; C08 LAGA цетуксимаб=1252_P01_C08 с L235A, G237A и с C-концевым scFv, полученным из цетуксимаба. На **Фиг. 31 (F)** представлена пятичасовая культура с вышеупомянутыми контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: G04-LAGA=1245_P02_G04 с L235A, G237A; G04 LAGA цетуксимаб=1245_P02_G04 с L235A, G237A и с C-концевым scFv, полученным из цетуксимаба. На **Фиг. 31 (G)** представлена пятичасовая культура с контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: E07-LAGA=1245_P01_E07 с L235A, G237A; E07 LAGA цетуксимаб=1245_P01_E07 с L235A, G237A и с C-концевым scFv, полученным из цетуксимаба. На **Фиг. 31 (H)** представлена таблица, обобщающая процентное улучшение в активности Vδ1 γδ T-клеток в присутствии контролей, препаратов сравнения и тестируемых соединений в течение 5, 12 и 24 часов. Можно наблюдать усиление более чем на 300%, когда антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, как описано в данном документе, представлены в полиспецифическом формате.

ПРИМЕР 3. Дисплей на клетках млекопитающих

Два клона были отобраны для созревания аффинности. В приведенных выше примерах описано получение и характеристика клонов с созревшей аффинностью, полученных из клона ADT1-4 (G04) и клона ADT1-7 (E07).

Созревание аффинности человеческих моноклональных антител к Vδ1

Фаговый дисплей, используемый для получения исходных моноклональных антител к Vδ1, обеспечивал антитела с аффинностью в диапазоне от 10 нМ до 1 мкМ, как описано выше. Исходные антитела клона ADT1-4 (G04) и клона ADT1-7 (E07) затем подвергались аффинному созреванию in vitro, что удивительным образом позволило достичь 100-кратного повышения аффинности для более эффективного захвата мишени. In vitro аффинное созревание исходных антител осуществлялось в две стадии: диверсификация последовательности исходного антитела с помощью направленного мутагенеза CDR3 и последующее селективное обогащение антител с улучшенной аффинностью с помощью платформ фагового дисплея и дисплея на клетках млекопитающих. 2-мерные библиотеки VH и VL CDR3 для клонов ADT1-4 и ADT1-7 были созданы с использованием мутагенеза

Kunkel (Kunkel et al., 1987; Sidhu and Weiss, 2004) и амплификации RCA. Комбинации всех одинарных и двойных аминокислотных замен в определенных положениях CDR3 VH и VL были включены с использованием технологии синтеза праймеров Agilent. Было указано количество различных аминокислот, которые должны быть включены в конкретное положение. Цистеин и метионин исключены. Изменения, внесенные в CDR клонов, приведены ниже в таблице 26.

Таблица 26. Положения CDR3 и указанные изменения остатков

E07 (V3-11/Vκ1-39)	POS	АМИНОКИСЛОТА(-Ы)	POS	АМИНОКИСЛОТА(-Ы)
	V	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,W,Y	Q	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,R,S,T,V,W,Y
	D	A,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	S	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,T,V,W,Y
	Y	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W	Y	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W
	A	D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	S	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,T,V,W,Y
	D	A,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	T	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,V,W,Y
	A	D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	L	A,D,E,F,G,H,I,K,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	F	A,G,H,I,L,N,P,S,T,V,Y	L	A,D,E,F,G,H,I,K,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	D	A,G,N,S,T	R'	A,G,Q,S,T,V
	I	G,S,V,Y		
G04 (VH6-1/Vκ1-5)	POS	АМИНОКИСЛОТА(-Ы)	POS	АМИНОКИСЛОТА(-Ы)
	T	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,V,W,Y	S	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,T,V,W,Y
	W	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,Y	Y	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W
	S	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,T,V,W,Y	S	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,T,V,W,Y
	G	A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	T	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,V,W,Y
	Y	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W	P	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,Q,R,S,T,V,W,Y
	V	A,F,G,H,I,L,N,P,S,T,Y	Q	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,R,S,T,V,W,Y
	D	A,G,N,S,T	V	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,W,Y
	V	G,I,S,Y	Q'	A,G,R,S,T,V

Размер каждой библиотеки показан в таблице 27.

Таблица 27. Размер библиотеки

ADT1-7	$5,4 \times 10^9$
ADT1-4	$5,5 \times 10^9$

Создание мутагенизированных библиотек CDR3 VH и VL

Мутагенизированные библиотеки получали из подходящих объемов культур, покрывающих соответствующий избыток членов библиотеки. Созревание аффинности проводили с использованием технологии фагового дисплея, как описано в Schofield et al. (2007) с использованием селекции в жидкой фазе. Селекцию проводили в растворах с использованием антигена человека и яванского макака. Чтобы выделить связывающие вещества из мутантной библиотеки с более высокой аффинностью, концентрацию антигена контролировали, проводя серию все более жестких раундов селекции. Несколько раундов селекции фагового дисплея с антигеном человека и антигеном яванского макака проводили для каждого клона, как представлено на Фиг. 1. Для линии ADT1-4 концентрация антигена, используемая при селекции, находилась в диапазоне от 100 нМ до 10 пМ для антигена человека и от 100 нМ до 10 нМ для антигена яванского макака. Для линии ADT1-7 использовали антиген человека в концентрации от 10 нМ до 1 пМ и для яванского макака от 100 нМ до 100 пМ. На Фиг. 1 показаны раунды селекции фагов для библиотеки ADT1-7 (iS), библиотеки ADT1-4 (iB) и библиотеки ADT1-7 со стратегией селекции для выделения связывающих соединений, перекрестно реактивных для молекул яванского макака (iC).

Для оценки хода селекции использовали ELISA для поликлональных фагов.

DV1/GV4 человека и DV1/GV76 яванского макака наносили на ночь в концентрации 150 нг/лунка, 50 мкл/лунка. DV2/GV76 яванского макака и HSA использовали в качестве контроля. Только полученные соединения, полученные из библиотеки ADT4-1, были перекрестно реактивными к антигену DV1 человека и яванского макака. Полученное соединение из ADT1-7 было реактивным только к антигену человека. Выбранные полученные соединения были дополнительно охарактеризованы с помощью ELISA для моноклональных фагов, и краткое описание представлено в таблице 28. Светло- и темно-серые прямоугольники указывают на то, что селекция проводилась с антигеном человека или яванского макака, соответственно. Стрелки указывают на процент клонов, которые классифицируются как связывающиеся с VD1 человека или яванского макака (направленные вверх указывают на высокий уровень, а направленные вниз указывают на низкий уровень).

Таблица 28. Сводные данные по ELISA для моноклональных фагов

G04	фаговые раунды			Связывание	
Селекция	#1	#2	#3	huDV1	cyDV1
2378	10нМ	1нМ		↑ 79%	↘ 25%
2409			100пМ	↑ 75%	↑ 100%
2412			10нМ	↗ 72%	↑ 100%
2413		10нМ	1нМ	↑ 84%	↑ 100%
2385	100нМ	10нМ		↗ 71%	↑ 75%
2418			1нМ	↑ 100%	↑ 94%
2420			1нМ	↑ 94%	↑ 94%
2415		10нМ	10нМ	↑ 100%	↑ 94%

E07	фаговые раунды				
Селекция	#1	#2	#3	huDV1	cyDV1
2370	1нМ	100пМ		↑ 96%	↓ 0%
2404			10пМ	↑ 83%	↓ 0%

Разнообразие последовательностей обобщено в таблице 29. Светло- и темно-серые прямоугольники указывают на то, что селекция проводилась с антигеном человека или яванского макака, соответственно. Стрелки указывают на уровень разнообразия (направленные вверх указывают на высокий уровень, а направленные вниз указывают на низкий уровень).

Таблица 29. Сводные данные по секвенированию для моноклональных фагов

G04	фаговые раунды			разнообразие		
Селекция	#1	#2	#3	тяжелый CDR3	легкий CDR3	тяжелый- легкий CDR3
2378	10нМ	1нМ		83%	96%	100%
2409			100пМ	50%	53%	72%
2412			10нМ	63%	97%	97%
2413		10пМ	1нМ	71%	97%	100%
2385	100пМ	10нМ		83%	88%	100%
2418			1нМ	66%	81%	88%
2420			1нМ	63%	73%	80%
2415		10нМ	10нМ	63%	78%	88%

E07	фаговые раунды			тяжелый CDR3	легкий CDR3	тяжелый- легкий CDR3
Селекция	#1	#2	#3			
2370	1нМ	100пМ		88%	96%	100%
2404			10пМ	75%	67%	96%

Создание библиотек дисплея IgG на клетках млекопитающих

Для формирования конечных библиотек, предназначенных для дисплея на клетках млекопитающих, были объединены следующие селекции ADT1-4 :

SEL2409, 2412 и 2413 для создания библиотеки ADT1-4 1 (человек)

SEL 2418, 2420 и 2415 для создания библиотеки ADT1-4 2 (яванский макак)

SEL2370 и 2404 для создания библиотеки ADT1-7.

Затем пулы расширяли до дисплея на клетках млекопитающих. Популяции *одноцепочечных* вариабельных фрагментов антител (scFv) массово конвертировали в формат IgG, сохраняя исходное спаривание вариабельной области тяжелой (VH) и вариабельной области легкой (VL) цепи. Затем антитела в формате IgG клонировали в донорный вектор дисплея на клетках млекопитающего, который котрансфицировали плазмидами, кодирующими пару нуклеаз TALE, чтобы сделать возможной управляемую нуклеазой интеграцию гена антитела в один хромосомный локус. Библиотека антител дисплея на клетках млекопитающих, охватывающая фаговое разнообразие полученных соединений (> 10^6 клонов), была создана в клетках HEK293. Стабильные популяции клеток, экспрессирующих антитела на клеточной поверхности, отбирали путем добавления бластицидина через 2 дня после трансфекции (дпт). Клетки, экспрессирующие антитела на клеточной поверхности, обогащали с помощью сортировки магнитно-активированных клеток (MACS) (7 дпт); клетки метили анти-Fc-PE с последующим добавлением микрочастиц с PE-антителом к Fc и сортировали с использованием магнита Midi MACS (Miltenyi Biotec) и колонок LS. Эти популяции клеток подвергали дополнительной селекции.

Селекция созревших антител с помощью дисплея на клетках млекопитающих

После MACS для обогащения клеток, экспрессирующих антитела, использовали две стратегии для идентификации TRDV1-связывающих соединений. Основная стратегия включала сортировку на основе двухцветной флуоресценции по экспрессии Fc и связыванию антигена. Другая стратегия включала сортировку на основе двухцветной флуоресценции, основанную на связывании как антигена яванского макака, так и антигена человека, чтобы максимизировать шансы выделения перекрестно-реактивных связывающих соединений с высокой аффинностью. Схематический обзор процесса представлен на Фиг. 2.

Последовательность, специфичность, ранжирование по аффинности и характеристика

Геномную ДНК экстрагировали из восьми различных отсортированных популяций. ДНК, кодирующую выбранные IgG, амплифицировали и клонировали в вектор экспрессии растворимого IgG1. Всего было отобрано 1472 клона из 8 различных селекций. pDNA трансфицировали в клетки Expi293. Супернатанты собирали через 5 дней после трансфекции и оценивали аффинность экспрессированных антител для связывания TRDV1 человека и яванского макака в ELISA с захватом. В общей сложности 93 антитела к DV1 из каждой выбранной цепи были выбраны для анализа последовательности и скорости диссоциации по SPR. Кроме того, эти клоны проверяли с помощью прямого ELISA на связывание с TRDV1 человека, TRDV1 человека (A -> V), TRDV2 человека, TRDV1 яванского макака и BSA.

ПРИМЕР 4. АФФИННОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ С АНТИГЕНАМИ ЧЕЛОВЕКА И ЯВАНСКОГО МАКАКА

Связывание с рекомбинантным антигеном и vδ1 TCR , экспрессированными на клетках: линия ADT1-4

Были проведены исследования по изучению связывания антител к vδ1 с их целевыми антигенами. Связывание мкАт к vd1 с антигеном vd1 TCR тестировали с помощью ELISA. 1 мкг человеческого антигена или 1 мкг антигена яванского макака иммобилизовали на лунку на 96-луночных планшетах для иммуноанализа (SLS № 475904) и затем блокировали BSA для предотвращения неспецифического связывания. Добавляли 1,3 пмоль (20 нг) каждого мкАт и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Связывание мкАт с антигеном определяли с использованием белка A, конъюгированного с HRP, (Abcam #Ab7456) вместе с субстратом TMB (Fisher, #12750000) и стоп-раствором (Biolegend, #423001) путем измерения поглощения при 450 нМ. Исходный контроль был включен в качестве положительного контроля как для анализа, так и для изменчивости между планшетами. Выбранные варианты идентифицировали как те мкАт, которые давали значения поглощения выше, чем у исходных мкАт. На **Фиг. 5A** показано кратное увеличение поглощения для зрелых клонов ADT1-4 по сравнению с поглощением связывания исходного ADT1-4, когда 1,3 пмоль антитела связывали с человеческим антигеном vδ1.На **Фиг. 5B** показано кратное увеличение поглощения для зрелых клонов ADT1-4 по сравнению с поглощением связывания исходного ADT1-4, когда 1,3 пмоль

антитела связывали с антигеном vδ1 яванского макака.

Связывание мкАт с эндогенным vd1 TCR тестировали с использованием проточной цитометрии. vd1 клетки кожи (донор ATS006; размноженные с помощью ADT E0000113) или клеточную линию PEER vδ1 высевали в количестве 3×10^5 клеток/лунка в 96-луночные круглодонные планшеты и ресуспендировали в 50 мкл буфера для FACS (об/об: 2% FCS, 0,1% азид натрия и 1 мМ ЭДТА в PBS), содержащего 3 мкг/мл тестируемого мкАт в течение 15 мин при 4°C. Клетки осаждали и добавляли конъюгированное с APC вторичное антитело к hmIgG (Miltenyi # 130-119-772) в соотношении 1/100 в буфере для FACS и инкубировали еще 20 минут при 4oC. Клетки промывали и фиксировали в CellFix (BD #340181) и анализировали с помощью проточной цитометрии. Рассчитывали % фенотипа vd1 и среднюю интенсивность флуоресценции (Inivai Technologies, Flowlogicv7.2). В качестве положительного контроля использовали исходное антитело.На **Фиг. 5C** показано кратное увеличение средней интенсивности флуоресценции для зрелых клонов ADT1-4 по сравнению с ADT1-4, связывающими полученные из кожи первичные человеческие vδ1 клетки.На **Фиг. 5D** показано кратное увеличение средней интенсивности флуоресценции для созревших клонов ADT1-4 по сравнению с исходным ADT1-4, связывающим трансформированную линию vδ1 клеток PEER.

Связывание с рекомбинантным антигеном и vδ1 TCR , экспрессированными на клетках: линия ADT1-7

Были предприняты исследования для изучения связывания созревших антител к vδ1 ADT1-7 с их целевыми антигенами. Связывание vd1 мкАт с антигеном Vδ1 TCR тестировали с помощью ELISA. 1 мкг антигена иммобилизовали на лунку на 96-луночных планшетах для иммуноанализа (SLS № 475904) и затем блокировали BSA для предотвращения неспецифического связывания. Добавляли титры мкАт в 6,7 пмоль (100 нг), 1,3 пмоль (20 нг) и 0,27 пмоль (4 нг) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Связывание мкАт с антигеном определяли с использованием конъюгированного с HRP белка A (Abcam, #Ab7456) вместе с субстратом TMB (Fisher, #12750000) и стоп-раствором (Biologend #423001) путем измерения поглощения при 450 нМ. Исходный контроль был включен в качестве положительного контроля как для анализа, так и для изменчивости между планшетами. Выбранные варианты идентифицировали как те мкАт, которые давали значения поглощения выше, чем у исходных мкАт. На **Фиг. 6A** показано кратное увеличение поглощения для зрелых клонов ADT1-4 по сравнению с поглощением связывания исходного ADT1-4, когда 1,3 пмоль антитела связывали с человеческим антигеном vδ1.

Связывание мкАт с эндогенным vd1 TCR тестировали с использованием проточной цитометрии. vδ1 клетки кожи (донор ATS006; размноженные с помощью ADT E0000113) или клеточную линию PEER vδ1 высевали в количестве 3×10^5 клеток/лунка в 96-луночные круглодонные планшеты и ресуспендировали в 50 мкл буфера для FACS (об/об: 2% FCS, 0,1% азид натрия и 1 мМ ЭДТА в PBS), содержащего 3 мкг/мл тестируемого мкАт в течение 15 мин при 4°C. Клетки осаждали и добавляли конъюгированное с APC вторичное антитело

к hmIgG (Miltenyi # 130-119-772) в соотношении 1/100 в буфере для FACS и инкубировали еще 20 минут при 4oC. Клетки промывали и фиксировали в CellFix (BD #340181) и анализировали с помощью проточной цитометрии. Рассчитывали % фенотипа vd1 и среднюю интенсивность флуоресценции (Inivai Technologies, Flowlogicv7.2). В качестве положительного контроля использовали исходное антитело.На **Фиг. 6B** показано кратное увеличение средней интенсивности флуоресценции для зрелых клонов ADT1-4 по сравнению с ADT1-4, связывающими полученные из кожи первичные человеческие vδ1 клетки.На **Фиг. 6C** показано кратное увеличение средней интенсивности флуоресценции для созревших клонов ADT1-7 по сравнению с исходным ADT1-7, связывающим трансформированную линию vδ1 клеток PEER.

Кратность улучшения по сравнению с исходными клонами

Усиленный диссоциацией лантанидный флюоресцентный иммуноанализ (DELFIA)

Для подтверждения улучшения связывания мкАт с созревающей аффинностью с антигеном человека и яванского макака иммуноанализ DELFIA проводили с антигеном, непосредственно нанесенным на планшет (3 мкг/мл антигена в 50 мкл PBS при 4°C в течение ночи (Nunc #437111). Для обнаружения меченное Eu-N1 антитело к человеческому IgG DELFIA (Perkin Elmer № 1244-330) использовали в качестве вторичного антитела в разведении 1/500 в 50 мкл 3% MPBS (PBS+3% (масса/объем) обезжиренного сухого молока). Проявление проводили с использованием 50 мкл усиливающего раствора DELFIA (Perkin Elmer № 4001-0010).

Ранжирование аффинности представляющего интерес антитела проводили с использованием иммуноанализа DELFIA, в котором антитела захватывались белком G, нанесенным на планшет, и добавляли растворимый биотинилированный человеческий антиген L1 (DV1-GV4) в концентрации 0,4 нМ и антиген **DV1/GV77** яванского макака в концентрации 10 нМ (3MPBS). Для детекции использовали 50 мкл стрептавидина-Eu (1:500 в буфере для анализа, Perkin Elmer) и сигнал проявляли с помощью усиливающего раствора DELFIA.D1.3 hIgG1 (описанный в England *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162: 2129-2136) использовали в качестве отрицательного контроля.Результаты приведены на Фиг. 7A-C.

Анализ методом SPR - захват IgG

Анализ методом SPR использовали для сравнения значений KD для клонов с созревшей аффинностью по сравнению с исходными клонами. Используемый прибор: MASS-2 (Sierra Sensors); чип: аминный повышенной емкости (Sierra Sensors); рабочий буфер PBS+0,02% Твин 20. Эксперименты проводили при комнатной температуре или 37°C, белок G связывали с чипом. Антиген пропускали клеткой в серии разведений в диапазоне от 50 нМ до 0,2 нМ для человеческого DV1-GV4 и от 100 нМ до 1 нМ для DV1-77 яванского макака. 120 секунд ассоциации, 600 секунд диссоциации, скорость потока 50 мкл/мин, регенерация с 10 мМ глицином, pH 1,5 , кинетическая аппроксимация в соответствии со связыванием Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения Sierra Analyzer. Результаты приведены на Фиг. 8A-C.

Анализ аффинности связывания (KD по SPR)

Аффинность связывания моноклонального антитела к Vδ1 с антигеном Vδ1

Аффинность связывания антител с мишенью (т.е. Vδ1-цепью γδ TCR) устанавливают с помощью анализа методом SPR с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies). Антитело (1,5 мкг/мл) наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для получения исходного увеличения примерно на 500 мкРМЕд. Антиген (например, L1 (DV1-GV4) пропускали через ячейку при серийном разведении 1:3 от 300 нМ до 3,7 нМ со следующими параметрами: ассоциация 180 с, диссоциация 600 с, скорость потока 25 мкл/мин, подвижный буфер PBS+0,05% Твин 20. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Аппроксимацию в стационарном состоянии определяли в соответствии со связыванием Ленгмюра 1:1 с помощью программного обеспечения TraceDrawer (Reichert Technologies).

Человеческий антиген

мкАт к Vδ1 с созревшей аффинностью проявляют значительно повышенную аффинность к человеческому антигену Vδ1, чем обе исходные молекулы, что подтверждается результатами анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Фиг. 9). **(A, B)** Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили с исходными мкАт ADT1-4 **(A)** или ADT1-7 **(B)** и их производными с созревшей аффинностью для определения аффинности связывания с человеческим антигеном Vδ1. Взаимодействие связывания Vδ1 и мкАт с созревшей аффинностью моделировали в соответствии со связыванием Ленгмюра 1:1. **(C, D)** Таблицы, в которых приведены равновесные константы диссоциации (KD) для антител, нацеленных на Vδ1, согласно сенсограммам, показанным на **(A)** и **(B)**. Данные представлены как среднее значение двух повторов, выполненных на двух разных инструментах для SPR. **(E, F)** Гистограммы, представляющие кратность увеличения равновесной константы диссоциации (KD) производного с созревшей аффинностью к антигену Vδ1, по сравнению с их исходным соединением, ADT1-4 или ADT1-7.

Выводы. Эти данные демонстрируют, что производные ADT1-4 и ADT1-7 с созревшей аффинностью демонстрируют значительно более высокую аффинность к человеческому антигену Vδ1, чем исходные антитела.

Антиген яванского макака

Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса демонстрирует, что мкАт к Vδ1 с созревшей аффинностью из линии ADT1-4 проявляют значительно повышенную аффинность к антигену Vδ1 яванского макака, чем исходное антитело (Фиг. 10). **(A)** Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили с исходным антителом ADT1-4 и производными с созревшей аффинностью для определения аффинности связывания с антигеном Vδ1 яванского макака. Взаимодействие связывания Vδ1 и мкАт с созревшей аффинностью моделировали в соответствии со связыванием Ленгмюра 1:1. **(B)** Таблица, в которой обобщены равновесные константы диссоциации (KD) антител, нацеленных на Vδ1, полученные из сенсограмм, показанных на **(A).** Данные представлены как среднее значение двух повторов, выполненных на двух разных инструментах для SPR.

Результаты показаны на Фиг. 10A и 10B.

Выводы: эти данные демонстрируют, что производные ADT1-4 с созревшей аффинностью демонстрируют значительно более высокую аффинность к антигену Vδ1 яванского макака, чем исходные антитела.

Аффинность связывания с Vδ1 TCR клеточной поверхности (EC50 для связывания с Vδ1 клеточной поверхности)

мкАт к Vδ1 с созревшей аффинностью проявляют значительно повышенную аффинность к Vδ1-положительным γδT-клеткам без очевидного связывания с клетками, лишенными Vδ1, как показано на Фиг. 11A-D. **(A, B)** Уровень связывания мкАт к Vδ1 с двумя донорами γδ T-клеток, ATS006 (A) и TS164 (B). γδ T-клетки окрашивали различными концентрациями мкАт к Vδ1 с последующим окрашиванием флуоресцентным антителом для обнаружения IgG человека (xxx). Все стадии инкубации выполняли при 4°C, и связывание мкАт определяли с помощью проточной цитометрии для измерения медианного уровня флуоресценции. Логарифмические четырехпараметрические кривые доза-ответ были аппроксимированы с использованием GraphPad Prism 9. **(C)** Гистограмма, представляющая средние значения EC50 для клонов ADT1-4 и ADT1-7, связывающихся с Vδ1-положительными γδ T-клетками, представленными как среднее значение двух доноров. **(D)** Таблица, в которой обобщены значения EC50, нанесенные на (**A**) и (**B**), и Vδ1-отрицательные типы клеток, включая HEK293A, клетки Raji и различные субпопуляции лейкоцитов с первичными мононуклеарными клетками крови. Для Vδ1-положительных γδ T-клеток данные представлены в виде среднего значения для двух доноров.

Выводы. Эти данные демонстрируют, что производные ADT1-4 и ADT1-7 с созревшей аффинностью демонстрируют значительно более высокую аффинность к Vδ1-положительным γδ T-клеткам, чем их исходные мкАт, при этом не демонстрируя связывания с Vδ1-отрицательными клетками HEK293T, Raji или CD8, CD4, NK, CD19 или моноцитарными клетками среди PBMC.

Связывание целевых клеток моноклональных антител к Vδ1

Был проанализирован ряд целевых клеток для определения специфичности и аффинности связывания мкАт к Vδ1. Это включало размноженные полученные из кожи Vδ1 γδ T-клетки, клетки HEK293T, клетки Raji и множественные субпопуляции лейкоцитов в первичных мононуклеарных клетках крови человека. Адгезивные или полуадгезивные клетки (Vδ1 γδ T-клетки кожи, HEK293T) отделяли от колбы с тканевой культурой и ресуспендировали в PBS. Аналогичным образом собирали неадгезивные типы клеток (Raji, PBMC) и ресуспендировали в PBS. Клетки высевали с конечной плотностью 100000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты с V-образным дном. Клетки подвергали центрифугированию, а клеточные осадки ресуспендировали в FcR-блокирующем реагенте в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали в течение 20 минут при 4°C перед дальнейшей промывкой. мкАт к Vδ1, контрольный IgG к RSV и OKT3 к CD3 разбавляли до 500 нМ в PBS и последовательно разводили 1:5 в PBS до 6,4 пМ и добавляли к клеткам с последующей 20-минутной инкубацией при 4°C. Для определения количества

мкАт, связанного с клеточной поверхностью, клетки затем окрашивали мышиным вторичным антителом к IgG человека, конъюгированным с APC (код продукта.., разведение: 1:100). Для Vδ1 γδ Т-клеток, HEK293T и Raji клетки также окрашивали исключительно витальным красителем. Для PBMC также были включены конъюгированные антитела к CD4, CD8, CD56, CD11b и CD19 (все в соотношении 1:100), что позволяло различать субпопуляции αβ, NK-клетки, В-клетки и моноцитарные клетки. После 20-минутной инкубации при 4°C клетки дважды промывали и измеряли флуоресценцию с использованием MACSQuant. IC50 показаны на Фиг. 11D.

Краткое представление значений KD для линии ADT1-4 (человека и яванского макака)

В таблице ниже представлены значения KD для 24 клонов линии ADT1-4 и исходного клона ADT1-4 (G04) (для связывания с TRDV1 человека и TRDV1 яванского макака):

	Человек	**Человек**	**Яванский макак**	**Яванский макак**
ID клона	**K_D [M]**	**K_D (нМ)**	**K_D [M]**	**K_D (нМ)**
ADT1-4	1.26E-07	126 нМ	Н/Д	Н/Д
ADT1-4-19	1.63E-10	0,163 нМ	3.40E-09	3,40 нМ
ADT1-4-21	4.41E-10	0,441 нМ	6.79E-09	6,79 нМ
ADT1-4-31	5.22E-10	0,522 нМ	9.43E-09	9,43 нМ
ADT1-4-53	6.08E-10	0,608 нМ	5.34E-09	5,34 нМ
ADT1-4-2	1.95E-10	0,195 нМ	3.08E-09	3,08 нМ
ADT1-4-8	5.41E-10	0,541 нМ	1.51E-08	15,1 нМ
ADT1-4-82	2.49E-10	0,249 нМ	1.67E-08	16,7 нМ
ADT1-4-83	2.41E-10	0,241 нМ	1.58E-08	15,8 нМ
ADT1-4-84	2.27E-10	0,227 нМ	1.16E-08	11,6 нМ
ADT1-4-86	9.39E-10	0,939 нМ	9.49E-09	9,49 нМ
ADT1-4-95	6.42E-10	0,642 нМ	1.50E-08	15,0 нМ
ADT1-4-105	3.81E-10	0,381 нМ	1.01E-08	10,1 нМ
ADT1-4-107	1.77E-10	0,177 нМ	1.05E-08	10,5 нМ
ADT1-4-110	3.33E-10	0,333 нМ	1.19E-08	11,9 нМ
ADT1-4-112	7.84E-10	0,784 нМ	1.11E-08	11,1 нМ
ADT1-4-117	2.45E-10	0,245 нМ	1.01E-08	10,1 нМ
ADT1-4-139	4.99E-10	0,499 нМ	2.69E-08	26,9 нМ
ADT1-4-4	5.19E-10	0,519 нМ	1.62E-08	16,2 нМ
ADT1-4-143	4.63E-10	0,463 нМ	9.39E-09	9,39 нМ
ADT1-4-173	9.07E-10	0,907 нМ	2.40E-08	24,0 нМ
ADT1-4-3	9.35E-10	0,935 нМ	2.85E-08	28,5 нМ
ADT1-4-1	8.00E-11	0,08 нМ	4.1E-10	0,41 нМ
ADT1-4-6	1.06E-9	1,06 нМ	1.01E-9	1,01 нМ
ADT1-4-138	4.38E-8	43,8 нМ	3.47E-8	34,7 нМ

Краткое представление значений KD для линии ADT1-7 (только человека)

В таблице ниже представлены значения KD для 11 клонов линии ADT1-7 и исходного клона ADT1-7 (E07) (для связывания с TRDV1 только человека):

ID клона	K_D [M]	K_D (нМ)
ADT1-7	1.24E-08	12,4 нМ
ADT1-7-10	1.30E-09	1,30 нМ
ADT1-7-15	1.42E-09	1,42 нМ
ADT1-7-17	1.26E-09	1,26 нМ
ADT1-7-18	1.61E-09	1,61 нМ
ADT1-7-19	1.19E-09	1,19 нМ
ADT1-7-20	1.17E-09	1,17 нМ
ADT1-7-22	1.18E-09	1,18 нМ
ADT1-7-23	1.29E-09	1,29 нМ
ADT1-7-42	1.51E-09	1,51 нМ
ADT1-7-3	8.31E-10	0,831 нМ
ADT1-7-61	5.57E-10	0,557 нМ

Краткое описание фармакологических данных для предпочтительных членов линии ADT1-4

	Человек	**Человек**	**Яванский макак**	**Яванский макак**	**IC50 TCR DR (без THP-1)**	**IC90 TCR DR (без THP-1)**	**IC50 для уничтожения**	**IC90 для уничтожения**
ID клона	**K_D [M]**	**K_D (нМ)**	**K_D [M]**	**K_D (нМ)**				
ADT1-4	1.26E-07	126 нМ	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	2.603E-08 (26,03 нМ)	7.048E-08
ADT1-4-19	1.63E-10	0,163 нМ	3.40E-09	3,40 нМ	3.67E-10 (0,367 нМ)	1.583E-9 (1,583 нМ)	1.12E-09 (1,12 нМ)	8.38E-09 (8,38 нМ)
ADT1-4-21	4.41E-10	0,441 нМ	6.79E-09	6,79 нМ	2.66E-10 (0,266 нМ)	8.92E-10 (0,892 нМ)	9.4E-10 (0,94 нМ)	5.88E-09 (5,88 нМ)
ADT1-4-31	5.22E-10	0,522 нМ	9.43E-09	9,43 нМ	2.45E-10 (0,245 нМ)	1.091E-9 (1,091 нМ)	1.63E-09 (1,63 нМ)	1.658E-08 (16,58 нМ)
ADT1-4-53	6.08E-10	0,608 нМ	5.34E-09	5,34 нМ	2.54E-10 (0,254 нМ)	6.98E-10 (0,698 нМ)	1.05E-09 (1,05 нМ)	4.23E-09 (4,23 нМ)

ADT 1-4-2	1.95E-10	0,195 нМ	3.08E-09	3,08 нМ	3.1E-10 (0,31 нМ)	8.34E-10 (0,834 нМ)	8.7E-10 (0,87 нМ)	3.12E-09 (3,12 нМ)
ADT 1-4-86	9.39E-10	0,939 нМ	9.49E-09	9,49 нМ	3.07E-10 (0,307 нМ)	1.001E-9 (1,001 нМ)	1.05E-09 (1,05 нМ)	4.3E-09 (4,3 нМ)
ADT 1-4-112	7.84E-10	0,784 нМ	1.11E-08	11,1 нМ	2.95E-10 (0,295 нМ)	1.093E-9 (1,093 нМ)	9E-10 (0,9 нМ)	3.8E-09 (3,8 нМ)
ADT 1-4-143	4.63E-10	0,463 нМ	9.39E-09	9,39 нМ	3.13E-10 (0,313 нМ)	8.53E-10 (0,853 нМ)	1.78E-09 (1,78 нМ)	1.42E-08 (14,2 нМ)
ADT 1-4-1	8.00E-11	0,08	4.1E-10	0,41	3.604E-10 (0,3604 нМ)	6.702E-10 (0,6702 нМ)	1.4E-10 (0,14 нМ)	2.8E-10 (0,28 нМ)
ADT 1-4-6	1.06E-9	1,06	1.01E-9	1,01	4.796E-10 (0,4796 нМ)	1.911E-9 (1,911 нМ)	1.4E-10 (0,14 нМ)	2E-10 (0,2 нМ)
ADT 1-4-138	4.38E-8	43,8	3.47E-8	34,7	8.384E-9 (8,384 нМ)	3.83E-8 (38,3 нМ)	3.8E-10 (0,38 нМ)	6.44E-09 (6,44 нМ)

Краткое описание фармакологических данных для предпочтительных членов линии ADT1-7

ID клона	**K_D [M]**	**K_D (нМ)**	**IC50 TCR DR (без THP-1)**	**IC90 TCR DR (без THP-1)**	**IC50 для уничтожения**	**IC90 для уничтожения**
ADT1-7	1.24E-08	12,4 нМ	-	-	5.53E-09 (5,53 нМ)	7.48E-08 (74,8 нМ)
ADT1-7-20	1.17E-09	1,17 нМ	1.64E-10 (0,164 нМ)	1.036E-9 (1,036 нМ)	2.80E-10 (0,28 нМ)	2.47E-09 (2,47 нМ)
ADT1-7-3	8.31E-10	0,831 нМ	1.61E-10 (0,161 нМ)	7.90E-10 (0,79 нМ)	1.60E-10 (0,16 нМ)	1.06E-09 (1,06 нМ)
ADT1-7-61	5.57E-10	0,557 нМ	6.264E-9 (6,264 нМ)	1.704E-6* (1704,445 нМ)	4.20E-10 (0,42 нМ)	1.66E-08 (16,6 нМ)

*Артефакт данных из-за того, что для этого клона не удалось достичь 100% ингибирования

ПРИМЕР 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

Влияние моноклональных антител к Vδ1 на снижение уровня TCR

Способность мкАт ADT взаимодействовать с γδ Т-клеточными рецепторами и, как следствие, снижать их уровень, оценивают путем измерения экспрессии TCR. Кожные γδ Т-клетки (от донора ATS006 и TS164) высевали в 96-луночный круглодонный планшет в

количестве 3×10^5 клеток/мл в среде для γδ с возрастающей концентрацией тестируемых мкАт (диапазон от 0,00067 до 67 нМ) или самой высокой концентрацией (67 нМ) соответствующего изотипического контроля (hIgG1, RSV), разведенного в PBS. Клетки инкубировали в течение 2 часов в камере с контролируемым уровнем CO2 и влажности при 37°C. Клетки промывали и окрашивали на мертвые клетки (Thermo Fisher, # 15580607) и их VD1 TCR (Miltenyi, # 130-117-697) в течение 30 минут при 4oC. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences, # 340181) перед инкубацией в течение ночи при 4°C в темноте. Уровень экспрессии VD1 TCR, определенный по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), измеряли с помощью проточной цитометрии на следующий день с использованием MACS Quant Analyzer 16.

Результаты показаны на Фиг. 12, которая демонстрирует, что мкАт к Vδ1 с созревшей аффинностью связывают и снижают уровень Vδ1 TCR более эффективно, чем их исходный клон и OKT3. (A и B). Количественная оценка экспрессии γδ TCR после 2-часовой инкубации клеток γδ с мкАт к Vδ1 и OKT3 перед окрашиванием Vδ1 TCR с помощью анти-Vδ1 TCR-PE-Vio770. MFI окрашивания антителом к Vδ1 получали с использованием проточной цитометрии и рассчитывали по TCR-положительному гейту перед расчетом %MFI по MFI TCR-положительных необработанных γδ клеток. Верхний график представляет данные из линии ADT1-4, а нижний график представляет данные из линии ADT1-7. (C) Гистограмма, представляющая значения IC50, рассчитанные из (A). (D и E). Гистограмма, представляющая значения IC50 в (B), представленные как кратность улучшения по сравнению с исходным ADT1-4 (слева) и ADT1-7 (справа). (F) Таблица, представляющая значения IC50 из (B) с процентным улучшением, рассчитанным для соответствующих исходных вариантов ADT1-4 (верхний) и ADT1-7 (нижний). (G) Таблица, представляющая значения IC50 из (B) с кратностью улучшения, рассчитанной для соответствующих исходных вариантов ADT1-4 (верхний) и ADT1-7 (нижний).

Моноклональные антитела к Vδ1 при активации γδ, измеренной по экспрессии CD107a

Способность мкАт ADT взаимодействовать с VD1 γδ клетками и активировать их оценивают путем измерения экспрессии CD107a. Кожные γδ Т-клетки (от донора ATS006) высевали в 96-луночный круглодонный планшет в концентрации 6×10^5 клеток/мл в среде для γδ с клетками THP-1 (ATCC-TIB-202) в концентрации 1,2×10^6 клеток/мл и увеличивающейся концентрацией тестируемых мкАт (диапазон от 0,00067 до 67 нМ) или самой высокой концентрацией (67 нМ) соответствующего изотипического контроля (hIgG1, RSV), разведенного в PBS. Клетки инкубировали в течение 2 часов в камере с контролируемым уровнем CO2 и влажности при 37°C. Клетки промывали и окрашивали на мертвые клетки (Thermo Fisher, # 15580607), VD1 TCR (Miltenyi, # 130-117-697) и aCD107a (Miltenyi, # 130-112-610) в течение 30 минут при 4oC. Клетки промывали буфером для FACS перед инкубацией в течение ночи при 4°C в темноте. Уровень экспрессии VD1 TCR и CD107a, определенный по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), измеряли с помощью проточной цитометрии на следующий день с использованием MACS Quant

Analyzer 16.

Результаты показаны на Фиг. 13, на которой показано, что мкАт к Vδ1 с созревшей аффинностью индуцируют активацию только в присутствии целевых клеток. (A и B) Количественная оценка экспрессии γδ TCR (черный) и экспрессии CD107a (серый) после 2 часов инкубации γδ клеток только с ADT1-4-2 (верхний) и с клетками THP-1 (нижний) при соотношении мишень-эффектор 1:2 перед окрашиванием Vδ1 TCR и CD107a с помощью анти-Vδ1 TCR-PE-Vio770 и анти-CD107a-VioBlue, соответственно. MFI окрашивания антителом к Vδ1 получали с использованием проточной цитометрии и рассчитывали по TCR-положительному гейту перед расчетом %MFI по MFI TCR-положительных необработанных и совместно некультивируемых γδ клеток. MFI окрашивания CD107a получали с помощью проточной цитометрии и рассчитывали по гейту «без THP-1» перед расчетом %MFI на основе MFI CD107a необработанных совместно некультивируемых γδ-клеток. (C и D) Количественная оценка экспрессии γδ TCR (черный) и экспрессии CD107a (серый) после 2 часов инкубации γδ клеток только с ADT1-7-3 (верхний) и с клетками THP-1 (нижний) при соотношении мишень-эффектор 1:2 перед окрашиванием Vδ1 TCR и CD107a с помощью анти-Vδ1 TCR-PE-Vio770 и анти-CD107a-VioBlue, соответственно. MFI окрашивания антителом к Vδ1 получали с использованием проточной цитометрии и рассчитывали по TCR-положительному гейту перед расчетом %MFI по MFI TCR-положительных необработанных и совместно некультивируемых γδ клеток. MFI окрашивания CD107a получали с помощью проточной цитометрии и рассчитывали по гейту «без THP-1» перед расчетом %MFI на основе MFI CD107a необработанных совместно некультивируемых γδ-клеток. (E) Таблица, представляющая процентное увеличение экспрессии γδ CD107a в клетках, совместно культивируемых с самой высокой концентрацией мкАт к Vδ1, по сравнению с необработанными совместно некультивируемыми γδ клетками. (F) Таблица, представляющая процентное увеличение экспрессии γδ CD107a в клетках, совместно культивируемых с самой высокой концентрацией мкАт к Vδ1, по сравнению с необработанными совместно культивируемыми и совместно некультивируемыми γδ клетками.

Моноклональные антитела к Vδ1 при активации γδ, измеренной по экспрессии CD25

Способность мкАт ADT взаимодействовать с VD1 γδ клетками и активировать их оценивают путем измерения экспрессии CD25. Кожные γδ Т-клетки (от донора ATS006) высевали в 96-луночный круглодонный планшет в концентрации 6×10^5 клеток/мл в среде для γδ с клетками THP-1 (ATCC-TIB-202) в концентрации 1,2×10^6 клеток/мл и увеличивающейся концентрацией тестируемых мкАт (диапазон от 0,00067 до 67 нМ) или самой высокой концентрацией (67 нМ) соответствующего изотипического контроля (hIgG1, RSV), разведенного в PBS. Клетки инкубировали в течение 24 часов в камере с контролируемым уровнем CO2 и влажности при 37°C. Клетки промывали и окрашивали на мертвые клетки (Thermo Fisher, # 15580607), VD1 TCR (Miltenyi, # 130-117-697) и CD25 (Miltenyi, # 130-113-280) в течение 30 минут при 4oC. Клетки промывали буфером для FACS перед инкубацией в течение ночи при 4°C в темноте. Уровень экспрессии VD1 TCR и

CD107a, определенный по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), измеряли с помощью проточной цитометрии на следующий день с использованием MACS Quant Analyzer 16.

Результаты показаны на Фиг. 14, на которой показано, что мкАт к Vδ1 с созревшей аффинностью индуцируют активацию только в присутствии целевых клеток. (A и B) Количественная оценка экспрессии γδ TCR (черный) и экспрессии CD25 (серый) после 24 часов инкубации γδ клеток с RSV (добавлено в количестве 67 нМ) и только с ADT1-4-2 (верхний) и с клетками THP-1 (нижний) при соотношении мишень-эффектор 1:2 перед окрашиванием Vδ1 TCR и CD25 с помощью анти-Vδ1 TCR-PE-Vio770 и анти-CD25-VioBlue, соответственно. MFI окрашивания антителом к Vδ1 получали с использованием проточной цитометрии и рассчитывали по TCR-положительному гейту перед расчетом %MFI по MFI TCR-положительных необработанных и совместно некультивируемых γδ клеток. MFI окрашивания CD25 получали с помощью проточной цитометрии и рассчитывали по гейту «без THP-1» перед расчетом %MFI на основе MFI CD25 необработанных совместно некультивируемых γδ-клеток. (C и D) Количественная оценка экспрессии γδ TCR (черный) и экспрессии CD25 (серый) после 2 часов инкубации γδ клеток с RSV (добавлено в количестве 67 нМ) и только с ADT1-7-3 (верхний) и с клетками THP-1 (нижний) при соотношении мишень-эффектор 1:2 перед окрашиванием Vδ1 TCR и CD25 с помощью анти-Vδ1 TCR-PE-Vio770 и анти-CD25-VioBlue, соответственно. MFI окрашивания антителом к Vδ1 получали с использованием проточной цитометрии и рассчитывали по TCR-положительному гейту перед расчетом %MFI по MFI TCR-положительных необработанных и совместно некультивируемых γδ клеток. MFI окрашивания CD25 получали с помощью проточной цитометрии и рассчитывали по гейту «без THP-1» перед расчетом %MFI на основе MFI CD25 необработанных совместно некультивируемых γδ-клеток. (E) Таблица, представляющая процентное увеличение экспрессии γδ CD25 в клетках, совместно культивируемых с самой высокой концентрацией мкАт к Vδ1, по сравнению с необработанными совместно некультивируемыми γδ клетками. (F) Таблица, представляющая процентное увеличение экспрессии γδ CD25 в клетках, совместно культивируемых с самой высокой концентрацией мкАт к Vδ1, по сравнению с необработанными совместно культивируемыми и совместно некультивируемыми γδ клетками.

Снижение уровня TCR яванского макака

Были предприняты исследования для изучения способности ADT1-4-2 связываться с гамма-дельта Т-клетками яванского макака vδ1 и вызывать снижение уровня их TCR. Для этих исследований PBMC яванского макака получали из свежей крови и помещали в культуру на 14 дней для размножения γδ-Т-клеток. Альтернативно, αβ-Т-клетки удаляли из общей популяции PBMC с помощью магнитных частиц, покрытых антителом к αβ (клон R73), перед экспансией *in vitro*. Экспансию проводили следующим образом: на лунку 96-луночного планшета с U-образным дном добавляли по 250000 клеток в среду RPMI-1640, содержащую 10% FCS, антибиотики (P/S) и коктейль цитокинов (IFNγ, IL21, IL4, IL1β и

IL15). Через семь дней в клетки добавляли 10 мкл свежей среды, содержащей 10% FCS, антибиотики (P/S) и цитокины IL21 и IL15. За этим последовала замена 100 мкл среды свежей средой, содержащей 10% FCS, антибиотики (P/S) и IL-15 на 11-й день. На 14-й день клетки собирали и подвергали анализу снижения уровня TCR. Этот анализ состоит из смешивания клеток с различными концентрациями антител в течение 2 часов. По истечении времени инкубации клетки окрашивали для анализа методом проточной цитометрии на следующие маркеры: CD3, TCR-αβ, TCR-γδ и VD1. Для выделения живой популяции клеток также использовали краситель для определения живых/мертвых клеток. Анализ методом проточной цитометрии выполняли путем гейтирования популяции CD3+, TCR-γδ+ и VD1+ клеток, а среднюю интенсивность флуоресценции VD1 измеряли в пределах VD1+ гейта. Изотипический контроль (анти-RSV) или отсутствие антител использовали в качестве отрицательного контроля только при самой высокой концентрации. Данные нормализовали к контролю без каких-либо антител. На **Фиг. 15 (A)** показано сравнение способности ADT1-4-2 и ADT1-4 взаимодействовать с VD1 и снижать его экспрессию на γδ-Т-клетках яванского макака. Результаты демонстрируют дозозависимое снижение экспрессии VD1 при обработке ADT1-4-2 (до 76% при 33,3 нМ), но не антителом ADT1-4. В этом конкретном анализе γδ-Т-клетки размножались из популяции, обедненной для αβ-Т-клеток. Использовали 500-кратный диапазон концентраций. На **Фиг. 15 (B)** показан процент экспрессии VD1 на клеточной поверхности при обработке ADT1-4-2. В этом анализе экспансию γδ-Т-клеток проводили для всей популяции PBMC. Использовали 10000-кратный диапазон концентраций. Данные демонстрируют, например, дозозависимое снижение клеточной экспрессии VD1 для 2 разных доноров (AD8170 и AM945BA). В общей сложности было протестировано 4 донора, и EC50 вычисляли отдельно с использованием нелинейной функции аппроксимации кривой GraphPad Prism. На **Фиг. 15 (C)** показано отдельные значение EC50 для разных доноров в сочетании со средним значением и стандартным отклонением. Среднее значение составляет 3,83 ± 2,23 нМ.

Антитела:

CD3-AF700 (BD Bioscience, клон SP34-2, кат.:557917)

TCR-αβ-AF647 (BioLegend, клон R73, кат.: 201116)

TCR-γδ-BV421 (BioLegend, клон B1, кат.: 331218

VD1-PE (eBioscience, клон TS8.2, кат.: 12-5679-42)

Повышенная цитотоксичность клонов с созревшей аффинностью

Созревание аффинности клонов Vδ1 как ADT1-4, так и ADT1-7 значительно усиливает цитотоксический эффект Vδ1 γδ Т-клеток в анализе уничтожения THP-1 *in vitro*

Анализ уничтожения клеток THP-1

мкАт к Vδ1 и контрольный IgG к RSV разбавляли до 1 мкг/мл в PBS и серийно разбавляли 1:10 в PBS перед добавлением в 384-луночные планшеты для ультравизуализации (Perkin Elmer). Клетки THP-1 (ATCC), культивированные в RPMI, 10% FCS (Invitrogen), окрашивали витальным красителем CellTrace CFSE (0,5 мкМ) в течение 20 минут. Размноженные полученные из кожи Vδ1 γδ Т-клетки отделяли от колб с тканевой

культурой и повторно суспендировали в базальной среде для выращивания перед смешиванием 1:1 с клетками THP-1 в суспензии. Суспензии клеток высевали в 384-луночные планшеты для анализа, чтобы получить конечную плотность высевания клеток 1000 клеток THP-1 на лунку и 2000 Vδ1 γδ Т-клеток на лунку. мкАт разбавляли в конечных объемах для анализа до концентраций от 200 нг/мл до 0,2 пг/мл. THP-1 и Vδ1 γδ Т-клетки культивировали в присутствии мкАт к Vδ1 при 37°C, 5% CO_2 в течение 24 часов. Чтобы определить количество живых клеток THP-1 через 24 часа, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Количество живых клеток определяли количественно на основе размера, морфологии, микроструктуры, и интенсивности окрашивания живых клеток.

На Фиг. 16 показано, что мкАт к Vδ1 с созревшей аффинностью проявляют повышенную активность в многопараметрическом анализе цитотоксичности для THP-1 по сравнению с исходными клонами. **(A** и **B)** Количественное определение числа живых клеток THP-1 через 24 часа совместного культивирования с γδ Т-клетками в присутствии мкАт к Vδ1 или контролей [соотношение эффектор:мишень 2:1]. Количество клеток нормализовали как процент от контроля без γδ Т-клеток (100%). OKT3 (антитело к CD3) и изотипический контроль к RSV были включены в качестве аналитических контролей. Количество клеток рассчитывали с помощью конфокальной микроскопии с одновременным многопараметрическим анализом на живых клетках. Графики являются репрезентативными для исходных клонов ADT1-4 (**A**) и ADT1-7 (**B**). (**C**) Гистограмма, представляющая средние значения EC50 для контроля OKT3 и клонов ADT1-4 и ADT1-7. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение для n=3 биологических повторов. (**D**) Таблица, в которой обобщены EC50, нанесенные на график (**C**). Данные представлены в виде среднего значения, стандартного отклонения, кратности изменения и процентного улучшения по сравнению с исходными клонами ADT1-4 и ADT1-7.

Моноклональные антитела к Vδ1 на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC)

Размноженные полученные из кожи Vδ1 γδ Т-клетки от трех доноров отделяли от колб с тканевой культурой, повторно суспендировали в базальной среде для выращивания и высевали с конечной плотностью 20000 клеток на лунку в белые 96-луночные планшеты. Аналогичным образом клетки Raji высевали по 20000 на лунку, чтобы использовать их в качестве положительного контроля для ADCC, индуцированного антителом ритуксимабом, нацеленным на CD20. мкАт разбавляли и добавляли в каждую лунку в конечных концентрациях от 1 до 100 нМ. FcγRIIIa+ эффекторные клетки ADD Bioassay оттаивали и добавляли по 62500 клеток в каждую лунку с последующей инкубацией при 37°C, 5% CO_2 в течение 4,5 часов. В каждую лунку добавляли реагент Bio-Glo, содержащий люциферин, с последующей инкубацией в течение 10 минут и измерением люминесценции с помощью планшет-ридера.

На Фиг. 17 показано, что мкАт, нацеленные на Vδ1, индуцируют незначительную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). ADCC, измеренная с использованием суррогатного репортерного анализа, в котором нисходящий сигналинг NFAT измеряют по индукции активности люциферазы в FcγRIIIa+ эффекторных клетках. Эффекторные клетки культивировали совместно с тремя донорами γδ Т-клеток (соотношение эффектор:мишень 3) и моноклональными антителами в различных концентрациях. $CD20^+$ клетки Raji и ритуксимаб были включены в качестве положительного контроля. Биолюминесценцию измеряли через 4,5 часа совместного культивирования. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение для трех биологических повторов (три донора γδ Т-клеток).

Выводы: эти данные демонстрируют, что исходный ADT1-4 и производное ADT1-4-2 с созревшей аффинностью не индуцируют ADCC, что продемонстрировано с помощью эффекторной репортерной FcγRIIIa+ линии клеток, в которой сигналинг NFAT индуцирует люциферазную активность. Однако OKT3, по-видимому, индуцирует высокие уровни сигналинга, специфичного для ADCC.

Моноклональные антитела к Vδ1 на комплементзависимую цитотоксичность (CDC)

Размноженные полученные из кожи Vδ1 γδ Т-клетки отделяли от колб с тканевой культурой, повторно суспендировали в базальной среде для выращивания и высевали с конечной плотностью 75000 клеток на лунку в белые 96-луночные планшеты. Аналогичным образом клетки Raji высевали по 75000 на лунку, чтобы использовать их в качестве положительного контроля для CDC, индуцированного антителом ритуксимабом, нацеленным на CD20. мкАт разбавляли и добавляли в каждую лунку в конечных концентрациях от 1 до 100 нМ. Человеческую сыворотку, либо свежую, либо инактивированную нагреванием, добавляли до конечной концентрации 40%. Термоинактивацию проводили путем нагревания сыворотки на водяной бане при 56°C в течение 30 минут с последующим охлаждением на льду. Затем культуры инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 24 часов. Для определения количества живых клеток через 24 часа клетки собирали и окрашивали витальным красителем xx в разведении 1:1000 в течение 20 минут. Флуоресценцию измеряли с использованием MACSQuant, а количество живых клеток определяли количественно на основе отрицательного окрашивания витальным красителем.

Результаты показаны на Фиг. 18, которая демонстрирует, что мкАт, нацеленные на Vδ1, не вызывают комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Количество жизнеспособных γδ Т-клеток после культивирования с 40% сывороткой человека и 50 нМ OKT3 к CD3 или ADT1-4-2 к Vδ1 и различными концентрациями моноклонального антитела. Сыворотку использовали в свежем виде или подвергали предварительной термоинактивации. $CD20^+$ клетки Raji и ритуксимаб были включены в качестве положительного контроля. Жизнеспособность измеряли через 24 часа совместного культивирования с помощью витального красителя. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение для трех биологических повторов.

Выводы: эти данные демонстрируют, что ADT1-4-2 не вызывает комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) без увеличения цитотоксичности Vδ1-положительных клеток в присутствии содержащей комплемент сыворотки. Однако ритуксимаб демонстрирует сильную стимуляцию CDC против CD20-положительных клеток Raji.

Сохранение здоровых клеток

Были проведены исследования для изучения влияния стимуляции/активации vδ1 клеток антителами к vδ1 на цитотоксичность по отношению к здоровым клеткам. Это было проверено путем инкубации клона к vδ1 ADT1-4-2 с PBMC и последующей оценки цитотоксичности для моноцитов и апоптоза.

Криоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) были получены на коммерческой основе от 3 здоровых доноров. PBMC высеивали в круглодонные 96-луночные планшеты для тканевых культур по 250000 клеток на лунку в 250 мкл полной среды (RPMI с добавлением 10% FCS, пенициллина/стрептомицина, заменимых аминокислот, пирувата натрия и HEPES) с 10 нг/мл IL15. Титрование антитела к vδ1 ADT1-4-2 добавляли до конечной концентрации 6,6 нМ. Антитела IgG к RSV, IgG2α и OKT3 включали в качестве контроля. Стимуляцию проводили в течение 20 часов. В конечной точке проводили проточную цитометрию для определения фенотипа моноцитов в каждом состоянии и апоптотических моноцитов на клетках vδ1. Сначала клетки гейтировали по живым синглетам, а затем по CD14 (Miltenyi 130-110-523) для идентификации моноцитов. Затем апоптотические моноциты идентифицировали с помощью положительного окрашивания ApoTracker Green (Biolegend 427402).

На Фиг. 19A (верхняя левая панель) показана MFI для окрашивания vδ1 TCR при стимуляции антителом, как показатель взаимодействия с мишенью. На Фигурах 19B (верхняя правая панель) и 19C (нижняя панель) показан конечный фенотип моноцитов и апоптотических моноцитов (соответственно) после стимуляции антителами. Стимуляция клоном антитела к vδ1 ADT1-4-2 задействовала Vδ1 клетки, но не вызывала цитотоксичности для здоровых моноцитов.

ПРИМЕР 6. ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛА К Vδ1 НА ПОПУЛЯЦИЮ TIL ИЗ ПЕРВИЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ БИОПТАТОВ

Антитело к Vδ1 способствовало активации, пролиферации и цитотоксичности инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

Были проведены исследования по изучению модуляции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов человека (TIL) с помощью антител к Vδ1. Для этих исследований биоптаты опухоли почечно-клеточной карциномы человека (RCC) поставляли в свежем виде и подвергали обработке при получении. Биоптаты разрезали на кусочки размером ~2 мм^2 и получали TIL путем адаптации способа, первоначально описанного Kupper and Clarke (Clarke et al, 2006). В частности, до четырех биоптатов размером 2 мм^2 помещали на матрицы Cellfoam размером 9 мм x 9 мм x 1,5 мм и по одной матрице помещали в лунку 24-луночного планшета. Биоптаты затем культивировали в 2 мл среды Дульбекко в модификации Искова (IMDM), дополненной 4% плазмой крови человека, β-

меркаптоэтанолом (50 мкМ), пенициллином (100 Ед/мл), стрептомицином (100 мкг/мл), амфотерицином B (2,5 мкг/мл), HEPES (10 мМ), пируватом натрия (1 мМ), раствором незаменимых аминокислот MEM (1X) и IL-15 (2 нг/мл, Miltenyi Biotech). 1 мл среды аспирировали каждые 3-4 дня и заменяли 1 мл полной среды, содержащей 2x концентрированный IL-15. TIL собирали через 10 или 11 дней, пропускали через нейлоновый фильтр для клеток 70 мкМ, центрифугировали при 300×g в течение 5 минут и ресуспендировали в полной среде для подсчета. Затем по 400000 клеток высевали на лунку в 96-луночные планшеты перед стимуляцией антителами к Vδ1. TIL стимулировали ADT1-4, ADT1-4-2, ADT1-7-3 или изотипическими контрольными антителами IgG1 к RSV в присутствии IL-15 в концентрации 2 или 50 нг/мл.

На **Фиг. 20 (A и B)** показано % снижения экспрессии Vδ1 TCR на всех инфильтрирующих опухоль Т-клетках γδ после 48 (A) или 72 (B) часов стимуляции мкАт у двух отдельных доноров, что подтверждает взаимодействие с мишенью в каждом случае. $Vδ1^+$ клетки, инфильтрирующие опухоль, анализировали на экспрессию CD25 и Ki67. На **Фиг. 20 (C)** показана повышенная экспрессия как CD25, так и Ki67 на $Vδ1^+$ Т-клетках после 48-часовой стимуляции с помощью ADT1-4-2 по сравнению со стимуляцией изотипическим контролем IgG1 или ADT1-4. Супернатанты культур стимулированных мкАт TIL анализировали на продукцию цитокинов с помощью MSD. На **Фиг. 20 (D)** показано существенное кратное увеличение продукции IFN-γ с помощью TIL, стимулированных ADT1-4-2 или ADT1-7-3, в течение 72 часов в присутствии 50 нг/мл IL-15. На **Фиг. 20 (E)** показано, что стимуляция TIL с помощью ADT-1-4-2 или ADT1-7-3 не усиливала секрецию ассоциированных с типом 17 цитокинов IL-6 или IL-17 в этот момент времени.

В качестве альтернативы, биоптаты от разных доноров ферментативно расщепляли при получении для получения суспензии отдельных клеток. В частности, в пробирку Miltenyi C помещали до 1 г ткани вместе с 4,7 мл RPMI, дополненного ферментами из набора Tumor Dissociation Kit от Miltenyi в концентрациях, рекомендованных производителем, помимо фермента R, который использовали в концентрации 0,2X для предотвращения расщепления соответствующих молекул клеточной поверхности. C-пробирки помещали в прибор gentleMACS™ Octo Dissociator с нагревательными блоками. Выбирали программу 37C_h_TDK_1 для диссоциации малых опухолей. Через 1 час продукт расщепления фильтровали через 70 мкМ фильтр и добавляли полную IMDM, содержащую 4% плазму человека, для гашения ферментативной активности. Клетки затем дважды промывали и ресуспендировали в полной IMDM для подсчета. В зависимости от числа клеток $2×10^6$ или $4×10^6$ клеток высевали на лунку в 48-луночные планшеты и стимулировали контрольными изотипическими антителами ADT1-4, ADT1-4-2 или IgG1 к RSV в присутствии IL-15 в концентрации 2 нг/мл. TIL, выделенные с помощью ферментативного расщепления, анализировали проточной цитометрией через 24 -72 часа после стимуляции мкАт. На **Фиг. 20 (F и G)** показан % снижения экспрессии Vδ1 TCR на всех инфильтрирующих опухоль γδ Т-клетках после стимуляции мкАт через 24 (F) или 72

(G) часа для двух отдельных доноров, что подтверждает взаимодействие с мишенью в TIL, выделенных путем ферментативного расщепления. На **Фиг. 20 (H)** показана дозозависимая повышенная экспрессия Ki67 на γδ Т-клетках после 72-часовой стимуляции с помощью ADT1-4-2. Супернатанты культур стимулированных мкАт TIL анализировали на продукцию цитокинов с помощью MSD. На **Фиг. 20 (I и J)** показана кратность увеличения IFN-γ, продуцируемого TIL, выделенными от двух отдельных доноров путем ферментативного расщепления и стимулированными ADT1-4-2 в концентрации 6,66 нМ в присутствии 2 нг/мл IL-15 в два момента времени: 24 часа (I) и 72 часа (J). Таким образом, эти объединенные результаты подчеркивают способность антитела к Vδ1 с созревшей аффинностью стимулировать активацию, пролиферацию и выработку противоопухолевых цитокинов инфильтрирующими опухоль γδ Т-клетками в течение 72 часов после стимуляции.

В другом эксперименте TIL, полученные из опухоли легкого, выделяли на сетчатых матрицах и стимулировали изотипическим контролем ADT1-4, ADT1-4-2 или IgG1 в течение 10 дней в присутствии 2 нг/мл IL-15. **На Фиг. 21 (A)** показана повышенная экспрессия CD25 и Ki67 в γδ Т-клетках, стимулированных в течение 10 дней с помощью ADT1-4-2. **На Фиг. 21 (B)** показано значительное увеличение перфорин$^+$ гранзим B$^+$ γδ Т-клеток после 10-дневной стимуляции с помощью ADT1-4-2. Стимуляция мкАт в течение более длительного периода времени позволила провести анализ иммунного лицензирования αβ Т-клеток с помощью Vδ1$^+$ Т-клеток, стимулированных антителом к Vδ1. **На Фиг. 21 (C)** показана значительно повышенная экспрессия гранзима B и перфорина как CD8$^+$, так и CD8$^-$ αβ Т-клетками после 10-дневной стимуляции инфильтрирующих опухоль Vδ1$^+$ Т-клеток с помощью ADT1-4-2. Супернатанты от TIL, культивируемых в течение 10 дней с мкАт, анализировали с помощью MSD. **На Фиг. 21 (D)** показано заметное увеличение продукции IFN-γ и умеренное увеличение продукции IL-17 и IL-6 TIL, полученными из опухоли легкого, после стимуляции ADT1-4-2. **На Фиг. 21 (E)** показана увеличенная продукция хемокинов CCL2, CCL4 и CXCL10 с помощью TIL после 10-дневной стимуляции с помощью ADT1-4-2. Таким образом, эти результаты подчеркивают способность антитела к Vδ1 стимулировать активацию и цитотоксичность в инфильтрирующих опухоль γδ Т-клетках, что затем может способствовать цитотоксичности в инфильтрирующих опухоль αβ Т-клетках.

ПРИМЕР 7. Аффинность связывания биспецифического антитела к Vδ1-EGFR с антигеном Vδ1 человека и EGFR человека

Аффинность связывания антител с мишенью (т.е. Vδ1-цепью γδ TCR и EGFR) устанавливают с помощью анализа методом SPR с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies). Антитело (1,5 мкг/мл) наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для получения исходного увеличения примерно на 500 мкРМЕд. Гетеродимер рекомбинантного Vδ1 человека или EGFR человека пропускали через ячейку в концентрации 100 нМ со следующими параметрами: ассоциация 180 с, диссоциация 480 с, скорость потока 25 мкл/мин, рабочий буфер PBS+0,05% Твин 20. Все эксперименты

проводили при комнатной температуре. Результаты показаны на Фиг. 26A и 26B.

Выводы: Эти данные демонстрируют, что биспецифические антитела к Vδ1/EGFR демонстрируют связывание с человеческим Vδ1, которое сравнимо со связыванием моноспецифических антител к Vδ1, используемых для их получения, несмотря на приобретение способности связывать EGFR человека.

ПРИМЕР 8. Связывание биспецифических антител к Vδ1-EGFR с целевой клеткой

EGFR-положительные A431 и Vδ1-положительные первичные γδT-клетки анализировали для определения специфичности и аффинности связывания биспецифического антитела к EGFR/Vδ1. Целевые клетки отделяли от колбы для тканевых культур, ресуспендировали в PBS и высевали при конечной плотности 100000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты с V-образным дном. Клетки подвергали центрифугированию, а клеточные осадки ресуспендировали в FcR-блокирующем реагенте в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали в течение 20 минут при 4°C перед дальнейшей промывкой. Антитела разбавляли до 500 нМ в PBS и последовательно разводили 1:10 в PBS до 50 пМ и добавляли к клеткам с последующей 20-минутной инкубацией при 4°C. Для определения количества мкАт, связанного с клеточной поверхностью, клетки затем окрашивали конъюгированным с APC мышиным вторичным антителом к IgG человека (разведение: 1:100) в дополнение к красителю для оценки жизнеспособности клеток. После 20-минутной инкубации при 4°C клетки дважды промывали и измеряли флуоресценцию с использованием MACSQuant. Результаты проиллюстрированы на Фиг. 27.

Выводы: эти данные демонстрируют, что биспецифические антитела к Vδ1/EGFR демонстрируют связывание с Vδ1-положительными γδT-клетками, которое сравнимо со связыванием моноспецифических антител к Vδ1, использованных для их получения, несмотря на приобретение способности связываться с EGFR-положительной линией клеток A431.

ПРИМЕР 9. Оценка активации γδ T-клеток и цитотоксичности в отношении целевых клеток in vitro

Размноженные полученные из кожи Vδ1 γδ T-клетки и клетки A431 отделяли от колб для тканевой культуры, ресуспендировали в основной ростовой среде и высевали в 96-луночные планшеты при соответствующих разведениях клеток в зависимости от желаемого соотношения эффектор:мишень. МкАТ разводили и добавляли в каждую лунку в указанной концентрации. Затем культуры инкубировали при 37oC, 5% CO2 в течение 4 (D) или 24 часов (A-C, E). Для определения количества живых клеток клетки собирали и окрашивали витальным красителем в разведении 1:1000 в течение 20 минут. Для определения статуса по CD25 после сбора клеток поверхность клеток окрашивали антителом к CD25. Для измерения дегрануляции конъюгированное с флуорофором антитело к CD107α добавляли непосредственно в смесь клеток и антител в начале совместного культивирования. После двух промывок и фиксации клеток измеряли флуоресценцию с использованием MACSQuant, подсчитывали количество живых клеток и определяли медианную

интенсивность флуоресценции. Результаты проиллюстрированы на Фиг. 28.

Выводы: эти данные демонстрируют, что биспецифические антитела к Vδ1/EGFR индуцируют активацию и дегрануляцию первичных Vδ1-положительных γδ Т-клеток, что приводит к усилению клеточно-опосредованного лизиса EGFR-положительной линии клеток A431.

ПРИМЕР 10. Дополнительная оценка эффектов активации и отсутствия истощения для γδ Т-клеток, обеспечиваемых антителами по данному изобретению

Были проведены исследования для изучения влияния стимуляции/активации vδ1 клеток антителами к vδ1 на снижение уровня CD3 на vδ1 клетках. Это было проверено путем инкубации клона ADT1-4-2 к vδ1 с PBMC и последующего анализа TCR путем фенотипирования.

Криоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) были получены из коммерческих источников и высеяны в круглодонные 96-луночные планшеты для тканевых культур по 250000 клеток на лунку в 250 мкл полной среды (RPMI с добавлением 10% FCS, пенициллина/стрептомицина, заменимых аминокислот, пирувата натрия и HEPES) с 10 нг/мл IL15.Антитело к vδ1 ADT1-4-2 для титрования добавляли до конечной концентрации 1 мкг/мл (6,67 нМ), 0,01 мкг/мл (0,067 нМ) или 0,0001 мкг/мл (0,00067 нМ).Антитело IgG к RSV было включено в качестве контроля в соответствующей концентрации.Культуры инкубировали в течение 14 дней с пополнением среды и антител каждые 3 дня.Анализ методом проточной цитометрии проводили в конечной точке для определения фенотипа vδ1 клеток и экспрессии TCR для каждого из условий.Клетки сначала гейтировали по живым синглетам, а затем по пан-γδ (Miltenyi REA592; 130-113-508), который был исходным гейтом для vδ1 (Miltenyi REA173; 130-100-553), который сам по себе был исходным гейтом для CD3 (Miltenyi REA613; 130-113-142). Популяции клеток идентифицировали по положительному окрашиванию, а также определяли относительный уровень экспрессии каждого маркера между образцами по MFI.

На Фиг. 29A показана MFI vδ1 TCR при стимуляции антителами как показатель взаимодействия мкАт с мишенью.**На Фиг. 29B** показан MFI экспрессии CD3 на положительно гейтированных vδ1 клетках. Стимуляция клоном антитела к vδ1 ADT1-4-2 взаимодействовала с vδ1 клетками и привела к снижению уровня как vδ1, так и CD3 на vδ1 клетках.

ПРИМЕР 11: Антитела к vδ1 не индуцируют ADCC.

Биолюминесцентный репортерный анализ ADCC (Promega) использовали для оценки уровня ADCC (антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности), индуцированного антителами к vδ1, по сравнению с контрольными антителами.

ADCC относится к биологическому явлению, при котором эффекторные клетки убивают целевые клетки, помеченные антителами. Эффекторные клетки связываются с антителами через свои Fcγ-рецепторы и впоследствии убивают целевую клетку. Представленный в данном документе биолюминесцентный репортерный анализ ADCC позволяет выявить потенциальные механизмы действия ADCC для антител, которые

тестируются в рамках анализа, путем обнаружения ранней инициации ADCC через активацию транскрипции генов по пути NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток). Репортерный анализ представляет собой сконструированную систему, в которой используются эффекторные клетки (Jurkat), которые экспрессируют высокоаффинный рецептор FcγRIIIa, связанный с путем NFAT, который дополнительно сконструирован для того, чтобы после его активации индуцировать дальнейшую активацию фермента люциферазы светлячка. Активность люциферазы количественно оценивают по данным люминесценции, которые могут коррелировать с имеющимися уровнями ADCC.

Этот анализ был использован для того, чтобы понять, будут ли антитела к Vδ1 или, в частности, плечо к Vδ1 полиспецифических антител стимулировать реакцию ADCC. Используемые целевые клетки представляли собой γδ клетки, которые связываются с антителом к vδ1 через vδ1 γδ TCR. Если функционирует механизм действия ADCC, антитело к vδ1 будет связываться с Fcγ-рецепторами на анализируемых эффекторных клетках и генерировать люминесцентный сигнал; если сигнал не генерируется, это предполагает, что ADCC не развивается.

Для этого анализа использовали набор ADCC Reporter Bioassay Kit (Promega). Один флакон аналитического буфера Bio-Glo Luciferase Assay Buffer был разморожен и его содержимое было перенесено во флакон с субстратом. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 4-6 часов. Планшет для разбавления готовили с концентрациями антител (при 3-кратной концентрации) в диапазоне от 10 нМ до 0,01 нМ (конечная концентрация) для следующих антител: антитело к vδ1 (ADT1-4-2), такое же антитело к vδ1, но с нефункциональным Fc (L235A, G237A) (ADT1-4-2 LAGA), ритуксимаб, RSV и OKT3. Целевые клетки (γδ клетки) высевали в 2 планшета для анализа по 25 мкл на лунку. Затем 25 мкл раствора соответствующего антитела из планшета для разбавления антител переносили в соответствующую лунку. Эффекторные клетки (сконструированные клетки Jurkat) оттаивали в теплом буфере для анализа, ресуспендировали в 4 мл буфера для анализа и пипеткой вносили 25 мкл раствора эффекторных клеток в каждую лунку. Затем планшеты инкубировали при 37°C в течение 4,5 часов. После периода инкубации планшетам давали уравновеситься до комнатной температуры, после чего в каждую лунку добавляли 75 мкл реагента Bio-Glo Luciferase Assay и инкубировали планшеты в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем планшеты считывали с помощью планшет-ридера Biotek H4, который регистрировал сигналы люминесценции (в относительных световых единицах RLU) с планшетов. Кратность индукции рассчитывали по следующему уравнению: кратность индукции=RLU (индуцированный сигнал - фоновый уровень)/RLU (контроль без антител - фоновый уровень).

В качестве положительного контроля использовали OKT3 (антитело к CD3). В качестве дополнительного положительного контроля вместо γδ клеток в контрольные лунки высевали клетки Raji. Клетки Raji представляют собой стандартную линию клеток, используемую для демонстрации сильной реакции ADCC при использовании с антителом к CD20, ритуксимабом. В качестве внутреннего контроля и для того, чтобы понять,

вызывают ли антитела к vδ1 ADCC в отсутствие связывания vδ1 на γδ клетках, использовали антитела к vδ1 по настоящему изобретению и те же антитела к vδ1, но с нефункциональным Fc, L235A, G237A) также добавляли только к эффекторным клеткам.

Результаты приведены на **Фиг. 30.**

Выводы: Сильная реакция ADCC была показана в положительном контроле с использованием ритуксимаба с клетками Raji, и еще более сильная реакция ADCC была продемонстрирована с OKT3 против γδ клеток. Напротив, реакции ADCC не было обнаружено ни в одном из условий с использованием антител к vδ1 по настоящему изобретению, тех же антител к vδ1, но также нефункциональным Fc L235A, G237A или RSV-отрицательного контроля. Это свидетельствует о том, что в данной системе антитела по данному изобретению, которые связываются с vδ1, (такие как мкАт к vδ1 или полиспецифические антитела к vδ1) не демонстрируют механизм действия ADCC. Примечательно, что даже антитела к Vδ1 с функциональным Fc не истощают γδ Т-клетки, что обеспечивает возможность сохранения функции Fc в представленных в данном документе антителах к Vδ1, добавляя функциональность, например, в опухолевом окружении с высоким содержанием Fcγ. Это дополнительно подчеркивает пригодность таких антител к Vδ1 для включения в форматы биспецифических антител, как описано в данном документе.

ПРИМЕР 12: Оценка технологичности/стабильности полиспецифических антител к Vδ1xEGFR

Для лучшего понимания технологичности/стабильности новых полиспецифических молекул к Vδ1xEGFR, как описано в данном документе, изобретатели провели оценку панели этих молекул с помощью различных способов. В ходе исследований были выявлены удивительные различия, которые описаны ниже.

(A) Выход для CHO

Способ: полиспецифические антитела были впервые получены с помощью стандартной платформы экспрессии CHO («Платформа CHO 1»). Эта платформа включает стандартные векторы экспрессии, содержащие кассеты тяжелой и легкой цепи. Для производства использовали адаптированные к суспензии клетки CHO K1 (первоначально из ATCC и адаптированные к бессывороточному росту в суспензионной культуре). Посевные клетки выращивали в среде определенного химического состава, не содержащей компонентов животного происхождения и не содержащей сыворотки. Затем клетки трансфицировали векторами и реагентом для трансфекции, и клетки выращивали дальше. Супернатант собирали путем центрифугирования, а антитело очищали с использованием MabSelect™ SuRe™ перед приготовлением состава.

Выводы: сравнительный выход для двух молекул, экспрессированных на этой платформе, показаны на Фиг. 34A и демонстрируют более высокую степень экспрессии и извлечения ADT1-4-2xLEE по сравнению с ADT1-4-2xFS1-67 (показано стрелкой). Затем было проведено дальнейшее сравнение на альтернативной платформе CHO («Платформа CHO 2»). На этой альтернативной платформе выходы для каждой молекулы были более

сопоставимыми.

(B) Стабильность в условиях «ускоренного старения»

Способ: антитела, полученные на «платформе CHO 2», указанной выше, затем были приготовлены в стандартном буфере для приготовления антител в концентрации 2 мг/мл и исследованы в условиях «ускоренного старения» (37°C). Затем молекулы анализировали стандартными методами icIEF с использованием платформы Uncle и стандартных протоколов (Unchained Labs, штат Калифорния, США).

Выводы: на Фиг. 34B показано, что хотя большинство молекул оказались относительно стабильными, для молекулы ADT1-4-2xFS1-67 уже через 48 часов было отмечено заметное увеличение количества основной молекулы (указано стрелкой). Для других молекул такого увеличения не наблюдали, как показано на примере молекулы ADT1-4-2xLEE на этой Фиг. 34B. Это открытие демонстрирует, что молекула ADT1-4-2xLEE является более стабильным (например, более термостабильным) полиспецифическим антителом к Vδ1xEGFR. Учитывая, что единственные различия в последовательностях между ADT1-4-2xFS1-67 и ADT1-4-2xLEE находятся в положениях L358.T359.K360, это позволяет предположить, что в некоторых случаях полиспецифическое антитело к Vδ1xEGFR, содержащее по меньшей мере один первый связывающий домен, полученный из антитела, нацеленного на Vδ1-цепь γδ TCR, и второй связывающий домен, связывающий рецептор EGF и содержащий L358.E359E.E360, является более предпочтительным вариантом по сравнению с биспецифической молекулой к Vδ1xEGFR, которая вместо этого содержит T358.D359.D360 в этих положениях (все нумерации соответствуют EU).

(C) Склонность к агрегации

Способ: профиль плавления полиспецифических антител оценивали с использованием протоколов Uncle и стандартных протоколов (Unchained Labs, Калифорния, штат США).

Выводы: на Фиг. 34C показано, что для молекулы ADT1-4-2xFS1-65 начало агрегации наступает раньше, чем плавление, что приводит к значительной дельте (показано стрелкой). Это контрастирует с другой молекулой, для которой начало агрегации в большей степени совпадало с началом плавления. Одновременное плавление/агрегация обычно указывает на более стабильную молекулу.

(D) Профиль распада при более высоких концентрациях в условиях «ускоренного старения» (анализ в невосстанавливающих условиях)

Способ: В то время как в ходе исследовании, в которых изучали склонность к агрегации при дозе 2 мг/мл, не выявили существенных различий, в исследованиях при дозе 5 мг/мл (в условиях «ускоренного старения», 18 дней при 37 °C) выявили заметные изменения в различных молекулах при анализе с помощью CE-SDS в невосстанавливающих условиях с использованием протоколов Maurice и стандартных протоколов (Unchained Labs, штат Калифорния, США).

Выводы: в результате такого анализа было отмечено значительное увеличение

появления немономерных примесей для ряда (но не во всех) проанализированных биспецифических молекул. Иллюстративные результаты и сводные результаты этого исследования в виде таблицы представлены на Фиг. 34D (отмеченные изменения указаны стрелками).

(E) Профиль распада при высоких концентрациях в условиях «ускоренного старения» (анализ в восстанавливающих условиях)

Хотя исследования в (D) выше подчеркивают, что ADT1-4-2xFS1-67 демонстрировал более стабильный профиль в условиях «ускоренного старения» при анализе в невосстанавливающих условиях, при анализе CE-SDS в восстанавливающих условиях (снова с использованием протокола Uncle и стандартных протоколов, Unchained Лаборатории, штат Калифорния, США), та же самая молекула ADT1-4-2xFS1-67 демонстрировала уникальный атипичный профиль по сравнению с другими полиспецифическими молекулами, проиллюстрированными на Фиг. 34E с помощью ADT1-4-2xLEE. ADT1-4-2xLEE не демонстрирует повышенную «плечистость на кривой», наблюдаемую после 18 суток при 37°C (что характерно только для ADT1-4-2xFS1-67), что может свидетельствовать о более подходящих свойствах ADT1-4-2xLEE.

ПРИМЕР 13. Повышение/понижение аффинности на VD1-связывающем плече полиспецифических антител к VD1xEGFR.

В этих исследованиях была создана серия полиспецифических антител, для которых

аффинность к Vδ1+ повышалась/понижалась примерно от 0,2 нМ до 20 нМ, в то время как

аффинность к EGFR сохранялась на постоянном уровне около 1 нМ.

Эффекты этих молекул затем были изучены в серии экспериментов. В эту серию исследований также была включена контрольная полиспецифическая молекула D1.3 x EGFR. Этот контроль включал первый связывающий домен мкАт D1.3, который связывает куриный лизоцим (вместо Vδ1 TCR), и второй связывающий домен, который связывает EGFR с аффинностью около 1 нМ.

(A) Сводная информация об аффинности.

Представлены номенклатура и аффинность этой панели полиспецифических молекул.

Метод SPR для примера 13. Аффинность связывания антител с мишенью (человеческий Vδ1) устанавливали с помощью анализа методом SPR с использованием прибора 4SPR (Reichert Technologies). Антитела (1,5 мкг/мл) наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для получения исходного увеличения примерно на 500 мкРМЕд. Человеческий антиген Vδ1 пропускали через клетку в серии разведений 1:3 с максимальными концентрациями 50 нМ со следующими параметрами: ассоциация 180 с, диссоциация 900 с, скорость потока 25 мкл/мин, рабочий буфер PBS+0,05% Tween-20. Поверхность чипа регенерировали с использованием 20 мМ фосфорной кислоты после каждой инжекции. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Аппроксимацию в стационарном состоянии определяли в соответствии со связыванием

Ленгмюра 1:1 с помощью программного обеспечения TraceDrawer (Reichert Technologies).

(B)(C) Влияние аффинности к vδ1 TCR на полиспецифическое связывание с присущими ткани Vδ1+ клетками.

В этом первом эксперименте с этой группой молекул была изучена роль аффинности к Vδ1 TCR.

Способ: эффекторные Vδ1+ клетки, полученные из ткани кожи, инкубировали совместно с антителами, которые серийно разводили в PBS до диапазона концентраций от 10 нМ до 0,13 пМ. Клетки инкубировали в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали и окрашивали вторичным антителом к Fc человека (Jackson Immunoresearch) и витальным красителем для определения мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen) в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences) перед анализом на проточном цитометре MACSQuant Analyser 10 (MilteNY).

Выводы: представленные данные о связывании предполагают сильную корреляцию между повышенной аффинностью к Vδ1 и повышенным уровнем связывания полиспецифических антител с присущими тканям Vδ1+ клетками.См. Фиг. 35B и Фиг. 35C, на которых показаны табличные результаты Фиг. 35B. Эти данные подчеркивают, что молекулы с более высокой аффинностью дают усиленные эффекты при насыщающих концентрациях. Примечательно, что эффекты, оказываемые вариантами с более высокой аффинностью, нельзя имитировать или повторить с помощью более высоких концентраций вариантов с более низкой аффинностью антител.Это свидетельствует о том, что молекулы с (неестественно) высокой аффинностью к Vδ1 TCR оказывают различные эффекты, которые молекулы с более низкой аффинностью не способны имитировать даже при значительно более высоких концентрациях (например, 100-кратных). Это открытие также рассматривается далее в данном документе.

Дополнительные эффекты этих молекул были затем изучены в следующей серии экспериментов. Эффекторные Vδ1+ клетки, полученные из ткани кожи, инкубировали совместно с линией EGFR+ раковых клеток меланомы A375 следующим образом:

Сначала EGFR+ клетки-мишени высевали в многолуночные планшеты для тканевых культур примерно за 16 часов до проведения анализа.

На следующий день антитела серийно разводили до диапазона концентраций в основную ростовую среду перед добавлением к EGFR+ клеткам-мишеням.

Vδ1γδ Т-клетки, полученные из кожи, отделяли от культуральных колб, клеточные суспензии высевали в планшеты для анализа и совместные культуры инкубировали в течение указанного периода времени при 37°C, 5% CO2.

Клетки обрабатывали и анализировали в зависимости от выбранного метода считывания, как описано в каждом случае.

Результаты этих исследований представлены следующим образом:

(D) (E) Влияние аффинности к vδ1 TCR на интернализацию Vδ1 TCR присущими тканями Vδ1+ клетками.

В этом первом анализе, в котором эффекторные Vδ1+ клетки совместно

инкубируются с раковыми EGFR+ клетками, основное внимание уделяется индукции интернализации Vδ1 TCR после взаимодействия с полиспецифическими антителами.

Способ: совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 2,5×10^4 Vδ1γδ Т-клеток к 2,5×10^4 целевых EGFR+ клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Перед добавлением Vδ1γδ Т-клетки окрашивали витальным красителем CellTrace Violet (0,5 мкМ) в течение 20 минут. Конечные анализируемые концентрации антител находились в диапазоне от 10 нМ до 0,13 пМ. После инкубации в течение 4 часов при 37°C, 5% CO2 клетки собирали и окрашивали для выявления мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen) и на поверхностную экспрессию Vδ1 TCR (MilteNYBiotec) в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences) перед анализом на проточном цитометре MACSQuant Analyser 10 (MilteNY).

Заключение: снижение MFI представлено на Фиг. 35D. Эти результаты указывают на усиление снижения уровня TCR при взаимодействии антител. Также было обнаружено, что чем выше аффинность, тем больше снижение сигнала MFI (и, следовательно, снижение уровня TCR). Примечательно, что даже при добавлении в 100 раз большего количества молекулы с более низкой аффинностью (ADT1-4-138xADT3-2) не удавалось вызвать эквивалентного снижения сигнала. Это предполагает, что неестественно высокая аффинность к мишени TRDV1 может еще больше усилить снижение уровня TCR. Это также предполагает, что очень высокая аффинность связывания оказывает различное влияние на функцию TCR. Можно только предполагать, почему такая высокая аффинность необходима для достижения более оптимальных эффектов насыщения и подавления. Возможно, это стохастический эффект на гомогенную Vδ1+ популяцию, когда более длительное время пребывания (за счет снижения скорости диссоциации) молекул с более высокой аффинностью обеспечивает более высокий эффект насыщения, возможно, за счет более высокого уровня перекрестного связывания TCR. Возможная альтернатива состоит в том, что субпополяция Vδ1+ клеток невосприимчива к эффектам снижения уровня TCR, вызываемым молекулами с более низкой аффинностью. Краткое описание результатов на Фиг. 35D представлено в виде таблицы (см. Фиг. 35E). Это еще раз подчеркивает тот факт, что высокая аффинность обеспечивает различные эффекты при насыщающих концентрациях и что сниженный эффект, обеспечиваемый молекулами с более низкой аффинностью, не может быть компенсирован дозированием при более высоких концентрациях.

(F)(G) Влияние аффинности к vδ1 TCR на дегрануляцию присущих тканям Vδ1+ клеток.

Следующий анализ проводили с целью изучения эффектов дегрануляции, обеспечиваемых полиспецифическими антителами по данному изобретению.

Способ: совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 2,5×10^4 Vδ1γδ Т-клеток к 2,5×10^4 целевых EGFR+ клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Перед добавлением Vδ1γδ Т-клетки окрашивали витальным

красителем CellTrace Violet [0,5 мкМ] в течение 20 минут. Конечные анализируемые концентрации полиспецифических антител находились в диапазоне от 10 нМ до 0,13 пМ. Кроме того, в начале совместной инкубации добавляли конъюгированное с флуорофором антитело, специфичное к CD107a (MilteNYBiotec). После инкубации в течение 4 часов при 37°C и 5% CO2 клетки собирали и окрашивали для выявления мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen) в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences) перед анализом на проточном цитометре MACSQuant Analyser 10 (MilteNY).См. Фиг. 35F.

Выводы: эти исследования еще раз демонстрируют, что повышенная аффинность обеспечивает оптимальные эффекты. Наблюдается прямая корреляция между усилением повышения уровня CD107a и повышенной аффинностью. Еще раз эти данные свидетельствуют о неестественно высокой аффинности к Vδ1 TCR, что приводит к заметно отличающимся, более благоприятным эффектам, которые невозможно повторить с молекулами с более низкой аффинностью к Vδ1, даже при дозировании в гораздо более высоких концентрациях. Сводные результаты из Фиг. 35F представлены в виде таблицы. (см. Фиг. 35G) Еще раз подчеркнем, что более высокоаффинные молекулы при насыщающих концентрациях оказывают различный, более усиленный эффект насыщения по сравнению с менее аффинной молекулой, даже при использовании гораздо более высоких концентраций.

(H)(I) Влияние аффинности к vδ1 TCR на цитолитическую функцию полиспецифических соединений в отношении EGFR+ раковых клеток.

Следующий анализ проводили с целью изучения цитолитического эффекта, обеспечиваемого полиспецифическими антителами по данному изобретению.

Способ: совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 4×10^3 Vδ1γδ Т-клеток к 4×10^3 целевых EGFR+ клеток на лунку в 384-луночных планшетах CellCarrier Ultra (PerkinElmer). Конечные анализируемые концентрации антител находятся в диапазоне от 5 нМ до 0,03 пМ. После инкубации в течение 24 часов при 37°C, 5% CO2, клетки окрашивали Hoechst 33342 (Invitrogen) и окрашивали для выявления мертвых клеток (DRAQ7, Abcam) в течение 1 часа при 37°C. Клетки визуализировали с помощью системы Opera Phenix (PerkinElmer) и количество жизнеспособных клеток-мишеней определяли с использованием модели линейной регрессии (Harmony 4.9) на основе размера, морфологии, микроструктуры и интенсивности окрашивания живых клеток и отсутствия окрашивания DRAQ7.

Заключение: представленные в данном документе данные демонстрируют, что молекулы с самой высокой аффинностью к Vδ1 являются наиболее активными и цитолитическими по отношению к EGFR+ раковым клеткам. См. Фг. 35H. Кроме того, наблюдались качественные различия между полиспецифическими антителами с самой низкой аффинностью к Vδ1 (20 нМ) и полиспецифическими антителами со средней и высокой аффинностью к Vδ1 (1,2 нМ и 0,2 нМ, соответственно), при этом наблюдались заметно различающиеся эффекты насыщения. Это говорит о том, что неестественно

высокая аффинность обеспечивает совершенно разные, улучшенные эффекты. Эти эффекты невозможно имитировать с использованием молекул с более низкой аффинностью к Vδ1 TCR, даже при дозировании в гораздо более высоких (например, 100-кратных) концентрациях. Сводные результаты из Фиг. 35H представлены в виде таблицы (см. Фиг. 35I). Это свидетельствует о том, что молекулы с более высокой аффинностью при насыщающих концентрациях оказывают более выраженный эффект по сравнению с молекулами с более низкой аффинностью, даже при значительно более высоких концентрациях.

(J)(K) Влияние аффинности к vδ1 TCR на пролиферацию присущих тканям Vδ1+ клеток.

Следующий анализ проводили с целью изучения индукции пролиферации Vδ1+ клеток, вызываемой полиспецифическими антителами по данному изобретению.

Способ: Совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 3×10^4 Vδ1γδ Т-клеток к 1,5×10^4 целевых EGFR+ клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Перед добавлением целевые клетки окрашивали витальным красителем CellTrace Violet [0,5 мкМ] в течение 20 минут. Конечные анализируемые концентрации полиспецифических антител находятся в диапазоне от 2 нМ до 0,25 пМ. Клетки инкубировали в течение 5 или 7 дней при 37°C, 5% CO2. Полные среды с добавлением цитокинов (IL-2, IL-15, IL-4 и IL-21; необходимое количество) добавляли на 3-й и 5-й день. Клетки промывали и окрашивали для выявления мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen) в течение 20 минут при температуре 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences). Количество событий измеряли с помощью проточной цитометрии на следующий день с использованием MACS Quant Analyser 10.

Заключение: эти исследования еще раз подтверждают вывод о том, что увеличение аффинности приводит к усилению эффекта, при этом наблюдается прямая зависимость между увеличением индукции пролиферации Vδ1 Т-клеток и увеличением аффинности. См. Фиг. 35J (и обобщен в виде таблицы на Фиг. 35K). Это наиболее очевидно на итерации с самой высокой аффинностью, демонстрирующей самые низкие EC50 и EC95 и самое высокое максимальное количество клеток.Молекулы с более высокой аффинностью более эффективно стимулируют пролиферацию Vδ1 Т-клеток. Интересно, что в отличие от других технических эффектов, обеспечиваемых молекулами с более высокой аффинностью, в данном случае аналогичные эффекты могут обеспечивать молекулы с более низкой аффинностью при концентрации в 100 раз выше.

(L) ОБЩЕЕ РЕЗЮМЕ ЭТОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

См. Фиг. 35L.

В данном резюме подчеркивается

благоприятные технические эффекты, обеспечиваемые антителами по данному изобретению с более высокой аффинностью (менее 10 нМ) к Vδ1+ TCR;

а также то, какие из сниженных эффектов, обеспечиваемых молекулами с более низкой аффинностью (более 10 нМ), можно компенсировать увеличением концентрации в

100 раз и более.

(M) Влияние количества копий TAA.

Приведенные выше выводы, обобщенные на Фиг. 35L, подчеркивают некоторые интересные результаты. В частности,

молекулы с высокой аффинностью (к Vδ1 TCR) оказывают улучшенные эффекты по сравнению с вариантами молекул с более низкой аффинностью и

снижение эффектов, оказываемых вариантами с более низкой аффинностью, не всегда может быть компенсировано увеличением концентрации этих молекул.

Однако затем изобретатели исследовали влияние числа копий на вторую мишень (в данном случае EGFR) в таких анализах. (См. Фиг. 35M). В исследованиях использовались те же методологии, что изложены выше, но была заменена линия TAA раковых клеток с меньшим числом копий (A375) на линию раковых клеток (A431), имеющую чрезвычайно высокое число копий. Интересно, что в этом эквивалентном исследовании, которое, следовательно, включало совместную инкубацию Vδ1+ первичных клеток с линией EGFR+ раковых клеток с исключительно высоким числом копий, был получен другой результат. В частности, в некоторых случаях более слабые эффекты, наблюдаемые при использовании вариантов с более низкой аффинностью, могут быть преодолены путем увеличения концентрации этих вариантов в анализе при сочетании с раковой клеточной линией с более высоким числом копий TAA. В то время как высокоаффинные молекулы проявляют сходный эффект при одинаковых концентрациях независимо от числа копий EGFR в линии раковых клеток, используемых в анализе, для низкоаффинных молекул комбинация повышения концентрации молекулы и использования линии раковых клеток с более высоким числом копий приводила к компенсаторному эффекту. При использовании более высоких концентраций низкоаффинных вариантов в таких условиях, низкоаффинные молекулы впервые могут имитировать эффекты насыщения высокоаффинных молекул, достигая максимального увеличения уровня CD107a и максимального снижения уровня TCR.

Это позволяет предположить, что сниженный эффект молекул с более низкой аффинностью может быть «восстановлен», если

(a) в анализе применяют линии целевых клеток с очень высоким уровнем TAA и

(b) применяют 100-кратное (или более) увеличение концентрации молекулы.

Хотя о механизме, лежащем в основе этих результатов, можно только предполагать, они еще раз подчеркивают преимущества молекул по данному изобретению, обладающих более высокой аффинностью к Vδ1 TCR. Например, эффективность вариантов с низкой аффинностью значительно снижается, если целевые линии раковых клеток имеют нормальные уровни TAA EGFR. Эту проблему невозможно преодолеть более высокими дозами. Кроме того, в случае с TAA EGFR хорошо известно, что злокачественные новообразования с чрезвычайно высоким числом копий EGFR составляют меньшинство при большинстве злокачественных новообразования, например, см. недавние исследования некоторых злокачественных новообразований, например, рака молочной железы

(например, Kim et al 201310.1371/journal.pone.0079014) или злокачественных новообразований головы и шеи (например, Licitra et al 2011 DOI: 10.1093/annonc/mdq588) или злокачественных новообразований желудка (например, Zhang et al 2015 doi.org/10.3892/ol.2015.3875). Таким образом, совершенно очевидны повышенная эффективность и удивительные преимущества антител с неестественно более высокой аффинностью по данному изобретению по сравнению с вариантами с более низкой аффинностью.

ПРИМЕР 14: Повышение/понижение аффинности EGFR-связывающего плеча полиспецифических антител к VD1xEGFR.

Была создана серия полиспецифических антител, для которых

аффинность к EGFR повышалась/понижалась, в то время как

аффинность к Vδ1 сохранялась на постоянном уровне около 0,2 нМ.

Стартовый EGFR-связывающий домен (FS1-67) для этого исследования был описан ранее (WO2018015448). Одной из причин для дальнейшей модификации этого связывающего домена была попытка дальнейшей точной настройки аффинности этого домена при его использовании в полиспецифических антителах по данному изобретению. При этом авторы изобретения обнаружили, что возвращение определенных аминокислот в связывающих доменах EGFR обратно к последовательности иммуноглобулина человека дикого типа влияет на аффинность к мишени EGFR больше, чем другие. Это исследование привело к открытию группы более точно настроенных связывающих доменов с диапазоном вариантов аффинности связывания в диапазоне от около 1 нМ до около 140 нМ для EGFR. Различные EGFR-связывающие домены придавали ряд отличительных свойств при включении в полиспецифические антитела по данному изобретению. Соответственно, эта панель полиспецифических антител также оказалась неоценимой при изучении и определении роли аффинности.

В это исследование также включен, если это указано, полиспецифический контроль D1.3xFS1-67 (содержащий второй EGFR-связывающий домен с аффинностью 1 нМ и первый связывающий домен, содержащий домен связывания с куриным лизоцимом)

(A) Сводная информация об аффинности

Представлены номенклатура и аффинность этой панели полиспецифических молекул.

Метод SPR для примера 14: для человеческого EGFR рекомбинантный белок (Stratech; 10001-H08H-SIB-100ug) иммобилизовали на сенсорный чип на основе карбоксилметилдекстрана (Reichert Technologies), чтобы обеспечить увеличение исходного уровня примерно на 500 uRIU. Диапазоны концентраций антител (7,5-200 нМ) вводили в буфер PBS-T со следующими параметрами: ассоциация 180 с, диссоциация 660 с, скорость потока 25 мкл/мин, рабочий буфер PBS-T. Поверхность чипа регенерировали с использованием 20 мМ фосфорной кислоты после каждой инжекции. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Аппроксимацию в стационарном состоянии определяли согласно связыванию Ленгмюра 1:1 с использованием программного

обеспечения TraceDrawer (Reichert Technologies).

Выводы: сводные результаты представлены на Фиг. 36A. Для этого исследования стартовый связывающий модуль FS1-67 на основе CH3 содержит 5 модификаций в петле AB, 3 в петле CD и 5 в петле EF. При попытке в той или иной степени изменить аффинность этой молекулы было сделано несколько интересных открытий. Например, было обнаружено, что возвращение всех 5 аминокислот в петле AB обратно к последовательности дикого типа оказывает наиболее существенное влияние на аффинность связывания с EGFR (ADT1-4-2xLEE1, как указано, черный прямоугольник с пунктирной линией). Безусловно, по сравнению с полным возвращением петли CD или (частичным) возвращением петли EF к последовательности иммуноглобулина дикого типа (ADT1-4-2xLEE2 и ADT1-4-2xLEE3 соответственно), изменения в петле AB оказались наиболее значимыми.Действительно, по некоторым показателям (см. ниже) возвращение петли AB к последовательности дикого типа приводило к потере аффинности и специфичности связывания. Следовательно, было неожиданно, что на аффинность не повлияло, когда неконсервативная аминокислота, обнаруженная в петле AB FS1-67, была модифицирована из треонина (полярного) обратно в лейцин (неполярный). Это подтверждается сравнением молекулы ADT1-4-2 LEE (выделена черным прямоугольником со сплошной линией, 1 изменение - незначительное влияние на аффинность/функцию) с молекулой ADT1-4-2 LEE1 (выделена черным прямоугольником с пунктирной линией, 5 изменений - наибольшее влияние на аффинность/функцию). При этом полученное ADT1-4-2xLEE теперь содержит только 4 изменения в петле AB, а также включает в дополнительные модификации. Следовательно, нельзя исключить, что эти другие (консервативные) изменения в связывающей петле (D3659E, D360E) также способствовали сохранению высокой аффинности; хотя это и удивительно. В любом случае, учитывая возврат таких модификаций обратно к дикому типу, можно снизить риск иммуногенности в полученных полиспецифических антителах по настоящему изобретению, лейцин дикого типа в положении 358 - и как часть замены 4 аминокислот на петлю AB - является считается более предпочтительным по сравнению с заменами 5 (или более) аминокислот, обнаруженными в стартовых EGFR-связывающих доменах FS1-67, FS1-65 или 747, включенных в ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xFS1-65 и ADT1-4-2×747, соответственно.

(B)(C) Влияние аффинности к EGFR на связывание полиспецифических соединений с EGFR+ линией клеток рака толстой кишки HT-29.

Способ: пример связывания полиспецифических антител к EGFRxVδ1 определяли путем инкубации EGFR+ клеток-мишеней HT-29 с антителами, которые были серийно разведены в PBS до диапазона концентраций от 500 нМ до 0,13 пМ, в течение 20 минут при 4 градусах. После промывки клетки инкубировали еще 20 минут со вторичными антителами к IgG человека (Jackson Immunoresearch) и витальным красителем (eFluor 780, Invitrogen) перед промыванием и фиксацией с помощью CellFix. Количество антител, связанных с каждым типом клеток, определяли с помощью проточной цитометрии (MACSQuant Analyser 10, MilteNY Biotech).

Выводы: представленные данные свидетельствуют о наличии сильной, прямой и градуированной корреляции между увеличением аффинности к EGFR и повышением уровня связывания полиспецифического антитела с EGFR+ раковыми клетками HT-29.См. Фиг. 36B. На Фиг. 36C представлены результаты из Фиг. 36B в табличной форме.

Дополнительные эффекты этих молекул были затем изучены в следующей серии экспериментов. Вкратце, эффекторные Vδ1+ клетки, полученные из ткани кожи, инкубировали совместно с EGFR+ линией раковых клеток меланомы A375 следующим образом; EGFR+ целевые клетки высевали в многолуночные планшеты для тканевых культур примерно за 16 часов до проведения анализа. На следующий день антитела серийно разводили до диапазона концентраций в основную ростовую среду перед добавлением к EGFR+ клеткам-мишеням. Vδ1γδ T-клетки, полученные из кожи, отделяли от культуральных колб, клеточные суспензии высевали в планшеты для анализа и совместные культуры инкубировали в течение указанного периода времени при 37oC, 5% CO2. Клетки обрабатывали и анализировали в зависимости от выбранного метода считывания, как описано в каждом случае. Результаты этих исследований представлены следующим образом:

(D) (E) Влияние аффинности кEGFR на снижение уровня Vδ1 TCR в присущих тканям Vδ1+ клетках.

Следующий анализ проводили с целью изучения индукции интернализации Vδ1 TCR после взаимодействия с полиспецифическими антителами.

Способ: Совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 2,5×10^4 Vδ1γδ T-клеток к 2,5×10^4 клеток-мишеней A375 EGFR+ на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Перед добавлением Vδ1γδ T-клетки окрашивали витальным красителем CellTrace Violet [0,5 мкM] в течение 20 минут. Конечные анализируемые концентрации антител находились в диапазоне от 10 нМ до 0,13 пМ. После инкубации в течение 4 часов при 37°C и 5% CO2 клетки собирали и окрашивали для выявления мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen) и на поверхностную экспрессию Vδ1 TCR (MilteNYBiotec) в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences) перед анализом на проточном цитометре MACSQuant Analyser 10 (MilteNY).

Выводы: уменьшение MFI для Vδ1 TCR свидетельствует об усилении снижения уровня TCR, и, в частности, было обнаружено, что чем выше аффинность к EGFR, тем сильнее снижается этот сигнал. Примечательно, однако, что связь между аффинностью к EGFR и индукцией снижения уровня TCR оказалась не градуированной корреляцией, а зависела от порогового значения аффинности. В частности, три молекулы (ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE2 и ADT1-4-2xLEE3), которые соответственно демонстрировали аффинность около 1 нМ, около 9 нМ и около 19 нМ к EGFR, группировались близко друг к другу и оказывали аналогичные эффекты снижения уровня TCR и соответствующие значения EC50. Эти три молекулы значительно контрастировали с ADT1-4-2xLEE1. Как обсуждалось ранее, эта молекула содержит петлю AB иммуноглобулина дикого типа и

демонстрирует самую низкую аффинность - около 140 нМ. Эта молекула не оказывает желаемого эффекта снижения уровня TCR по сравнению с тремя другими молекулами даже в комбинации с высокоаффинным связывающим доменом к Vδ1 TCR ADT1-4-2, как в данном случае. Это позволяет предположить, что существует пороговый эффект или эффект насыщения с полиспецифическими антителами, такими как ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE2 и ADT1-4-2xLEE3, сгруппированными вместе и отделенными от молекул с более низкой аффинностью к EGFR, например, ADT1-4-2xLEE1. Это контрастирует с более мелкими, более градуированными событиями аффинности/связывания, наблюдавшимися ранее (см. Фиг. 36B выше), когда эффекты связывания, обеспечиваемые полиспецифическими антителами, распределялись по их соответствующей аффинности ко второй мишени связывания EGFR, а не объединялись в две контрастирующие группы. См. Фиг. 36D. На Фиг. 36E представлены результаты из Фиг. 36D в табличной форме.

(F)(G) Влияние аффинности к EGFR на дегрануляцию присущих тканям Vδ1+ клеток

Следующий анализ проводили с целью изучения эффектов дегрануляции, обеспечиваемых полиспецифическими антителами по данному изобретению.

Способ: совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 2,5×10^4 Vδ1γδ Т-клеток к 2,5×10^4 целевых EGFR+ клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Перед добавлением Vδ1γδ Т-клетки окрашивали витальным красителем CellTrace Violet [0,5 мкМ] в течение 20 минут. Конечные анализируемые концентрации полиспецифических антител находились в диапазоне от 10 нМ до 0,13 пМ. Кроме того, в начале совместной инкубации добавляли конъюгированное с флуорофором антитело, специфичное к CD107a (MilteNYBiotec). После инкубации в течение 4 часов при 37°C и 5% CO2 клетки собирали и окрашивали для выявления мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen) в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences) перед анализом на проточном цитометре MACSQuant 16 (MilteNY).

Выводы: эти исследования еще раз демонстрируют, что повышенная аффинность к EGFR обеспечивает оптимальный эффект, причем наблюдается корреляция между усилением повышения уровня CD107a и повышением аффинности. Эта связь зависит от порогового значения аффинности. Как и в случае снижения уровня TCR, полиспецифические антитела с диапазоном аффинности к EGFR от около 1 до около 19 нМ группировались вместе и индуцировали значительно более высокие уровни CD107a по сравнению с молекулой с более низкой аффинностью (ADT1-4-2xLEE1). Эти данные позволяют предположить, что полиспецифические антитела по настоящему изобретению со средней и высокой аффинностью к EGFR вызывают заметно отличающиеся, более благоприятные эффекты в определенных условиях, которые невозможно повторить с молекулами с более низкой аффинностью к EGFR, даже при дозировании в гораздо более высоких концентрациях (например, 1000-кратных). Результаты показаны на Фиг. 36F и обобщены в виде таблицы на Фиг 36G.

(H)(I) Влияние аффинности EGFR на статус активации 41BB присущих тканям Vδ1+ клеток.

Следующий анализ проводили с целью изучения увеличения индуцируемого активацией маркера 41BB Vδ1+ клеток, обеспечиваемого полиспецифическими антителами по данному изобретению.

Способ: Совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 2×10^4 Vδ1γδ Т-клеток к 2×10^4 целевых EGFR+ клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Перед добавлением Vδ1+γδ Т-клетки окрашивали витальным красителем CellTrace Violet [0,5 мкМ] в течение 20 минут. Конечные анализируемые концентрации полиспецифических антител находились в диапазоне от 100 пМ до 0,13 пМ. После инкубации в течение 24 часов при 37°C и 5% CO2 клетки собирали и окрашивали для выявления мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen) и на поверхностную экспрессию 41BB (MilteNYBiotec) в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences) перед анализом на проточном цитометре MACSQuant Analyser 10 (MilteNY).

Выводы: представленные в данном документе данные (см. Фиг. 36H и сводную таблицу на Фиг. 36I) свидетельствуют о том, что полиспецифические антитела по данному изобретению с более высокой аффинностью к EGFR наиболее эффективно усиливают повышение уровня 41BB в Vδ1+ клетках. Как и в некоторых других исследованиях, которые обсуждали ранее, значительные качественные различия снова наблюдали между полиспецифическими антителами с наименьшей аффинностью к EGFR около 140 нМ и полиспецифическими антителами со средней и высокой аффинностью к EGFR (ниже порога около 20 нМ), при этом более низкая аффинность не могла индуцировать выраженную активацию Vδ1+ клеток. Это позволяет предположить, что существует порог, при котором средние и высокие аффинности функционально сгруппированы вместе, о чем свидетельствует повышение уровня 41BB в данном случае. Опять же, эти эффекты невозможно повторить с использованием молекул с более низкой аффинность к EGFR, даже при дозировании в гораздо более высоких (например, в 1000-кратных) концентрациях. Интересно, однако, что увеличение уровня 41BB при насыщении для молекулы с самой высокой аффинностью (ADT1-4-2xLEE, около 1 нМ) было меньше, чем для полиспецифических молекул с средними аффинностями по данному данного изобретения, составляя около 9 нМ-19 нМ (ADT1-4-2xLEE2 и ADT1-4-2 LEE3). Это наблюдение, согласно которому наивысшая аффинность не всегда может быть наиболее предпочтительной, дополнительно обсуждается в данном документе ниже.

(J)(K) Влияние аффинности к EGFR на цитолитическую функцию полиспецифических соединений в отношении EGFR+ раковых клеток.

Следующий анализ проводили с целью изучения цитолитического эффекта, обеспечиваемого полиспецифическими антителами по данному изобретению.

Способ: Совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 4×10^3 Vδ1γδ Т-клеток к 4×10^3 целевых EGFR+ клеток на лунку в 384-луночных

планшетах CellCarrier Ultra (PerkinElmer). Конечные анализируемые концентрации антител находятся в диапазоне от 5 нМ до 0,03 пМ. После инкубации в течение 24 часов при 37°C и 5% CO2 клетки окрашивали Hoechst 33342 (Invitrogen) и окрашивали для выявления мертвых клеток (DRAQ7, Abcam) в течение 1 часа при 37°C. Клетки визуализировали с помощью системы Opera Phenix (PerkinElmer) и количество жизнеспособных клеток-мишеней определяли с использованием модели линейной регрессии (Harmony 4.9) на основе размера, морфологии, микроструктуры и интенсивности окрашивания живых клеток и отсутствия окрашивания DRAQ7.

Выводы: эти данные демонстрируют, что молекулы с более высокой аффинностью к EGFR являются наиболее активными и цитолитическими в отношении EGFR+ раковых клеток.И снова значительные качественные различия наблюдались между полиспецифическими антителами с самой низкой аффинностью к EGFR (около 140 нМ) и полиспецифическими антителами со средней и высокой аффинностью к EGFR (приблизительно от 1 нМ до 19 нМ). Действительно, молекула с низкой аффинностью к EGFR (ADT1-4-2xLEE1) не индуцировала измеримое уничтожение мишени. Таким образом, это еще один пример, когда наблюдается пороговый эффект, при котором молекулы с аффинностью от около 1 нМ до около 19 нМ (ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE3, ADT1-4-2xLEE2) оказывают кластерный, более оптимальный функциональный эффект. Эти эффекты невозможно повторить с использованием молекул с более низкой аффинность к EGFR, даже при дозировании в гораздо более высоких (например, в 10000-кратных) концентрациях. Результаты показаны на Фиг. 36J и обобщены в виде таблицы на Фиг. 36K.

(L)(M) Влияние аффинности к EGFR на пролиферацию присущих тканям Vδ1+ клеток;

Следующий анализ проводили с целью изучения индукции пролиферации Vδ1+ клеток, вызываемой полиспецифическими антителами по данному изобретению.

Способ: Совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 3×10^4 Vδ1γδ Т-клеток к 1,5×10^4 целевых EGFR+ клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Перед добавлением целевые клетки окрашивали витальным красителем CellTrace Violet [0,5 мкМ] в течение 20 минут. Конечные анализируемые концентрации полиспецифических антител находятся в диапазоне от 2 нМ до 0,25 пМ. Клетки инкубировали в течение 5 или 7 дней при 37°C, 5% CO2. Полные среды с добавлением цитокинов (IL-2, IL-15, IL-4 и IL-21; необходимое количество) добавляли на 3-й и 5-й день. Клетки промывали и окрашивали для выявления мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen) в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences). Количество событий измеряли с помощью проточной цитометрии на следующий день с использованием MACS Quant Analyser 10.

Выводы: эти исследования еще раз демонстрируют, что повышенная аффинность обеспечивает более оптимальные эффекты, при этом наблюдается прямая корреляция между повышенной индукцией пролиферации Т-клеток Vδ1 и повышенной аффинностью. И вновь наблюдается эффект кластеризации, при котором полиспецифические антитела по

изобретению со средней и высокой аффинностью к EGFR в диапазоне от около 1 нМ до около 19 нМ (ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE3, ADT1-4-2LEE2) функционально кластеризуются вместе, тогда как молекула с более низкой аффинностью около 140 нМ (ADT1-4-2xLEE1) имеет значительно сниженную функцию и в данном анализе эквивалентна несвязывающему (с TCR) контролю. Интересно, что аналогично эффекту на 41BB (см. Фиг. 36H), самый высокий уровень аффинности к EGFR, около 1 нМ, не обеспечивает наибольшего эффекта насыщения. Скорее, молекулы со средней аффинностью при около 9 нМ-19 нМ (ADT1-4-2xLEE3 и ADT1-4-2xLEE2, соответственно) обеспечивают самые высокие пролиферативные эффекты при насыщающих концентрациях антител. Этот более оптимальный эффект, обеспечиваемый полиспецифическими антителами со средней аффинностью по настоящему изобретению, обсуждается ниже. Результаты показаны на Фиг. 36L и обобщены в виде таблицы на Фиг. 36M.

(N) Аффинность к EGFR и влияние количества копий TAA раковых клеток

Эти исследования подчеркивают влияние аффинности к EGFR для полиспецифических антител по данному изобретению.

Затем эти эффекты сравнивали с эффектами, наблюдаемыми при использовании клеточной линии A431 с чрезвычайно высоким числом копий, а не клеточной линии A375 с более низким числом копий, в исследованиях совместной инкубации Vδ1+/EGFR+ раковых клеток.

Краткое изложение этого сравнения представлено на Фиг. 36N, и было обнаружено, что для злокачественных новообразований с чрезвычайно высоким числом копий EGFR, представленных A431, некоторые из сниженных эффектов, наблюдаемых при использовании полиспецифического антитела с более низкой аффинностью около 140 нМ (ADT1-4-2xLEE1), могут быть «восстановлены». Однако это восстановление все же было постепенным, и низкоаффинная молекула по-прежнему не «кластеризуется» со средне- и высокоаффинными вариантами ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE2 и ADT1-4-2xLEE3. Тем не менее, это наблюдение представляет интерес и предполагает, что варианты с более низкой аффинностью более функциональны (и, следовательно, более селективны) для раковых клеток, несущих EGFR с большим количеством копий.

Соответственно, функциональные свойства антител, когда они предоставлены в моноспецифическом формате, являются общими для полиспецифических антител по изобретению, которые дополнительно специфически связываются со вторым антигеном.

ПРИМЕР 15. Влияние аффинности на преимущественное связывание с Vδ1 клетками по сравнению с EGFR клетками

Следующий эксперимент исследует, как повышение и понижение аффинности соответствующих связывающих доменов влияет на распределение молекул и предпочтительное связывание. В частности, в этом исследовании изучалось, как изменение аффинности связывания для соответствующих мишеней Vδ1 и EGFR затем влияет на предпочтения связывания полиспецифических антител по данному изобретению.

Способ: Совместные культуры получали путем добавления 2×10^4 Vδ1 T-клеток к

2×10^4 EGFR+ целевым клеткам на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Затем добавляли «ограничивающее» количество (16 пМ) каждого полиспецифического антитела, как указано, и клетки инкубировали в течение 20 минут при 4°C. Клетки инкубировали еще 20 минут со вторичными антителами к IgG человека (Jackson Immunoresearch) и витальным красителем (eFluor 780, Invitrogen) перед промыванием и фиксацией (BD Cell fix). Количество антител, связанных с каждым типом клеток, определяли с помощью проточной цитометрии (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotech).

Выводы: на Фиг. 37(A) показано влияние аффинности на предпочтительное связывание с Vδ1 клетками по сравнению с EGFR клетками в виде гистограммы. Относительное распределение между двумя типами клеток показано для каждого антитела, как следует из приведенных данных. Эти данные демонстрируют, что модификация аффинности к Vδ1 оказывает лишь незначительное влияние на соотношения связывания и профили распределения. Напротив, по-видимому, наблюдается более глубокий эффект при изменении аффинности к EGFR-связывающему домену. В частности, полиспецифические антитела с более низкой аффинности к EGFR проявляют значительное предпочтение к связыванию Vδ1, при этом ADT1-4-2xLEE1 с наименьшим связыванием EGFR (Kd, 140 нМ) демонстрирует наибольшее предпочтение к Vδ1 клеткам. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что, повышая и понижая аффинность соответствующих связывающих доменов, можно потенциально выбирать и задавать различные профили распределения клеток-мишеней/тканей. Более того, когда эти результаты объединены с другими, представленными в данном документе, это позволяет предположить, что, хотя антитела со средней аффинностью к EGFR по данному изобретению (от около 9 нМ до около 19 нМ) проявляют сходные эффекты различными способами с вариантами с более высокой аффинностью (с аффинностью около 1 нМ к EGFR) такие полиспецифические антитела со средней аффинностью по данному изобретению действительно различаются по другим характеристикам и могут обеспечивать более благоприятный опухоль-опосредованный клиренс, распределение и профиль блокирования EGF в определенных условиях. Это, в свою очередь, может обеспечить больший потенциал для дальнейшего снижения дозолимитирующей кожной токсичности по сравнению с вариантами EGFR с более высокой аффинностью по настоящему изобретению. На Фиг. 37B представлены результаты из фигуры (A) в виде таблицы, а на Фиг. 37C представлены результаты части (A/B) в виде соотношения.

ПРИМЕР 16: Аффинность к EGFR; влияние на интернализацию полиспецифических антител опухолевыми клетками A431

(A)(B) Этот анализ проводили с целью изучения интернализация определенных полиспецифических антител (и препаратов сравнения).Как описано ранее, была создана серия полиспецифических антител, в которых

аффинность к EGFR изменялась в сторону увеличения/уменьшения с диапазоном вариантов аффинности связывания от около 1 нМ до около 140 нМ к EGFR, в то время как

(ii) аффинность к Vδ1 сохранялась на постоянном уровне около 0,2 нМ.

В это исследование также включен, если это указано, моноспецифический препарат сравнения IgG к RSV (содержащий домены связывания с белком RSV), полиспецифический контроль D1.3xFS1-67 (содержащий второй EGFR-связывающий домен с аффинностью 1 нМ и первый связывающий домен, содержащий домен связывания с куриным лизоцимом).

Способы: культуры получали путем добавления с 4×10^3 EGFR+ опухолевых клеток A431 на лунку в 384-луночных планшетах CellCarrier Ultra (PerkinElmer). Антитела были ковалентно помечены флуорофорами Cy5 с использованием набора для конъюгации антител Lightning Link (Abcam) в соответствии с инструкциями производителя. Перед добавлением антитела клетки визуализировали в системе Opera Phenix (PerkinElmer) с использованием набора фильтров Cy5. Затем добавляли меченые антитела в конечных концентрациях 1 нМ и клетки визуализировали с помощью Opera Phenix в течение еще 8,5 часов с интервалами в 15 минут. Интенсивность Cy5 во внутриклеточных областях определяли с помощью анализа Harmony 4.9.

Выводы: эти данные демонстрируют, что полиспецифические молекулы с более низкой аффинностью к EGFR демонстрируют наименьшую опосредованную EGFR интернализацию целевыми опухолевыми клетками A431. Значительные качественные различия наблюдали между полиспецифическими антителами с самой низкой аффинностью к EGFR (около 140 нМ; что эквивалентно отсутствию контрольного антитела) и полиспецифическими антителами с высокой аффинностью к EGFR (около 1 нМ). В частности, была обнаружена положительная корреляция между аффинностью к мишени EGFR и наблюдаемым уровнем интернализации антитела. Это представляет собой пример градуированного эффекта, связанного с аффинностью молекул по данному изобретению к EGFR в диапазоне от около 1 нМ до около 140 нМ к EGFR. Результаты показаны на Фиг. 38A и обобщены в таблице на Фиг. 38B.

(C)(D) Этот анализ проводили с целью изучения клиренса полиспецифических антител, описанных в данном изобретении. Клиренс в данном случае относится к удалению антитела из культуральной среды культур клеток A431 путем опосредованной EGFR интернализации антитела.

Способы: культуры получали путем добавления 2×10^4 EGFR+ опухолевых клеток A431 на лунку в 96-луночных плоскодонных планшетах, обработанных для культуры ткани. Конечные анализируемые концентрации антител находятся в диапазоне от 5 нМ до 1,6 пМ.После инкубации в течение 24 часов при 37°C и 5% CO2 супернатанты собирали и хранили для дальнейшего анализа. Концентрации полиспецифических антител определяли с помощью самостоятельно разработанного протокола ELISA. Вкратце, ELISA проводили с использованием 1 мкг антигена Vδ1, непосредственно нанесенного на планшет, с последующим блокированием блокирующим буфером. Собранные супернатанты добавляли в планшет, промывали и использовали конъюгированное с HRP антитело к Fc человека в качестве вторичного антитела в разведении 1/2000. Разработка проводилась с использованием 50 мкл раствора TMB, а оптическую плотность измеряли при 450 нМ с использованием микропланшетного ридера (Tecan).

Выводы: эти данные демонстрируют, что полиспецифические молекулы с более низкой аффинностью к EGFR демонстрируют наименьший EGFR-опосредованный клиренс антитела. Значительные различия наблюдали между полиспецифическими антителами с самой низкой аффинностью к EGFR (около 140 нМ; что эквивалентно отсутствию контрольного антитела) и полиспецифическими антителами с высокой аффинностью к EGFR (около 1 нМ).Кроме того, это демонстрирует положительную корреляцию между аффинностью к мишени EGFR и наблюдаемым уровнем клиренса антител. Эти результаты еще раз подчеркивают прямую градуированную корреляцию между аффинностью полиспецифического антитела к EGFR и опосредованной EGFR интернализацией для молекул с аффинностью в диапазоне от около 1 нМ до около 140 нМ к мишени EGFR. Результаты показаны на Фиг. 38C и обобщены в таблице на Фиг. 38D

ПРИМЕР 17: Влияние аффинности EGFR на ингибирование полиспецифическими антителами связывания лиганда EGF и пролиферацию опухолевых клеток

(A)(B) Этот анализ проводили с целью изучения ингибирования (или блокады) связывания EGF с EGFR-положительными опухолевыми клетками полиспецифическими антителами (и препаратами сравнения), описанными в данном изобретении.В это исследование также включен, если это указано, моноспецифический препарат сравнения IgG к RSV (содержащий домены связывания с белком RSV).

Способы: блокаду EGF, опосредованную полиспецифическими антителами к EGFRxVδ1, определяли путем инкубации 3×10^4 EGFR+ целевых клеток A431 с антителами, которые были серийно разведены в PBS до диапазона концентраций от 250 нМ до 3,2 пМ в течение 30 минут при 4 градусах. Клетки промывали и в каждую лунку добавляли конечную концентрацию 40 мкг/мл EGF (EGF-AF647, Life Tech). Затем клетки инкубировали в течение 1 часа при 4 C, промывали и окрашивали витальным красителем (eFluor 520, Fisher) и инкубировали еще 20 минут при 4 градусах. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences) перед инкубацией в течение ночи при 4°C в темноте. Блокаду EGF измеряли с помощью проточной цитометрии на следующий день с использованием MACS Quant Analyser 10.

Выводы: снижение MFI, продемонстрированное на Фиг. 39A и 39B, свидетельствует об усилении блокады связывания EGF с EGFR-положительными клетками A431.Для описанных полиспецифических антител существует прямая корреляция между аффинностью к мишени EGFR и наблюдаемым уровнем блокады EGF. Это представляет собой еще один пример градуированного эффекта, оказываемого молекулами с аффинностью к EGFR в диапазоне от около 1 нМ до около 140 нМ.

(C)(D) Следующий анализ проводили с целью изучения ингибирования пролиферации опухолевых клеток, вызываемой полиспецифическими антителами по данному изобретению.

Способ: вкратце, EGFR+ клетки A431 высевали в 384-луночные планшеты для визуализации (Perkin Elmer) с конечной плотностью посева 2×10^3 целевых клеток на лунку, а затем инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO2. Антитела разбавляли в

основной питательной среде и серийно разводили 1:5 перед добавлением в планшеты для анализа, чтобы получить конечные анализируемые концентрации от 500 нМ до 0,05 пМ. Клетки культивировали в течение 24 часов перед окрашиванием Hoechst (конечная 1:1000, Invitrogen) и DRAQ7 (конечная 1:300, Abcam). Чтобы определить количество живых целевых клеток, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Количество живых клеток определяли количественно на основе размера, морфологии, микроструктуры и интенсивности окрашивания живых клеток и отсутствия окрашивания DRAQ7.

Выводы: данные, представленные на Фиг. 39C и 39D, демонстрируют, что полиспецифические антитела по данному изобретению с более высокой аффинностью к EGFR наиболее эффективно ингибируют пролиферацию EGFR-положительных опухолевых клеток.Опять же, это демонстрирует четкую положительную корреляцию между аффинностью к мишени EGFR и наблюдаемым уровнем ингибирования пролиферации опухоли. Таким образом, это еще один пример, который подчеркивает градуированные эффекты, коррелирующие с аффинностью к мишени EGFR (в диапазоне от около 1 нМ до около 140 нМ).

ПРИМЕР 18. Сохранение EGFR+ здоровых клеток - полиспецифические антитела к VD1xEGFR

Способы: влияние биспецифических антител к EGFR-Vδ1 на цитотоксичность для EGFR+ целевых клеток определяли с помощью конфокальной визуализации с одновременным многопараметрическим анализом в Opera Phenix (Perkin Elmer). Вкратце, EGFR+ клетки A375 (меланома) и HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека) высевали в 384-луночные планшеты для визуализации (Perkin Elmer) для получения конечной плотности посева 5000 целевых клеток на лунку перед инкубацией в течение ночи при 37°C, 5% CO2. Антитела разбавляли в основной питательной среде и серийно разводили 1:5 перед добавлением в планшеты для анализа, чтобы получить конечные анализируемые концентрации от 1 нМ до 0,0005 пМ. Размноженные Vδ1 γδ Т-клетки, полученные из кожи, отделяли от колб для тканевой культуры и повторно суспендировали в основной ростовой среде перед добавлением в планшет для анализа в количестве 5000 клеток на лунку при соотношении эффектор:мишень 1:1. Клетки совместно культивировали в течение 24 часов перед окрашиванием Hoechst 33342 (конечная 1:1000, Invitrogen) и DRAQ7 (конечная 1:300, Abcam). Чтобы определить количество живых целевых клеток, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Количество живых клеток определяли количественно на основе размера, морфологии, микроструктуры и интенсивности окрашивания живых клеток и отсутствия окрашивания DRAQ7. Результаты показаны на Фиг. 40 A-C.

Результаты подбора дозы представлены на Фиг. 40A. Эти данные помогают

подчеркнуть врожденную способность Vδ1 Т-клеток различать здоровые и злокачественные клетки. Полиспецифическое антитело по данному изобретению перенаправляет Vδ1 Т-клетки на уничтожение EGFR+ опухолевых клеток, в то же время «щадя» здоровые клетки, которые экспрессируют сопоставимое количество копий EGFR. Результаты в табличной форме (A) представлены на Фиг. 40C.

Репрезентативные полученные с помощью микроскопа изображения из эксперимента, описанного в (A), демонстрирующие индуцированную Т-клетками цитотоксичность в отношении опухолевых клеток A375, наряду с «сохранением» здоровых клеток HUVEC, представлены на Фиг. 40B. Изображения показаны в оттенках серого, ядра клеток окрашены Hoechst 33342.

ПРИМЕР 19. Полиспецифические антитела к VD1xEGFR: сравнение зависимостей доза-ответ для ADT1-4-2xFS1-67 и «исходного» ADT1-4xFS1-67 с более низкой аффинностью (условное название G04 FS1-67).

Изобретатели ранее продемонстрировали, что «исходное» (с несозревшей аффинностью) полиспецифическое антитело G04 FS1-67 придает ряд желаемых технических эффектов в совместных культурах, содержащих Vδ1+ клетки и целевые клетки A431 (WO2021032963).

В частности, изобретатели обнаружили, что это полиспецифическое антитело может повышать цитотоксичность по отношению к клеткам A431 более чем на 200%.В этой серии экспериментов G04 FS1-67 (SEQ ID NO: 379), которое содержит «исходный» первый Vδ1-связывающий домен с более низкой аффинностью (около 126 нМ) и высокой аффинностью (около 1 нМ) связывания с EGFR, сравнивался с эквивалентным полиспецифическим антителом, но содержащим вариант первого Vδ1-связывающего домена ADT1-4-2 с созревшей аффинностью (аффинность около 0,2 нМ) (SEQ ID NO: 414).

Способ: в этом анализе эффекторные Vδ1+ клетки совместно инкубируются с раковыми EGFR+ клетками, как указано, при этом измеряют индукцию интернализации Vδ1 TCR после взаимодействия с полиспецифическими антителами. Совместные культуры получали путем добавления 2,5×10^4 Vδ1 γδ Т-клеток к 2,5×10^4 EGFR+ целевых клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Перед добавлением Vδ1 γδ Т-клетки окрашивали витальным красителем CellTrace Violet [0,5 мкМ] в течение 20 минут.Конечные анализируемые концентрации антител находились в диапазоне от 10 нМ до 0,13 пМ. После инкубации в течение 4 часов при 37°C и 5% CO2 клетки собирали и окрашивали для выявления мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen) и на поверхностную экспрессию Vδ1 TCR (MilteNYBiotec) в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD sciences) перед анализом на проточном цитометре MACSQuant Analyser 10 (MilteNY).

Выводы: результаты этого сравнения теперь представлены на Фиг. 41A (и в табличной форме на Фиг. 41B) и согласуются с открытиями, описанными в других местах данного документа.Представлено снижение MFI (и, следовательно, снижение уровня TCR), и это сравнительное исследование дополнительно подтверждает, что (i)

полиспецифическое антитело с неестественно более высокой аффинностью к Vδ1 по данному изобретению оказывает улучшенные эффекты по сравнению с вариантами с более низкой аффинностью (в данном случае G04 FS1-67) и (ii) эти усиленные эффекты особенно заметны в исследованиях с целевыми раковыми мишенями с меньшим числом копий TAA, такими как A375.Эти данные также подчеркивают, что для молекул с более низкой аффинностью к vd1 (в данном случае препарат сравнения G04 FS1-67) в совместных культурах Vδ1/A375 не удается достичь эквивалентного эффекта снижения уровня TCR даже при добавлении в 100 раз большего количества этой молекулы.

ПРИМЕР 20. Полиспецифические антитела к VD1xEGFR: сравнение с полиспецифическим антителом к CD3xEGFR

Было создано полиспецифическое антитело - препарат сравнения, в котором аффинность к EGFR сохранялась на постоянном уровне около 0,2 нМ и вариабельный домен, нацеленный на Vδ1, был заменен вариабельным доменом, специфичным для CD3ε (полученным из OKT3).

Эту молекулу (названную CD3/ADT3-2) затем сравнивали с полиспецифической молекулой ADT1-4-2/ADT3-2 Vδ1xEGFR (условное название ADT1-4-2xLEE), описанной ранее в данном документе. Одной из причин для этого сравнения было сравнение различий в активации Т-клеток, обеспечиваемых полиспецифическими TCE (рекрутерами-активаторами Т-клеток), которые нацелены на Vδ1 TCR, с теми, которые взаимодействуют через корецептор CD3ε.При этом изобретатели обнаружили, что полиспецифические TCE, которые взаимодействуют с Т-клетками через Vδ1 TCR, обладают отличительными эффектами по сравнению с полиспецифическими TCE, которые взаимодействуют с Т-клетками через CD3ε.Эти эффекты представлены в следующей серии экспериментов. В эти исследования также включен полиспецифический контроль D1.3xFS1-67 (содержащий второй EGFR-связывающий домен с аффинностью 1 нМ и первый связывающий домен, включающий связывающий домен с куриным лизоцимом).

(A)(B) ДИФФЕРЕНЦИРОВКА, ВЫЗВАННАЯ ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИМ АНТИТЕЛОМ К CD3XEGFR; ВЛИЯНИЕ ЦЕЛЕВОГО Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА НА СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ VΔ1 TCR И CD3E.Следующий эксперимент определяет, как воздействие на различные Т-клеточные рецепторы (Vδ1 или CD3ε) влияет на индукцию интернализации Vδ1 TCR после взаимодействия с полиспецифическими антителами.

Способ: анализ различных популяций Т-клеток проводили в соответствии с объяснениями, приведенными на Фиг. 42A. К ним относятся PBMC и очищенные Vδ1 γδ Т-клетки, выделенные либо из ткани кожи, либо непосредственно из периферической крови. Совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 2×10^4 Т-клеток к 2×10^4 EGFR+ опухолевых клеток A375 на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном.Затем добавляли антитела в конечных концентрациях 1 нМ и культуры инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO2. Клетки собирали и окрашивали для выявления мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen), и на поверхностную экспрессию Vδ1 TCR (MilteNY), CD3ε (MilteNY) в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для

FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences) перед анализом на проточном цитометре MACSQuant Analyser 10 (MilteNY).

Выводы: Снижение MFI представлено на Фиг. 42A. Примечательно, что мы наблюдали более мощное снижение уровня TCR при участии антител в комплексе TCR через Vδ1, чем через CD3ε, что было продемонстрировано на популяциях Т-клеток с Vδ1, полученных как из кожи, так и из периферической крови.И наоборот, взаимодействие с Т-клетками через CD3ε индуцировало более мощное снижение уровня CD3 в PBMC, которые содержат лишь незначительную популяцию Vδ1 клеток (0,08% в этих донорских клетках). Заметный эффект TCE на основе CD3 в PBMC подчеркивает неэффективность этой традиционной стратегии. В частности, TCE на основе CD3 будут влиять на все CD3+ клетки, присутствующие в PBMC, включая регуляторные Т-клетки, CD4+ и CD8+ Т-клетки. Напротив, полиспецифические антитела по данному изобретению, которые взаимодействуют с Т-клетками через первый Vδ1-связывающий домен, селективно действуют только на крайне привлекательную субпопуляцию Vδ1+CD3 клеток, как правило, более распространенную в тканях, чем в крови.

(B) Влияние целевого Т-клеточного рецептора на снижение уровня Vδ1 TCR. Результаты в виде таблицы (A) представлены на Фиг. 42B, подчеркивая превосходную индукцию снижения уровня TCR путем непосредственного нацеливания на Vδ1 TCR с помощью полиспецифического комплекса по сравнению с нацеливанием на этот комплекс через корецептор CD3ε.

(C) Влияние целевого Т-клеточного рецептора на снижение уровня CD3E. Результаты в табличной форме (A) представлены на Фиг. 42C, подчеркивая более выраженное влияние TCE на основе CD3 на уровни CD3; особенно в нефракционированных PBMC.

(D)(E) Влияние на цитолитическую функцию полиспецифических антител в отношении EGFR+ раковых клеток. В следующем эксперименте определяли, как взаимодействие с различными Т-клеточными рецепторами (Vδ1 или CD3ε) влияет на стимуляцию популяций Т-клеток к лизису опухолевых клеток-мишеней.

Способ: как и ранее, оценивали ряд популяций Т-клеток, включая PBMC или очищенные γδ Т-клетки, выделенные из ткани кожи или непосредственно из периферической крови. Культуры получали путем посева 4×10^3 EGFR+ опухолевых клеток A375 на лунку в 384-луночные планшеты CellCarrier Ultra (PerkinElmer). Для изменения соотношения эффектор-мишень в диапазоне от 10 до 0,08 добавляли различное количество Т-клеток. Затем добавляли антитела в конечных концентрациях 1 нМ и культуры инкубировали в течение 24 часов при 37°C, 5% CO2.Клетки окрашивали Hoechst 33342 (Invitrogen) и окрашивали для выявления мертвых клеток (DRAQ7, Abcam) в течение 1 часа при 37°C и визуализировали в системе Opera Phenix (PerkinElmer). Количество жизнеспособных опухолевых клеток определяли с использованием модели линейной регрессии (Harmony 4.9), основанной на размере, морфологии, микроструктуре и интенсивности окрашивания живых клеток и отсутствия окрашивания DRAQ7.

Выводы: данные, представленные на Фиг. 42D, демонстрируют уникальную способность нацеленного на Vδ1 полиспецифического антитела специфически и исключительно перенаправлять популяцию Vδ1 Т-клеток на уничтожение EGFR+ опухолевых клеток. Это контрастирует с TCE на основе CD3, которые функционируют менее избирательно, о чем свидетельствует наблюдение, согласно которому такие TCE также перенаправляют нефракционированные PBMC к EGFR+ клеткам. Результаты в табличной форме (D) представлены на Фиг. 42E. Это еще раз подчеркивает превосходную специфичность TCE на основе Vδ1 по сравнению с TCE на основе CD3.

(F) Влияние на индуцированную секрецию цитокинов активированными Т-клетками.В следующем эксперименте определяли, как воздействие на различные Т-клеточные рецепторы (Vδ1 или CD3ε) или целевые популяции влияет на профиль секреции цитокинов активированными Т-клетками.

Способ: был проанализирован ряд популяций Т-клеток, включая PBMC или очищенные γδ Т-клетки, полученные непосредственно из периферической крови двух здоровых доноров. Совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 2×10^4 Т-клеток к 2×10^4 EGFR+ опухолевых клеток A375 на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Затем добавляли антитела в конечных концентрациях 1 нМ и культуры инкубировали в течение 48 часов при 37°C, 5% CO2. Супернатанты собирали, клетки удаляли, а концентрации цитокинов определяли с использованием набора гранул с антителами к цитокинам LEGENDplex (BioLegend, штат Калифорния, США).

Выводы: данные, представленные на Фиг. 42F и 42G, демонстрируют значительные количественные и качественные различия между специфической активацией Vδ1+ Т-клеток и более широкой активацией всех CD3+ Т-клеток в нефракционированных PBMC. Ярким отличием является 248-кратное увеличение уровня IL-17A, индуцируемое только TCE на основе CD3 в TCE. Напротив, γδ Т-клетки, стимулированные TCE на основе CD3 или Vδ1, не продуцируют IL-17A. IL17A является цитокином, который может усиливать рост опухоли и ослаблять противораковый иммунный ответ. Это подчеркивает уникальный профиль секреции цитокинов субпопуляцией Vδ1+ Т-клеток. Кроме того, во всех популяциях Т-клеток TCE на основе CD3 индуцировал значительно более высокие уровни многих цитокинов, особенно TNFa.Опять же, это подчеркивает менее специализированные, более «кувалдные» эффекты, оказываемые TCE на основе CD3, включающие более общие эффекты индукции на CD3+ клетки.

(H) Влияние на пролиферацию присущих тканям Vδ1+ клеток. Следующий анализ проводили с целью изучения индукции пролиферации Vδ1+ клеток, вызываемой полиспецифическими антителами по данному изобретению.

Способ: Совместные культуры получали, как указано выше, путем добавления 3×10^4 Vδ1γδ Т-клеток к 1,5×10^4 целевых EGFR+ клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Перед добавлением целевые клетки окрашивали витальным красителем CellTrace Violet [0,5 мкМ] в течение 20 минут. Конечные анализируемые концентрации полиспецифических антител находятся в диапазоне от 2 нМ до 0,25 пМ.

Клетки инкубировали в течение 5 или 7 дней при 37°C, 5% CO2. Полные среды с добавлением цитокинов (IL-2, IL-15, IL-4 и IL-21; необходимое количество) добавляли на 3-й и 5-й день. Клетки промывали и окрашивали для выявления мертвых клеток (eFlour 780, Invitrogen) в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD Sciences). Количество событий измеряли с помощью проточной цитометрии на следующий день с использованием MACS Quant Analyser 10.

Выводы: данное исследование продемонстрировало, что TCE на основе Vδ1 значительно лучше индуцирует пролиферацию Vδ1 Т-клеток по сравнению с аналогичным TCE на основе CD3, причем биспецифическое соединение к Vδ1 индуцирует пролиферацию в 10 раз меньших дозах, а также проявляет более выраженный эффект при насыщающих концентрациях. См. Фиг. 42H и I, на которых показано усиление пролиферативного эффекта при опосредованной антителами стимуляции Vδ1 Т-клеток по сравнению со стимуляцией через CD3ε.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение включает по меньшей мере следующие пронумерованные варианты осуществления:

1. Полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); а область Fc содержит EGFR-связывающий сайт.

2. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 1, отличающееся тем, что EGFR-связывающий сайт представлен доменом CH3, в котором

остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP (SEQ ID NO: 523), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512);

остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP (SEQ ID NO: 523), а остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512);

остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP (SEQ ID NO: 523), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), а остатки с 413 по 415 (нумерация EU) включают SYW (SEQ ID NO: 533);

остатки с 358 по 361, 361,1 и 362 (нумерация EU) включают LDEGGP (SEQ ID NO: 542), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWVK (SEQ ID NO: 543);

остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512);

остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TDDGP (SEQ ID NO: 560), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512); или

остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TESGP (SEQ ID NO: 553), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают KFG (SEQ ID NO: 554), остатки с 413 по 421

(нумерация EU) включают SNLRWTKGH (SEQ ID NO: 555), а остаток 378 представляет собой валин.

3. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что:

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514) и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515);

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую SNGQPENNY (SEQ ID NO: 525) и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515);

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514) и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWQQGNV (SEQ ID NO: 534);

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELDEGGP (SEQ ID NO: 544), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514), и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWVKGNV (SEQ ID NO: 545);

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELTKNQ (SEQ ID NO: 513), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514) и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515);

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDETDDGP (SEQ ID NO: 561), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514), остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515); или

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDETESGP (SEQ ID NO: 556), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую SKFGPENNY (SEQ ID NO: 557), остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SNLRWTKGHV (SEQ ID NO: 558).

4. Полипецифическое антитело по варианту осуществления 1, отличающееся тем, что домен CH3 представляет собой домен CH3 IgG человека, сконструированный таким образом, чтобы он содержал EGFR-связывающий сайт.

5. Антитело по варианту осуществления 2, отличающееся тем, что область Fc представляет собой область Fc IgG человека, содержащую домен CH3, сконструированный так, чтобы он содержал EGFR-связывающий сайт.

6. Антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что аминокислотная последовательность домена CH3 имеет по меньшей мере 90%

идентичности, или по меньшей мере 95% идентичности, или 100% идентичности с:

SEQ ID NO: 562;

SEQ ID NO: 522;

SEQ ID NO: 532;

SEQ ID NO: 541;

SEQ ID NO: 510;

SEQ ID NO: 559; или

SEQ ID NO: 552.

7. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что антитело имеет функциональную Fc.

8. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что константный домен тяжелой цепи содержит:

SEQ ID NO: 391 или SEQ ID NO: 392;

SEQ ID NO: 520 или SEQ ID NO: 521;

SEQ ID NO: 530 или SEQ ID NO: 531;

SEQ ID NO: 539 или SEQ ID NO: 540;

SEQ ID NO: 508 или SEQ ID NO: 509;

SEQ ID NO: 385 или SEQ ID NO: 386; или

SEQ ID NO: 550 или SEQ ID NO: 551.

9. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, содержащее:

SEQ ID NO: 389; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 432;

SEQ ID NO: 400; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 436;

SEQ ID NO: 516; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 518;

SEQ ID NO: 517; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 519;

SEQ ID NO: 526; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 528;

SEQ ID NO: 527; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 529;

SEQ ID NO: 535; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 537;

SEQ ID NO: 536; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 538;

SEQ ID NO: 504; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 506;

SEQ ID NO: 505; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 507;

SEQ ID NO: 388; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 431;

SEQ ID NO: 399; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 435;

SEQ ID NO: 546; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 548;

SEQ ID NO: 547; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 549;

SEQ ID NO: 378; или SEQ ID NO: 425 и SEQ ID NO: 426;

SEQ ID NO: 379; или SEQ ID NO: 421 и SEQ ID NO: 437;

SEQ ID NO: 380; или SEQ ID NO: 423 и SEQ ID NO: 427;

10. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что его область Fc связывается с EGFR человека со

аффинностью связывания (K_D, например, по данным поверхностного плазмонного резонанса) менее около 150 нМ.

11. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что его область Fc связывается с EGFR человека со аффинностью связывания (K_D, например, по данным поверхностного плазмонного резонанса) менее около 20 нМ.

12. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что его область Fc связывается с EGFR человека со аффинностью связывания (K_D, например, по данным поверхностного плазмонного резонанса) менее около 10 нМ.

13. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что его область Fc связывается с EGFR человека со аффинностью связывания (K_D, например, по данным поверхностного плазмонного резонанса) менее около 5 нМ.

14. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что его область Fc связывается с EGFR человека со аффинностью связывания (K_D, например, по данным поверхностного плазмонного резонанса) менее около 3 нМ.

15. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55-78 и 133-143; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82-105 и 147-157.

16. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 15, отличающееся тем, что область Fab содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей

мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 51, 52 и 130;

VHCDR2, содержащую или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 53 и 131; и

VHCDR3, содержащую или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 55-78 и 133-143; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую:

VLCDR1, содержащую или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 79 и 144;

VLCDR2, содержащую или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 80 и 145; и

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 82-105 и 147-157.

17. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 15 или 16, отличающееся тем, что область Fab содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей

мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-25 и 107-117; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-50 и 119-129.

18. Полиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления 1-10, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 55-78; и/или

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 82-105.

19. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 55-78; и/или

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 82-105

20. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52;

VHCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 53;

VLCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 79; и/или

VLCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 80.

21. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52;

VHCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53;

VLCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79; и/или

VLCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80.

22. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 55, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 82, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 56, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 83, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 57, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 84, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 58, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 85, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 59, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 86, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 60, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 87, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 52, 53 и 61, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 88, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 62, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 89, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 63, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 90, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 64, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 91, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 65, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 92, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 52, 53 и 66, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 93, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 67, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 94, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 68, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 95, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 69, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 96, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 70, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 97, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 71, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 98, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 72, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 99, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 73, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 100, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 52, 53 и 74, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 101, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 75, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 102, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 76, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 103, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 77, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 104, соответственно; или

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 51, 53 и 78, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79, 80 и 105, соответственно.

23. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 2-25; и/или

VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 27-50.

24. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 2-25; и/или

VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 27-50.

25. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и VL,

содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 27;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 28;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 29;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 30;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 31;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 33;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 34;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 35;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 36;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, и VL,

содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 37;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 38;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 39;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 40;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 41;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 42;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 44;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 45;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 46;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и VL,

содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 47;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 48;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 49; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 25, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 50;

26. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID

NO: 23, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50.

27. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит аминокислотный остаток, отличный от серина, в положении 74 согласно системе нумерации IMGT.

28. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 27, отличающееся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, метионина, лейцина и изолейцина.

29. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 27, отличающееся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аргинина, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

30. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 27, отличающееся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, валина, метионина, лейцина и изолейцина.

31. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 27, отличающееся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT представляет собой остаток лейцина.

32. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab выбрана из группы, состоящей из ADT1-4-105, ADT1-4-107, ADT1-4-110, ADT1-4-112, ADT1-4-117, ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-139, ADT1-4-4, ADT1-4-143, ADT1-4-53, ADT1-4-173, ADT1-4-2, ADT1-4-8, ADT1-4-82, ADT1-4-83, ADT1-4-3, ADT1-4-84, ADT1-4-86, ADT1-4-95, ADT1-4-1, ADT1-4-6 и ADT1-4-138.

33. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 32, отличающееся тем, что область Fab содержит от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 2 аминокислотных замен во всех 6 областях CDR.

34. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 32 или 33, отличающееся тем, что область Fab содержит до 2 или до 1 аминокислотной замены во всех 6 областях CDR.

35. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 32-34,

отличающееся тем, что область Fab содержит 1 или 2 аминокислотные замены во всех 6 областях CDR.

36. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 32-35, отличающееся тем, что область Fab содержит от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 2 аминокислотных замен в одной или более каркасных областях.

37. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 32-36, отличающееся тем, что область Fab содержит до 2 или до 1 аминокислотной замены в одной или более каркасных областях.

38. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 36-37, отличающееся тем, что область Fab содержит 1 или 2 аминокислотные замены в одной или более каркасных областях.

39. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 32-39, отличающиеся тем, что аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

40. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит:

последовательность HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности $GDSVSSKSX_1A$;

последовательность HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 53

последовательность HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $X_2WX_3X_4X_5X_6DX_7$, где последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 54;

последовательность LCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 79;

последовательность LCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 80; и

последовательность LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $QQX_8YX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}T$, где последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 81;

где каждый из X_1-X_{13} представляет собой природную аминокислоту.

41. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 40, отличающееся тем, что:

X_1 выбран из группы, состоящей из A и V;

X_2 выбран из группы, состоящей из S и T;

X_3 выбран из группы, состоящей из V, A и L;

X_4 выбран из группы, состоящей из G, E, и D;

X_5 выбран из группы, состоящей из Y и N;

X_6 выбран из группы, состоящей из V, A и P;

X_7 выбран из группы, состоящей из V, Y и R;

X_8 выбран из группы, состоящей из K, R и G;

X_9 выбран из группы, состоящей из S и K;

X_{10} выбран из группы, состоящей из T, Q, A, E и D;

X_{11} выбран из группы, состоящей из P, H и D;

X_{12} выбран из группы, состоящей из Q, R, K, W, P, E и I; и

X_{13} выбран из группы, состоящей из I, V и L.

42. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 40 или варианту осуществления 41, отличающееся тем, что область Fab дополнительно содержит:

последовательность HFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 170 или 171;

последовательность HFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 172;

последовательность HFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 173;

последовательность HFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 174;

последовательность LFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 175;

последовательность LFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 176;

последовательность LFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 177 или 178; и

последовательность LFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 179, 180, 181 или 182.

43. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что его область Fab:

связывается с TRDV1 человека (SEQ ID NO: 272 или 306) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

необязательно связывается с TRDV1 яванского макака (SEQ ID NO 308) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ(предпочтительно менее около 50 нМ); и/или

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ).

.

44. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что его область Fab:

связывается с TRDV1 человека с KD менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

связывается с TRDV1 яванского макака с KD менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ); и/или

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее

около 10 нМ) и IC90 для снижения уровня TCR менее около 100 нМ (менее около 50 нМ).

45. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что:

область Fab связывается с TRDV1 человека (SEQ ID NO: 272 или 306) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ(предпочтительно менее около 50 нМ);

необязательно область Fab связывается с TRDV1 яванского макака (SEQ ID NO 308) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

и/или

его область Fc связывается с EGFR человека с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса) менее около 150 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ)

46. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что полиспецифические антитела специфически связываются с TRDV1 человека с K_D менее около 5 нМ и специфически связываются с EGFR человека с K_D менее около 150 нМ, менее около 20 нМ, менее около 10 нМ или менее около 5 нМ.

47. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что полиспецифические антитела специфически связываются с TRDV1 человека с K_D менее около 5 нМ и специфически связываются с EGFR человека с K_D менее около 5 нМ.

48. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 40, отличающееся тем, что:

X_1 выбран из группы, состоящей из A и V;

X_2 выбран из группы, состоящей из S и T;

X_3 выбран из группы, состоящей из V, A и L;

X_4 выбран из группы, состоящей из G, E, и D;

X_5 выбран из группы, состоящей из Y и N;

X_6 выбран из группы, состоящей из V, A и P;

X_7 выбран из группы, состоящей из V, Y и R;

X_8 выбран из группы, состоящей из K, R и G;

X_9 выбран из группы, состоящей из S и K;

X_{10} выбран из группы, состоящей из T, Q, A, E и D;

X_{11} выбран из группы, состоящей из P и H;

X_{12} выбран из группы, состоящей из Q, R, K, W, P, E и I; и

X_{13} выбран из группы, состоящей из I, V и L.

49. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 48, отличающееся тем, что область Fab дополнительно содержит:

последовательность HFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ

ID NO: 170 или 171;

последовательность HFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 172;

последовательность HFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 173;

последовательность HFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 174;

последовательность LFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 175;

последовательность LFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 176;

последовательность LFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 177; и

последовательность LFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 179, 180, 181 или 182.

50. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что его область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ);

связывается с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

51. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 40, отличающееся тем, что:

X_1 выбран из группы, состоящей из A и V;

X_2 выбран из группы, состоящей из S и T;

X_3 выбран из группы, состоящей из V, A и L;

X_4 выбран из группы, состоящей из G и D;

X_5 выбран из группы, состоящей из Y и N;

X_6 выбран из группы, состоящей из V, A и P;

X_7 выбран из группы, состоящей из V, Y и R;

X_8 выбран из группы, состоящей из K и R;

X_9 выбран из группы, состоящей из S и K;

X_{10} выбран из группы, состоящей из T, Q, A и E;

X_{11} выбран из группы, состоящей из P и H;

X_{12} выбран из группы, состоящей из Q, K, W, P и I; и

X_{13} выбран из группы, состоящей из V и L.

52. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 51, отличающееся тем, что область Fab дополнительно содержит:

последовательность HFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 170 или 171;

последовательность HFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 172;

последовательность HFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 173;

последовательность HFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 174;

последовательность LFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 175;

последовательность LFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 176;

последовательность LFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 177; и

последовательность LFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 179 или 181.

53. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что его область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ);

связывается с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 50 нМ;

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

54. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 37-53 и/или 59-77 SEQ ID NO: 272.

55. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что эпитоп, связанный его областью Fab, содержит аминокислотные остатки 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 272.

56. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, состоит из аминокислотных остатков 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 272.

57. Полиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления 1-10, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 133-143; и/или

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:

147-157.

58. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 57, область Fab содержит:

VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 133-143; и/или

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 147-157.

59. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-58, отличающееся тем, что область Fab дополнительно содержит:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 130;

VHCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 131;

VLCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 144; и/или

VLCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 145.

60. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab дополнительно содержит:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130;

VHCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 131;

VLCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 144; и/или

VLCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145.

61. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-60, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 133, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, 145 и 147, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 134, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, 145 и 148, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 135, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID

NO: 144, 145 и 149, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 136, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, 145 и 150, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 137, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, 145 и 151, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 138, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, 145 и 152, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 139, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, 145 и 153, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 140, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, 145 и 154, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 141, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, 145 и 155, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 142, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, 145 и 156, соответственно; или

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 143, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, 145 и 157, соответственно.

62. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-61, отличающееся тем, что область Fab содержит

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 107-117; и/или

VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 119-129.

63. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-62, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 107-117; и/или

VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 119-129.

64. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-63, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 107, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 119;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 108, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 120;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 109, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 121;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 110, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 122;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 111, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 123;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 112, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 124;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 113, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 125;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 114, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 126;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 115, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 127;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 116, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 128; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 117, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 129;

65. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-64, отличающееся тем, что область Fab содержит

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 107, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 119;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 120;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 121;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 110, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 123;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 125;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 126;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ

ID NO: 127;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 116, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 128; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 129.

66. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-65, отличающееся тем, что область Fab содержит последовательность вариабельной области легкой каппа-цепи, имеющую аминокислотный остаток, отличный от серина, в положении 74 согласно системе нумерации IMGT.

67. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 66, отличающееся тем, что остаток в положении 74 согласно системе нумерации IMGT последовательности вариабельной области легкой цепи представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, метионина, лейцина и изолейцина.

68. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 66, отличающееся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT последовательности вариабельной области легкой цепи представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аргинина, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

69. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 66, отличающееся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT последовательности вариабельной области легкой цепи представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, валина, метионина, лейцина и изолейцина.

70. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 66, отличающееся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT последовательности вариабельной области легкой цепи представляет собой остаток лейцина.

71. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-70, отличающееся тем, что область Fab выбрана из группы, состоящей из ADT1-7-10, ADT1-7-15, ADT1-7-17, ADT1-7-18, ADT1-7-19, ADT1-7-20, ADT1-7-22 ADT1-7-23, ADT1-7-42, ADT1-7-3 и ADT1-7-61.

72. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 71, отличающееся тем, что область Fab содержит от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 2 аминокислотных замен во всех 6 областях CDR.

73. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 71 или 72, отличающееся тем, что область Fab содержит до 2 или до 1 аминокислотной замены во всех 6 областях CDR.

74. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 71-73,

отличающееся тем, что область Fab содержит 1 или 2 аминокислотные замены во всех 6 областях CDR.

75. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 71-74, отличающееся тем, что область Fab содержит от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 2 аминокислотных замен в одной или более каркасных областях.

76. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 71-75, отличающееся тем, что область Fab содержит до 2 или до 1 аминокислотной замены в одной или более каркасных областях.

77. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 71-76, отличающееся тем, что область Fab содержит 1 или 2 аминокислотные замены в одной или более каркасных областях.

78. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 71-6077, отличающиеся тем, что аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

79. Полиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления 1-14, отличающееся тем, что область Fab содержит:

последовательность HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 130

последовательность HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 131

последовательность HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $X_1X_2YX_3X_4AFDI$, где последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 132;

последовательность LCDR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 144;

последовательность LCDR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 145; и

последовательность LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности $QQX_5X_6X_7X_8LX_9T$, где последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 146;

где каждый из X_1-X_9 представляет собой природную аминокислоту.

80. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 79, отличающееся тем, что:

X_1 выбран из группы, состоящей из D, I и V;

X_2 выбран из группы, состоящей из D и S;

X_3 выбран из группы, состоящей из N, E, D, Q и A;

X_4 выбран из группы, состоящей из D и E;

X_5 выбран из группы, состоящей из T и S;

X_6 выбран из группы, состоящей из A, G, Y и S;

X_7 выбран из группы, состоящей из S и D;

X_8 выбран из группы, состоящей из T, E и G; и

X_9 выбран из группы, состоящей из L и D.

81. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 79 или варианту осуществления 80, отличающееся тем, что область Fab дополнительно содержит:

последовательность HFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 189;

последовательность HFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 190;

последовательность HFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 191;

последовательность HFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 192;

последовательность LFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 193 и 194;

последовательность LFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 195;

последовательность LFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 196; и

последовательность LFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 197.

82. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-81, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент:

связываются с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ);

имеют IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ).

83. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 79, отличающееся тем, что:

X_1 выбран из группы, состоящей из D и V;

X_2 выбран из группы, состоящей из D и S;

X_3 выбран из группы, состоящей из D, Q и A;

X_4 выбран из группы, состоящей из D и E;

X_5 представляет собой S;

X_6 выбран из группы, состоящей из A и Y;

X_7 представляет собой S;

X_8 выбран из группы, состоящей из E и G; и

X_9 выбран из группы, состоящей из L и D.

84. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 83, отличающееся тем, что область Fab дополнительно содержит:

последовательность HFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 189;

последовательность HFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ

ID NO: 190;

последовательность HFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 191;

последовательность HFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 192;

последовательность LFR1, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 193;

последовательность LFR2, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 195;

последовательность LFR3, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 196; и

последовательность LFR4, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 197.

85. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-84, отличающееся тем, что его область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ); и/или

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 5 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ).

.

.

86. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления 57-85, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 5-20 и/или 62-77 SEQ ID NO: 271.

87. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-86, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, содержит аминокислотные остатки 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 272.

88. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 57-87, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, состоит из аминокислотных остатков 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 272.

89. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-14, отличающееся тем, что область Fab получена из варианта исходного антитела к Vδ1 с созревшей аффинностью, причем исходное антитело к Vδ1 содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

90. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 89, отличающееся тем, что область Fab является такой, как определено в любом предшествующем варианте осуществления.

91. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту

осуществления, отличающееся тем, что его область Fab:

связывается с TRDV1 человека с KD менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

связывается с TRDV1 яванского макака с KD менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ); и/или

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ).

92. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ);

связывается с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ); и/или

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

93. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ);

связывается с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 50 нМ; и/или

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

94. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-14, отличающееся тем, что область Fab получена из варианта исходного антитела к Vδ1 с созревшей аффинностью, причем исходное антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118.

95. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 94, отличающееся тем, что область Fab является такой, как определено в любом предшествующем варианте осуществления.

96. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент:

связываются с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ); и/или

имеют IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ).

97. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее

около 5 нМ); и/или

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 5 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ).

98. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-14, отличающееся тем, что область Fab представляет собой вариант исходного антитела к Vδ1 с созревшей аффинностью, при этом исходное антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 273, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 282;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 274, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 283;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 275, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 284;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 276, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 285;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 277, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 286;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 278, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 287;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 279, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 288;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 280, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 289;

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 281, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 290; или

VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 312, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 313.

99. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что вариант с созревшей аффинностью имеет аффинность на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по

меньшей мере 50%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 500% или более предпочтительно по меньшей мере около 1000% выше, чем у исходного антитела, в отношении связывания с вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR), например, при измерении по Kd.

100. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что вариант с созревшей аффинностью содержит последовательности VH и VL, которые имеют по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 96% идентичности с соответствующими исходными последовательностями VH и VL.

101. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что аффинный вариант содержит до 20, например, до 15, например, до 10 аминокислотных замен по сравнению с последовательностями исходного антитела.

102. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-14, отличающееся тем, что область Fab содержит последовательность вариабельной области легкой каппа-цепи, в которой остаток в положении 74 согласно системе нумерации IMGT не является сериновым остатком.

103. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 102, отличающееся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, метионина, лейцина и изолейцина.

104. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 102, отличающееся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аргинина, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

105. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 102, отличающееся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, валина, метионина, лейцина и изолейцина.

106. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 102, отличающиеся тем, что остаток в положении 74 в соответствии с системой нумерации IMGT представляет собой остаток лейцина.

107. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что антитело представляет собой антитело IgG.

108. Полипецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что антитело представляет собой антитело IgG1.

109. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL,

включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 562.

110. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 522.

111. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 532.

112. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 541.

113. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 510.

114. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559.

115. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 552.

116. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab специфически связывается с вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR) и конкурирует за связывание вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR) с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому предшествующему варианту осуществления.

117. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что антитело имеет функциональную Fc.

118. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что оно:

вызывает снижение уровня TCR на Vδ1 Т-клетках, с которыми оно связываются;

не проявляет CDC или ADCC; и

не истощает Vδ1 Т-клетки.

119. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 118, отличающееся тем, что антитело вызывает истощение менее около 30%, или менее около 20%, или менее около 10% популяции жизнеспособных Vδ1+ Т-клеток посредством ADCC и/или CDC.

120. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 118, отличающееся тем, что антитело не индуцирует секрецию IL-17A.

121. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 118, отличающееся тем, что антитело индуцирует менее около 30%, или менее около 20%, или менее около 10% секреции IL-17A, индуцированной эквивалентными антителами к CD3.

122. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывается с TRVD1 человека с KD менее около 10 нМ.

123. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывается с TRVD1 человека с KD менее около 5 нМ.

124. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывается с TRVD1 яванского макака с KD менее около 100 нМ.

125. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 115, отличающееся тем, что область Fab связывается с TRVD1 человека с KD менее около 50 нМ.

126. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab специфически связывается с человеческим вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR) с KD менее около 10 нМ.

127. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab является такой, как определено в любом из вариантов осуществления 1-126.

128. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывается с вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) яванского макака γδ Т-клеточного рецептора (TCR) с KD менее около 100 нМ или менее около 50 нМ.

129. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ, предпочтительно менее около 10 нМ.

130. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что полиспецифическое антитело имеет IC50 для

уничтожения клеток A375 менее около 10 нМ, предпочтительно менее около 5 нМ.

131. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab стимулирует пролиферацию Vδ1 T-клеток.

132. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывает TVRD1 человека с KD менее около 100 нМ.

133. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывает TVRD1 человека с KD менее около 50 нМ.

134. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывает TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ.

135. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывает TRDV1 человека с K_D менее около 5 нМ.

136. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывает TRDV1 человека с K_D менее около 1 нМ.

137. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывает TRDV1 яванского макака с K_D менее около 100 нМ.

138. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывает TRDV1 яванского макака с K_D менее около 50 нМ.

139. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ, менее около 10 нМ, менее около 5 нМ, менее около 1 нМ или менее около 0,5 нМ.

140. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab:

связывается с TRDV1 человека (SEQ ID NO: 272 или 306) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

необязательно связывается с TRDV1 яванского макака (SEQ ID NO 308) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ).

141. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту

осуществления, отличающееся тем, что область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

связывается с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ) и IC90 для снижения уровня TCR менее около 100 нМ (менее около 50 нМ).

142. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ); и/или

связывается с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ).

143. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ);

связывается с TRDV1 яванского макака с K_D менее около 50 нМ;

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 1 нМ (предпочтительно менее около 0,5 нМ).

144. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ);

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ).

145. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab:

связывается с TRDV1 человека с K_D менее около 10 нМ (предпочтительно менее около 5 нМ);

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 5 нМ (предпочтительно менее около 1 нМ); и

.

146. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab представляет собой область Fab человека.

147. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что антитело представляет собой мкАт[2].

148. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что антитело представляет собой моноклональное

антитело.

149. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывается только с эпитопом в V-области Vδ1-цепи γδ-TCR.

150. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывается только с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 1-90 SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 306 или SEQ ID NO: 308.

151. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab не связывается с эпитопом, обнаруженным в CDR3 Vδ1-цепи γδ-TCR.

152. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что его область Fab не связывается с эпитопом в аминокислотной области 91-105 (CDR3) SEQ ID NO: 272.

153. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что область Fab связывается с эпитопом в пределах аминокислотной области

3-20 SEQ ID NO: 272; и/или

37-77 SEQ ID NO: 272.

154. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 153, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 37-53 и/или 59-77 SEQ ID NO: 272.

155. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 153, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, содержит аминокислотные остатки 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 272.

156. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 153, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, состоит из аминокислотных остатков 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 272.

157. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 153, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 5-20 и/или 62-77 SEQ ID NO: 272.

158. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 153, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, содержит аминокислотные остатки 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 272.

159. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 153, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, состоит из аминокислотных остатков 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 272.

160. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 153, отличающееся тем, что эпитоп, связанный с областью Fab, представляет собой активирующий эпитоп γδ Т-клетки.

161. Полиспецифическое антитело по варианту осуществления 160, отличающееся тем, что связывание активирующего эпитопа: (i) снижает уровень γδ TCR; (ii) активирует дегрануляцию γδ Т-клеток; и/или (iii) способствует опосредованному γδ Т-клетками уничтожению.

162. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что связывание активирующего эпитопа усиливает экспрессию CD107a, CD25, CD69 и/или Ki67.

163. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что полиспецифическое антитело имеет массу более около 70 кДа.

164. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что антитело не содержит VHCDR3, имеющую SEQ ID NO: 54, и VLCDR3, имеющую SEQ ID NO: 81, и/или при этом антитело не содержит VHCDR3, имеющую SEQ ID NO: 132, и VLCDR3, имеющую SEQ ID NO: 146.

165. Полиспецифическое антитело по любому предшествующему варианту осуществления, отличающееся тем, что антитело не содержит область VH, имеющую SEQ ID NO: 1, и область VL, имеющую SEQ ID NO: 26, и/или при этом антитело не содержит область VH, имеющую SEQ ID NO: 106, и область VL, имеющую SEQ ID NO: 118.

166. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая полиспецифическое антитело, определенное в любом предшествующем варианте осуществления.

167. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый связывающий домен к Vδ1, включающий последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 199-222, 224-247, 249-259 или 261-271.

168. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, как определено в варианте осуществления 166 или варианте осуществления 167.

169. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотидную последовательность, как определено в варианте осуществления 166 или варианте осуществления 167, или вектор экспрессии, как определено в варианте осуществления 168, необязательно при этом клетка-хозяин представляет собой рекомбинантную клетку-хозяин.

170. Клетка-хозяин по варианту осуществления 169, содержащая первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность VH, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность VL.

171. Клетка-хозяин по варианту осуществления 169, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность VH, и второй вектор экспрессии, содержащий вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность VL.

172. Клетка-хозяин по варианту осуществления 169, содержащая вектор экспрессии, содержащий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность VH, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность VL.

173. Клетка-хозяин, как определено в любом из вариантов осуществления 169-172, отличающаяся тем, что полинуклеотид или вектор экспрессии кодирует мембранный якорь или трансмембранный домен, слитый с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент присутствуют на внеклеточной поверхности клетки

174. Способ получения любого полиспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 1-165, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из вариантов осуществления 169-173 в среде для культивирования клеток.

175. Способ по варианту осуществления 174, дополнительно включающий выделение полиспецифического антитела из культуральной среды.

176. Композиция, содержащая полиспецифическое антитело или его связывающий антитело фрагмент, определенные в любом из вариантов осуществления 1-165.

177. Фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело, определенное в любом из вариантов осуществления 1-165, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

178. Набор, содержащий полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-165 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 177.

179. Набор по варианту осуществления 178, дополнительно содержащий дополнительный терапевтически активный агент.

180. Набор по варианту осуществления 178 или варианту осуществления 179, дополнительно содержащий инструкции по применению.

181. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 1-165 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 177.

182. Способ по варианту осуществления 181, отличающийся тем, что заболеванием или нарушением является злокачественное новообразование.

183. Способ по варианту осуществления 182, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой положительное по EGFR злокачественное новообразование.

184. Способ по любому из вариантов осуществления 181-183, дополнительно включающий введение второго агента субъекту одновременно или последовательно в любом порядке.

185. Способ модуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 1-165 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 177.

186. Способ по варианту осуществления 185, отличающийся тем, что субъект имеет злокачественное новообразование.

187. Способ по вариантам осуществления 185 или 186, отличающийся тем, что модулирование иммунного ответа у субъекта включает по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из активации γδ Т-клеток, инициирования или увеличения

пролиферации γδ Т-клеток, инициирования или увеличения экспансии γδ Т-клеток, инициирования или увеличения дегрануляции γδ Т-клеток, инициирования или увеличения опосредованной γδ Т-клетками активности уничтожения, инициирования или увеличения цитотоксичности γδ Т-клеток, инициирования или увеличения мобилизации γδ Т-клеток, повышения выживаемости γδ Т-клеток и повышения устойчивости к истощению γδ Т-клеток.

188. Способ по любому из вариантов осуществления 181-187, отличающийся тем, что пораженные клетки уничтожают, при этом сохраняют здоровые клетки.

189. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-165, или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 177, или набор по любому из вариантов осуществления 178-179 для применения в медицине.

190. Полиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-165, или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 177, или набор по любому из вариантов осуществления 178-179 для применения при лечении злокачественного новообразования.

191. Применение полиспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 1-165 в производстве лекарственного препарата.

192. Применение полиспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 1-165 в производстве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полиспецифическое антитело, содержащее область Fab и область Fc, причем область Fab содержит связывающий сайт, специфичный для эпитопа вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); а область Fc содержит EGFR-связывающий сайт.

2. Полиспецифическое антитело по п. 1, отличающееся тем, что EGFR-связывающий сайт представлен доменом CH3, в котором:

остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP (SEQ ID NO: 523), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512);

остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP (SEQ ID NO: 523), а остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512);

остатки с 359 по 362 (нумерация EU) включают EEGP (SEQ ID NO: 523), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), а остатки с 413 по 415 (нумерация EU) включают SYW (SEQ ID NO: 533);

остатки с 358 по 361, 361.1 и 362 (нумерация EU) включают LDEGGP (SEQ ID NO: 542), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 543);

остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), и остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512);

остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TDDGP (SEQ ID NO: 560), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), а остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512); или

остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TESGP (SEQ ID NO: 553), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают KFG (SEQ ID NO: 554), остатки с 413 по 421 (нумерация EU) включают SNLRWTKGH (SEQ ID NO: 555), а остаток 378 представляет собой валин.

3. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что EGFR-связывающий сайт представлен доменом CH3, в котором:

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514) и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515);

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую SNGQPENNY (SEQ ID NO: 525) и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515);

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514) и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF,

содержащую SYWRWQQGNV (SEQ ID NO: 534);

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELDEGGP (SEQ ID NO: 544), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514), и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWVKGNV (SEQ ID NO: 545);

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELTKNQ (SEQ ID NO: 513), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514) и остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515);

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDETDDGP (SEQ ID NO: 561), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514), остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515); или

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDETESGP (SEQ ID NO: 556), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 557), остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SNLRWTKGHV (SEQ ID NO: 558), а остаток 378 представляет собой валин.

4. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что EGFR-связывающий сайт не представлен доменом CH3, в котором:

остатки с 358 по 362 (нумерация EU) включают TDDGP (SEQ ID NO: 560), остатки с 384 по 386 (нумерация EU) включают TYG (SEQ ID NO: 511), а остатки с 413 по 419 (нумерация EU) включают SYWRWYK (SEQ ID NO: 512); или

остатки с 355 по 362 (нумерация EU) образуют петлю AB, содержащую RDELDDGP (SEQ ID NO: 561), остатки с 383 по 391 (нумерация EU) образуют петлю CD, содержащую STYGPENNY (SEQ ID NO: 514), остатки с 413 по 422 (нумерация EU) образуют петлю EF, содержащую SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515).

5. Полиспецифическое антитело по п. 1, отличающееся тем, что домен CH3 представляет собой домен CH3 IgG человека, сконструированный таким образом, чтобы содержать EGFR-связывающий сайт.

6. Полиспецифическое антитело по п. 2, отличающееся тем, что область Fc представляет собой область Fc IgG человека, содержащую домен CH3, сконструированный таким образом, чтобы содержать EGFR-связывающий сайт.

7. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что аминокислотная последовательность домена CH3 имеет по меньшей мере 90% идентичности, или по меньшей мере 95% идентичности, или 100% идентичности с:

SEQ ID NO: 562;

SEQ ID NO: 522;

SEQ ID NO: 532;

SEQ ID NO: 541;

SEQ ID NO: 510;

SEQ ID NO: 559; или

SEQ ID NO: 552.

8. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что антитело имеет функциональную Fc.

9. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fc содержит:

SEQ ID NO: 391 или SEQ ID NO: 392;

SEQ ID NO: 520 или SEQ ID NO: 521;

SEQ ID NO: 530 или SEQ ID NO: 531;

SEQ ID NO: 539 или SEQ ID NO: 540;

SEQ ID NO: 508 или SEQ ID NO: 509;

SEQ ID NO: 385 или SEQ ID NO: 386; или

SEQ ID NO: 550 или SEQ ID NO: 551.

10. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, содержащее:

SEQ ID NO: 389; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 432;

SEQ ID NO: 400; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 436;

SEQ ID NO: 516; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 518;

SEQ ID NO: 517; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 519;

SEQ ID NO: 526; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 528;

SEQ ID NO: 527; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 529;

SEQ ID NO: 535; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 537;

SEQ ID NO: 536; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 538;

SEQ ID NO: 504; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 506;

SEQ ID NO: 505; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 507;

SEQ ID NO: 388; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 431;

SEQ ID NO: 399; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 435;

SEQ ID NO: 546; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 548;

SEQ ID NO: 547; или SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 549;

SEQ ID NO: 378; или SEQ ID NO: 425 и SEQ ID NO: 426;

SEQ ID NO: 379; или SEQ ID NO: 421 и SEQ ID NO: 437;

SEQ ID NO: 380; или SEQ ID NO: 423 и SEQ ID NO: 427;

11. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, которое не содержит:

SEQ ID NO: 385 или SEQ ID NO: 386;

SEQ ID NO: 378; или SEQ ID NO: 425 и SEQ ID NO: 426;

SEQ ID NO: 379; или SEQ ID NO: 421 и SEQ ID NO: 437; или

SEQ ID NO: 380; или SEQ ID NO: 423 и SEQ ID NO: 427.

12. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, причем

полиспецифическое антитело связывается с EGFR человека с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса) менее около 150 нМ, менее около 20 нМ, менее около 10 нМ или менее около 5 нм.

13. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

VHCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 51, 52 и 130;

VHCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 53 и 131; и

VHCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 68, 55 до 67, 69 до 78 и 133 до 143; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую:

VLCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 79 и 144;

VLCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 80 и 145; и

VLCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 95, 82-94, 96-105 и 147-157.

14. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов,

отличающееся тем, что область Fab содержит:

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 68, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 95, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 55, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 82, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 56, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 83, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 57, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 84, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 58, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 85, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 59, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 86, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 60, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 87, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 52, 53 и 61, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 88, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 62, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 89, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 63, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 90, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 64, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 91, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 65, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 92, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 52, 53 и 66, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 93, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 67, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 94, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 69, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 96, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 70, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 97, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 71, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 98, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 72, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 99, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 73, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 100, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 52, 53 и 74, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 101, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 75, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 102, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 76, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 103, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 77, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 104, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 53 и 78, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80 и 105, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, 131 и 133, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 147, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, 131 и 134, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 148, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности

SEQ ID NO: 130, 131 и 135, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 149, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, 131 и 136, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 150, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, 131 и 137, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 151, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, 131 и 138, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 152, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, 131 и 139, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 153, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, 131 и 140, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 154, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, 131 и 141, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 155, соответственно;

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, 131 и 142, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 156, соответственно; или

VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, 131 и 143, соответственно, и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 157, соответственно.

15. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 2-14, 16-25 и 107-117; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, 27-39, 41-50 и 119-129.

16. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит:

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 40;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 27;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 28;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 29;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере

94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 30;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 31;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 33;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 34;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере

94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 35;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 36;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 37;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 38;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 39;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере

94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 41;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 42;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 44;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 45;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере

94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 46;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 47;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 48;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 49;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 25, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 50;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 107, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере

94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 119;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 108, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 120;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 109, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 121;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 110, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 122;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 111, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 123;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 112, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере

94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 124;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 113, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 125;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 114, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 126;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 115, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 127;

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 116, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 128; или

VH, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 117, и VL, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере

90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 129.

17. Полицифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит аминокислотный остаток, отличный от серина, в положении 74 согласно системе нумерации IMGT, необязательно при этом остаток в положении 74 согласно системе нумерации IMGT представляет собой остаток лейцина.

18. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит:

последовательность HCDR1, включающую последовательность GDSVSSKSX_1A (SEQ ID NO: 158);

последовательность HCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 53

последовательность HCDR3, включающую последовательность $X_2WX_3X_4X_5X_6DX_7$ (SEQ ID NO: 162), причем последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 54;

последовательность LCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 79;

последовательность LCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 80; и

последовательность LCDR3, включающую $QQX_8YX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}T$ (SEQ ID NO: 166), причем последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 81;

где каждый из X_1-X_{13} представляет собой природную аминокислоту,

или при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

последовательность HCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 130

последовательность HCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 131

последовательность HCDR3, включающую последовательность $X_1X_2YX_3X_4$AFDI, при этом последовательность HCDR3 не является SEQ ID NO: 132;

последовательность LCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 144;

последовательность LCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 145; и

последовательность LCDR3, включающую последовательность $QQX_5X_6X_7X_8LX_9T$, причем последовательность LCDR3 не является SEQ ID NO: 146;

где каждый из X_1-X_9 представляет собой природную аминокислоту.

19. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab представляет собой вариант исходной области Fab к Vδ1 с созревшей аффинностью, причем исходная область Fab к Vδ1 содержит:

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1; и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:273; и VL,

включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:282;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 283;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 275, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 284;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 276, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 285;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 277, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 286;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 287;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 288;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 289;

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290; или

VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 313;

необязательно, при этом:

антитело с созревшей аффинностью имеет на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 500% или более предпочтительно по меньшей мере около 1000% большую аффинность, чем исходное антитело, для связывания с вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR), например, при измерении по Kd;

антитело к Vδ1 с созревшей аффинностью или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности VH и VL, которые имеют по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 96% идентичности с соответствующими исходными последовательностями VH и VL; и/или

антитело к Vδ1 с созревшей аффинностью или его антигенсвязывающий фрагмент содержат до 20, например, до 15, например, до 10 аминокислотных замен по сравнению с последовательностями исходного антитела.

20. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 562.

21. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 522.

22. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 532.

23. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 541.

24. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 510.

25. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559.

26. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и область Fc содержит домен CH3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 552.

27. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что оно:

вызывает снижение уровня TCR на Vδ1 Т-клетках, с которыми оно связываются;

не проявляет CDC или ADCC; и

не истощает Vδ1 Т-клетки.

28. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, причем полиспецифическое антитело вызывает истощение менее около 30%, или менее около 20%, или менее около 10% жизнеспособной популяции Vδ1+ Т-клеток посредством ADCC и/или CDC.

29. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с TRVD1 человека с KD менее около 10 нМ, необязательно, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с TRVD1 яванского макака с KD менее около 100 нМ.

30. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, которое специфически связывается с человеческим вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR) с KD менее около 10 нМ, необязательно, при этом антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) яванского макака γδ Т-клеточного рецептора (TCR) с KD менее около 100 нМ и/или специфически связываются с EGFR человека с K_D менее около 150 нМ.

31. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, которое специфически связывается с человеческим вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR) с KD менее около 10 нМ, необязательно, при этом антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с вариабельным доменом дельта-цепи 1 (Vδ1) яванского макака γδ Т-клеточного рецептора (TCR) с KD менее около 100 нМ и/или специфически связываются с EGFR человека с K_D менее около 20 нМ.

32. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, которое:

связывается с TRDV1 человека (SEQ ID NO: 272 или 306) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

необязательно связывается с TRDV1 яванского макака (SEQ ID NO 308) с аффинностью связывания (K_D, например, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса) менее около 100 нМ (предпочтительно менее около 50 нМ);

имеет IC50 для снижения уровня TCR менее около 50 нМ (предпочтительно менее около 10 нМ).

33. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab связывается только с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 1-90 SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 306 и/или SEQ ID NO: 308.

34. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab связывается с эпитопом в пределах аминокислотной области

3-20 SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 306 и/или SEQ ID NO: 308; и/или

37-77 SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 306 и/или SEQ ID NO: 308.

35. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что область Fab связывается с активирующим эпитопом γδ Т-клетки, необязательно, при этом связывание активирующего эпитопа: (i) снижает уровень γδ TCR; (ii) активирует дегрануляцию γδ Т-клеток; и/или (iii) способствует опосредованному γδ Т-клетками уничтожению.

36. Полиспецифическое антитело по п. 16, отличающееся тем, что связывание активирующего эпитопа усиливает экспрессию CD107a, CD25, CD69 и/или Ki67.

37. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, причем полиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

38. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, причем полиспецифическое антитело не является биспецифическим антителом.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело, определенное в любом из пп. 1-38, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

40. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта или способ модуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела по любому из пп. 1-38 или фармацевтической композиции по п. 39.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование или при этом субъект, у которого модулируется иммунный ответ, страдает злокачественным новообразованием.

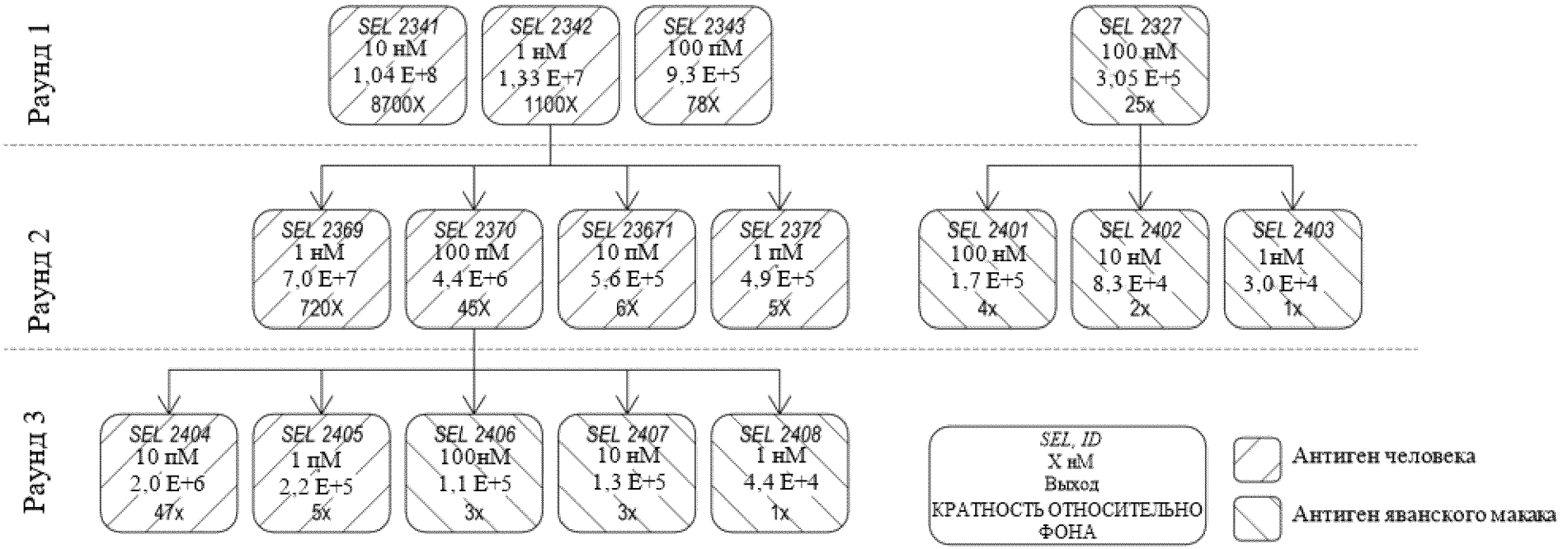
42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование, положительное по EGFR.

43. Способ по п. 40, отличающийся тем, что модулирование иммунного ответа у субъекта включает по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из активации γδ Т-клеток, инициирования или увеличения пролиферации γδ Т-клеток, инициирования или увеличения экспансии γδ Т-клеток, инициирования или увеличения дегрануляции γδ Т-клеток, инициирования или увеличения опосредованной γδ Т-клетками активности уничтожения, инициирования или увеличения цитотоксичности γδ Т-клеток, инициирования или увеличения мобилизации γδ Т-клеток, повышения выживаемости γδ Т-клеток и повышения устойчивости к истощению γδ Т-клеток.

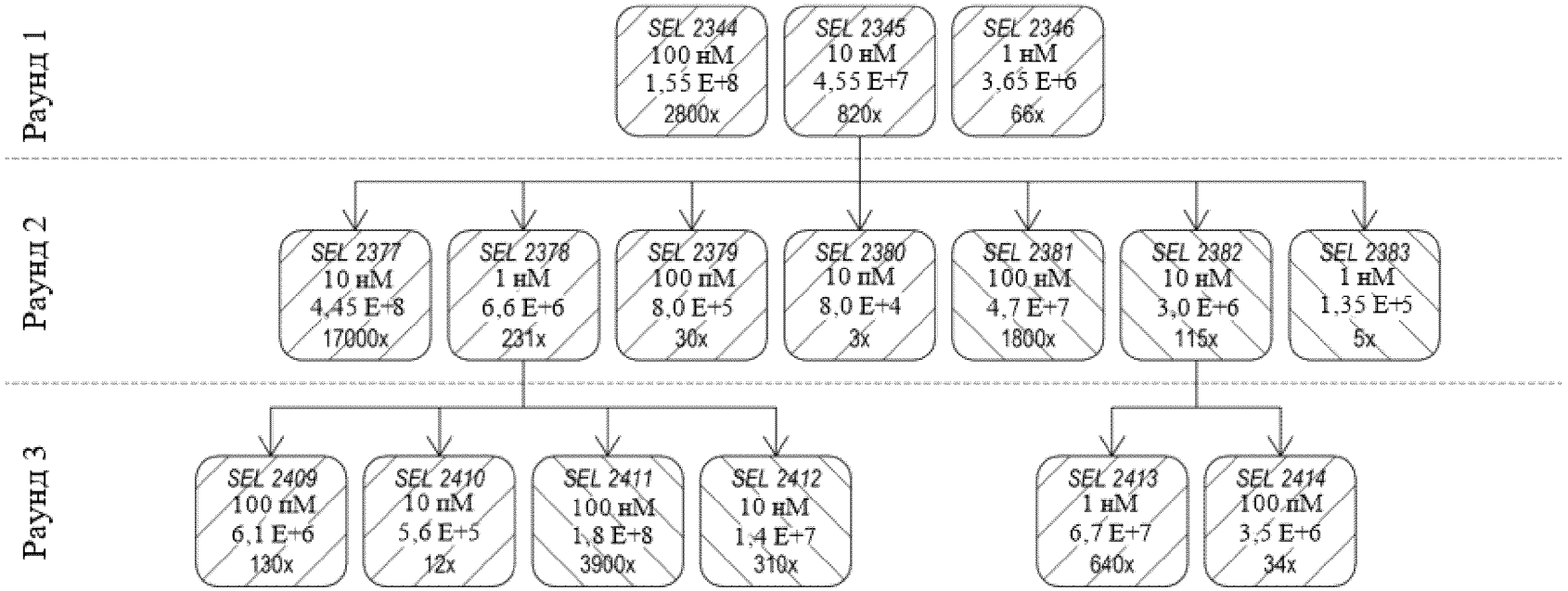
44. Способ по любому из пп. 40-43, в котором уничтожают пораженные клетки, при этом сохраняют здоровые клетки.

45. Полиспецифическое антитело по любому из пп. 1-38 или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения при лечении злокачественного новообразования.

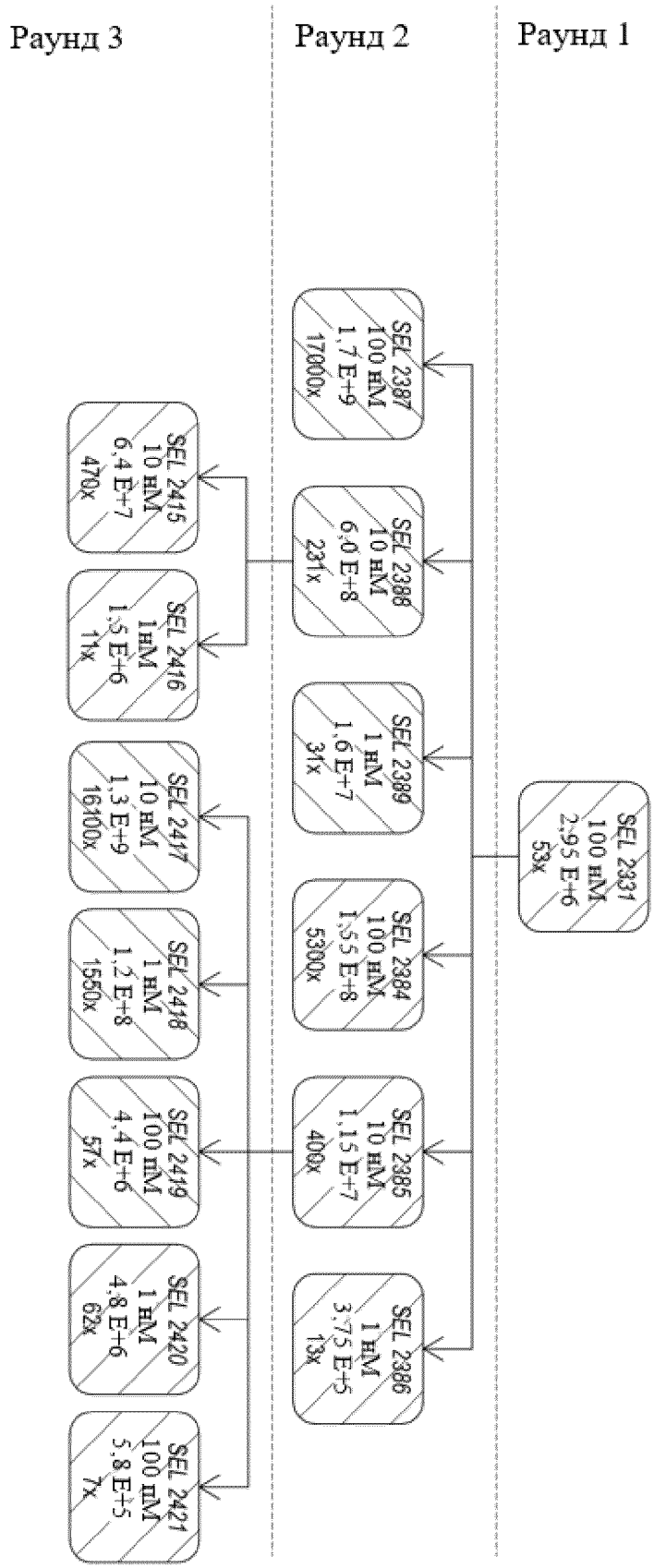
По доверенности


Раунд 1
Раунд 2
Раунд 3
SEL 2341
10 нМ
1,04 E+8
8700X
SEL 2342
1 нМ
1,33 E+7
1100X
SEL 2343
100 пМ
9,3 E+5
78X
SEL 2327
100 нМ
3,05 E+5
25x
SEL 2369
1 нМ
7,0 E+7
720X
SEL 2370
100 пМ
4,4 E+6
45X
SEL 23671
10 пМ
5,6 E+5
6X
SEL 2372
1 пМ
4,9 E+5
5X
SEL 2401
100 нМ
1,7 E+5
4x
SEL 2402
10 нМ
8,3 E+4
2x
SEL 2403
1нМ
3,0 E+4
1x
SEL 2404
10 пМ
2,0 E+6
47x
SEL 2405
1 пМ
2,2 E+5
5x
SEL 2406
100нМ
1,1 E+5
3x
SEL 2407
10 нМ
1,3 E+5
3x
SEL 2408
1 нМ
4,4 E+4
1x
SEL, ID
X нМ
Выход
КРАТНОСТЬ ОТНОСИТЕЛЬНО ФОНА
Антиген человека
Антиген яванского макака

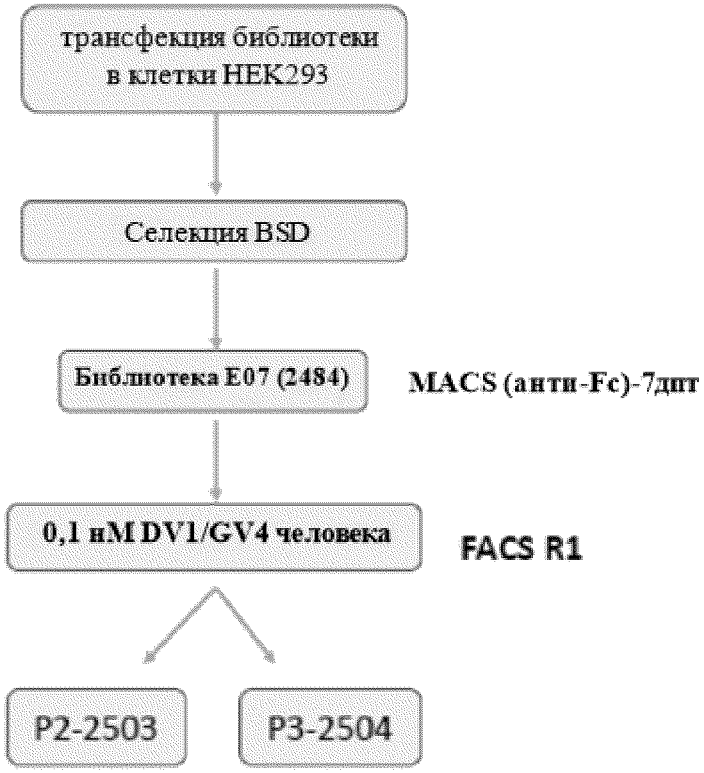
Фиг. 1A


Раунд 1
Раунд 2
Раунд 3
SEL 2344
100 нМ
1,55 E+8
2800x
SEL 2345
10 нМ
4,55 E+7
820x
SEL 2346
1 нМ
3,65 E+6
66x
SEL 2377
10 нМ
4,45 E+8
17000x
SEL 2378
1 нМ
6,6 E+6
231x
SEL 2379
100 пМ
8,0 E+5
30x
SEL 2380
10 пМ
8,0 E+4
3x
SEL 2381
100 нМ
4,7 E+7
1800x
SEL 2382
10 нМ
3,0 E+6
115x
SEL 2383
1 нМ
1,35 E+5
5x
SEL 2409
100 пМ
6,1 E+6
130x
SEL 2410
10 пМ
5,6 E+5
12x
SEL 2411
100 нМ
1,8 E+8
3900x
SEL 2412
10 нМ
1,4 E+7
310x
SEL 2413
1 нМ
6,7 E+7
640x
SEL 2414
100 пМ
3,5 E+6
34x

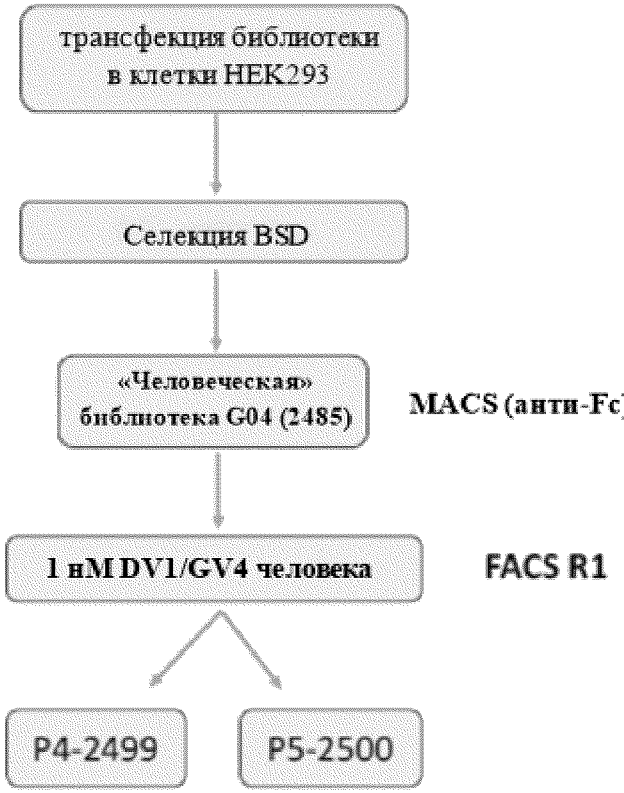
Фиг. 1B


Раунд 1
Раунд 2
Раунд 3
SEL 2331
100 нМ
2,95 E+6
53x
SEL 2387
100 нМ
1,7 E+9
17000x
SEL 2388
10 нМ
6,0 E+8
231x
SEL 2389
1 нМ
1,6 E+7
31x
SEL 2384
100 нМ
1,55 E+8
5300x
SEL 2385
10 нМ
1,15 E+7
400x
SEL 2386
1 нМ
3,75 E+5
13x
SEL 2415
10 нМ
6,4 E+7
470x
SEL 2416
1 нМ
1,5 E+6
11x
SEL 2417
10 нМ
1,3 E+9
16100x
SEL 2418
1 нМ
1,2 E+8
1550x
SEL 2419
100 пМ
4,4 E+6
57x
SEL 2420
1 нМ
4,8 E+6
62x
SEL 2421
100 пМ
5,8 E+5
7x

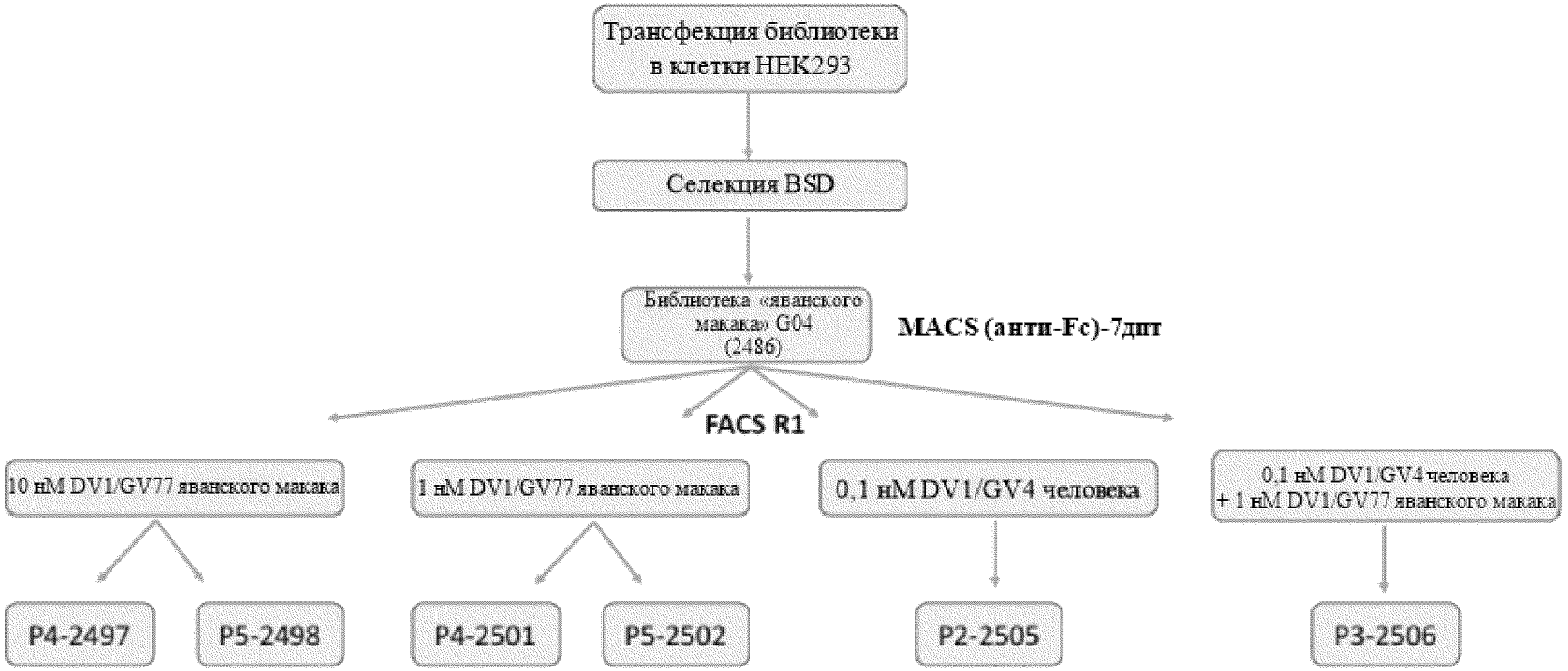
Фиг. 1С


трансфекция библиотеки
в клетки HEK293
Селекция BSD
Библиотека E07 (2484)
MACS (анти-Fc)-7дит
0,1 нМ DV1/GV4 человека
FACS R1
P2-2503
P3-2504

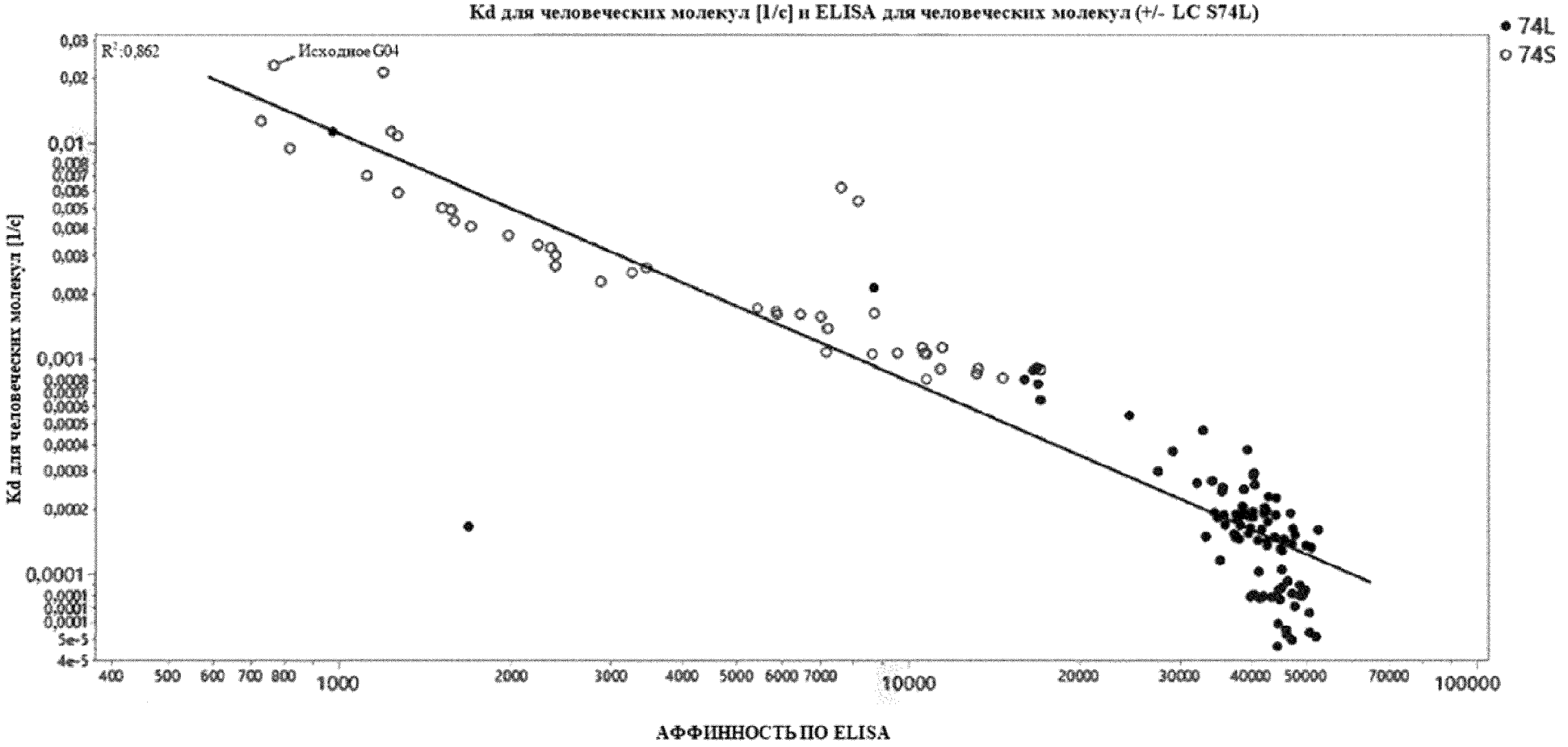
Фиг. 2A


трансфекция библиотеки
в клетки HEK293
Селекция BSD
«Человеческая»
библиотека G04 (2485)
MACS (анти-Fc)-7дит
1 нМ DV1/GV4 человека
FACS R1
P4-2499
P5-2500

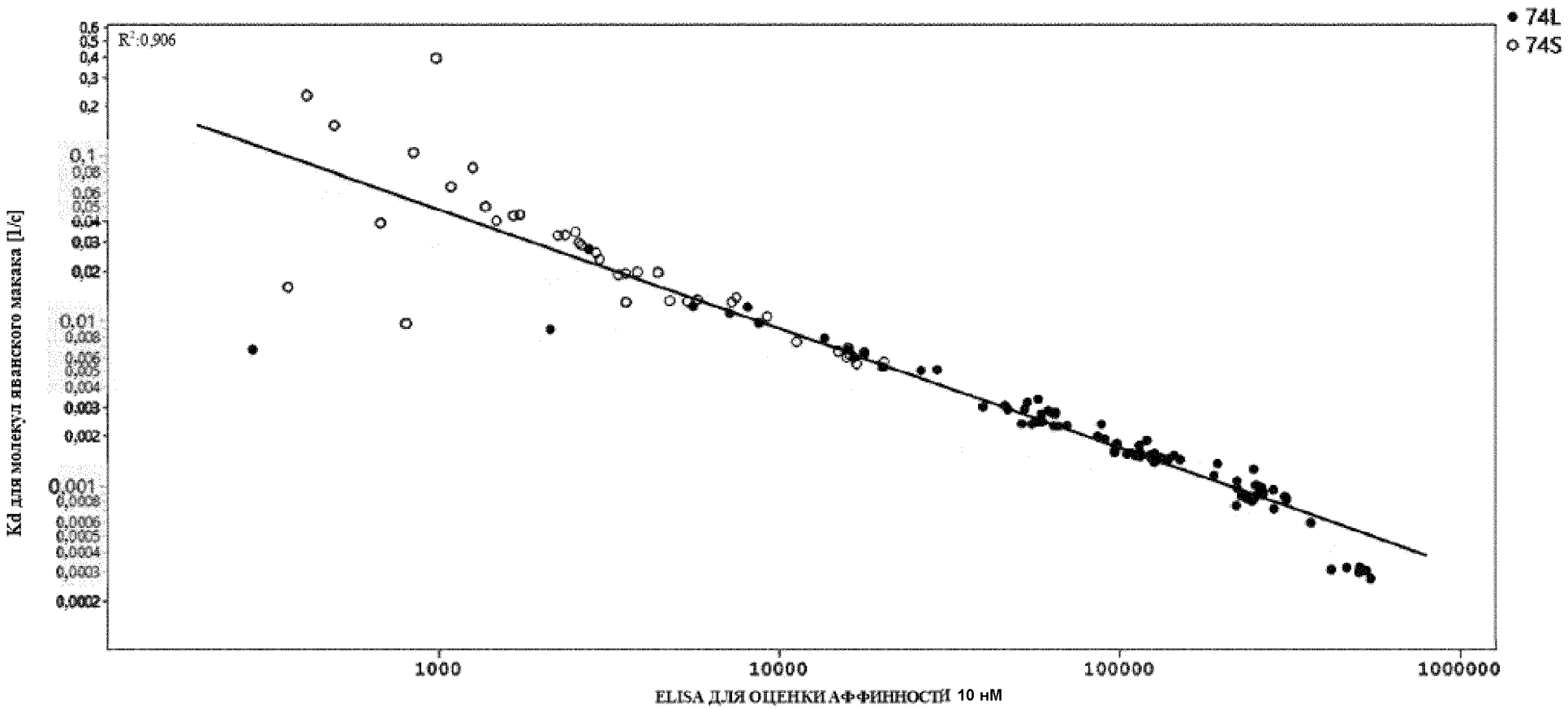
Фиг. 2B


Трансфекция библиотеки в клетки HEK293
Селекция BSD
Библиотека «яванского макака» G04 (2486)
MACS (анти-Fc)-7дит
FACS R1
10 нМ DV1/GV77 яванского макака
1 нМ DV1/GV77 яванского макака
0,1 нМ DV1/GV4 человека
0,1 нМ DV1/GV4 человека + 1 нМ DV1/GV77 яванского макака
P4-2497
P5-2498
P4-2501
P5-2502
P2-2505
P3-2506

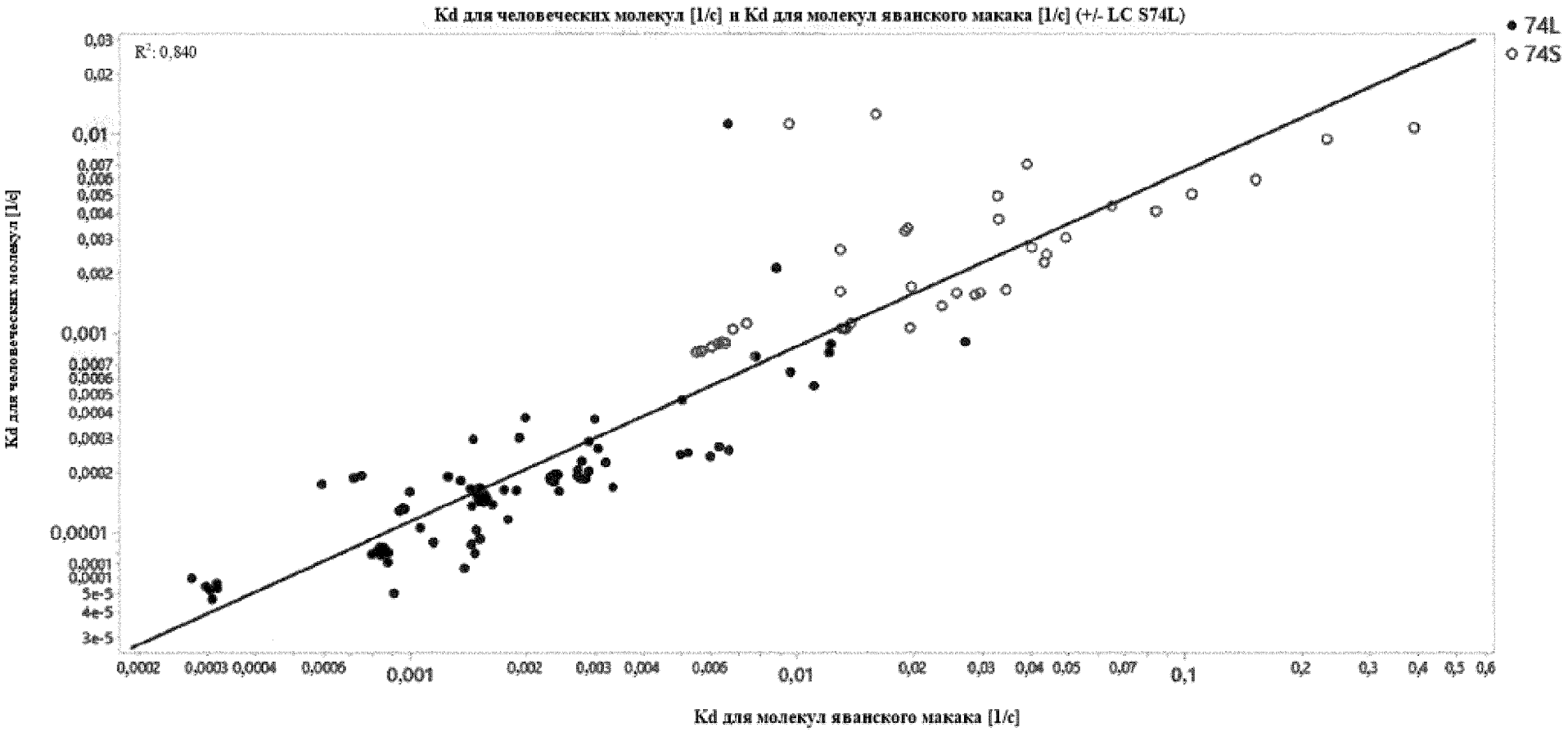
Фиг. 2C


Kd для человеческих молекул [1/c] и ELISA для человеческих молекул (+/- LC S74L)
74L
74S
R²:0,862
Исходное G04
Kd для человеческих молекул [1/c]
АФФИННОСТЬ ПО ELISA

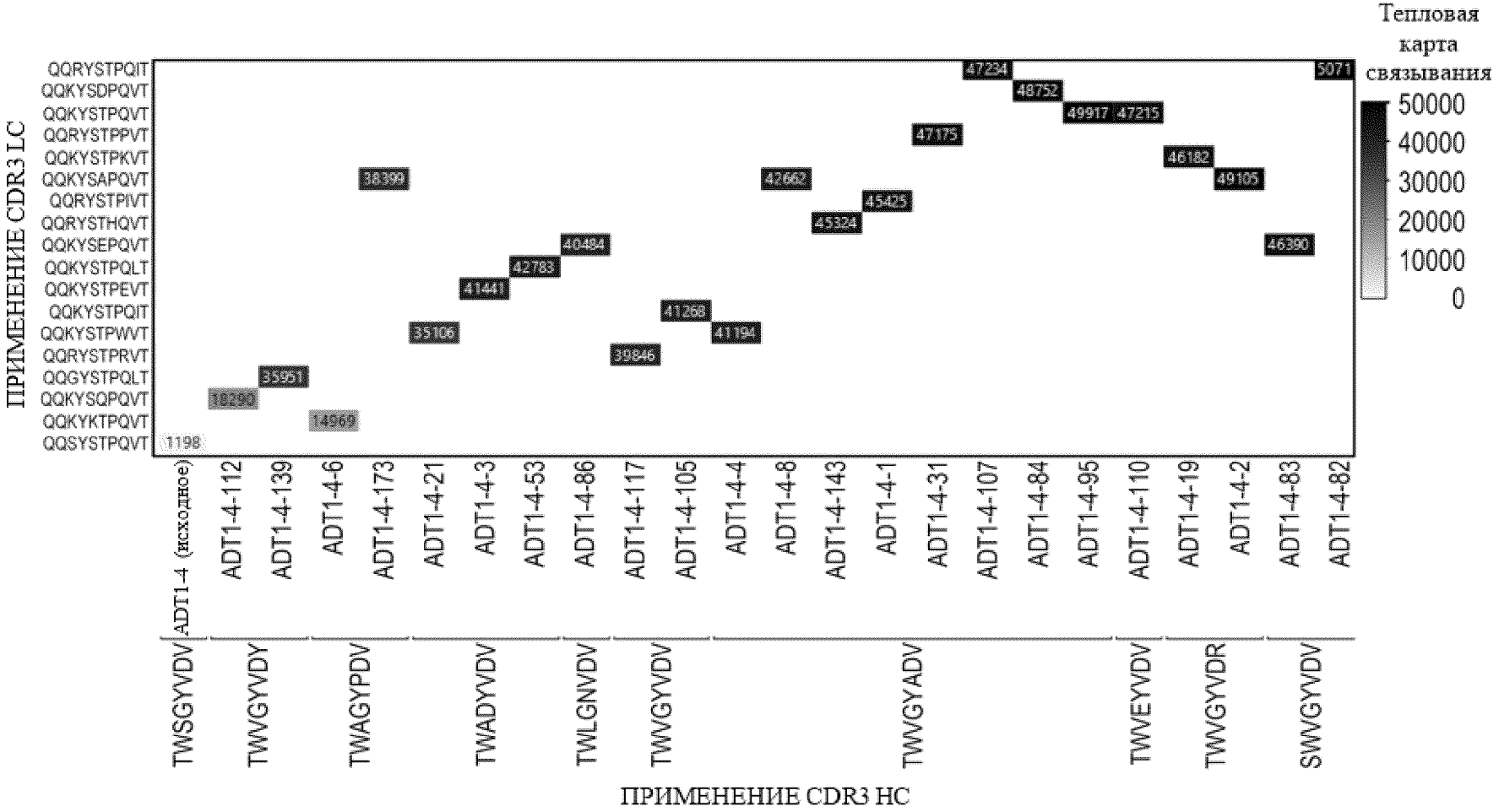
Фиг. 3A


R²:0,906
74L
74S
Kd для молекул яванского макака [1/c]
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,02
0,01
0,002
0,001
0,0002
1000
10000
100000
1000000
ELISA ДЛЯ ОЦЕНКИ АФФИННОСТИ 10 нМ

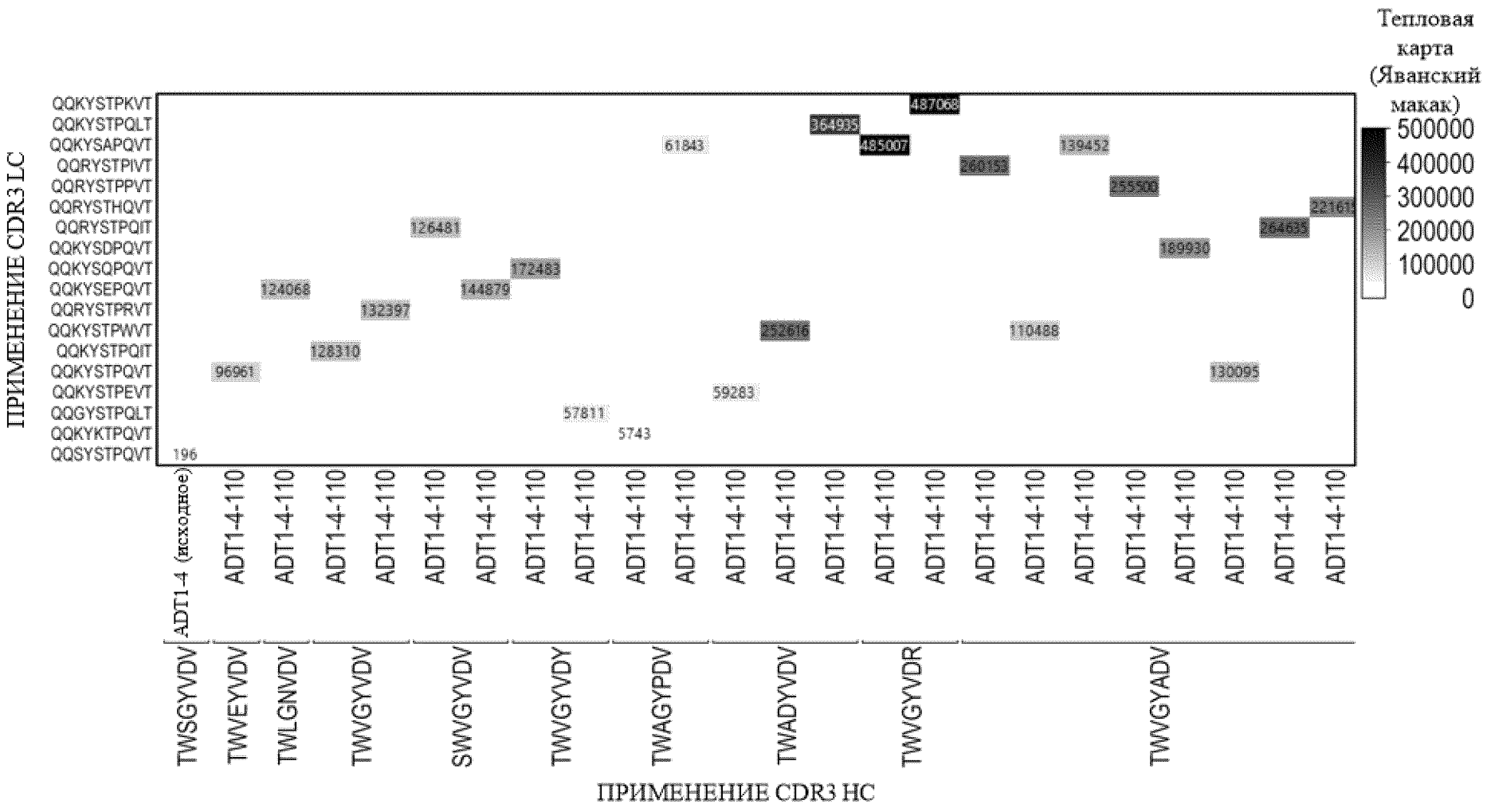
Фиг. 3B


Kd для человеческих молекул [1/c] и Kd для молекул яванского макака [1/c] (+/- LC S74L)
R²: 0,840
74L
74S
Kd для человеческих молекул [1/c]
Kd для молекул яванского макака [1/c]
0,03
0,02
0,01
0,007
0,006
0,005
0,004
0,003
0,002
0,001
0,0007
0,0006
0,0005
0,0004
0,0003
0,0002
0,0001
0,00007
0,00006
0,00005
5e-5
4e-5
3e-5
0,0002
0,0003
0,0004
0,0006
0,001
0,002
0,003
0,004
0,006
0,01
0,02
0,03
0,04
0,05
0,07
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6

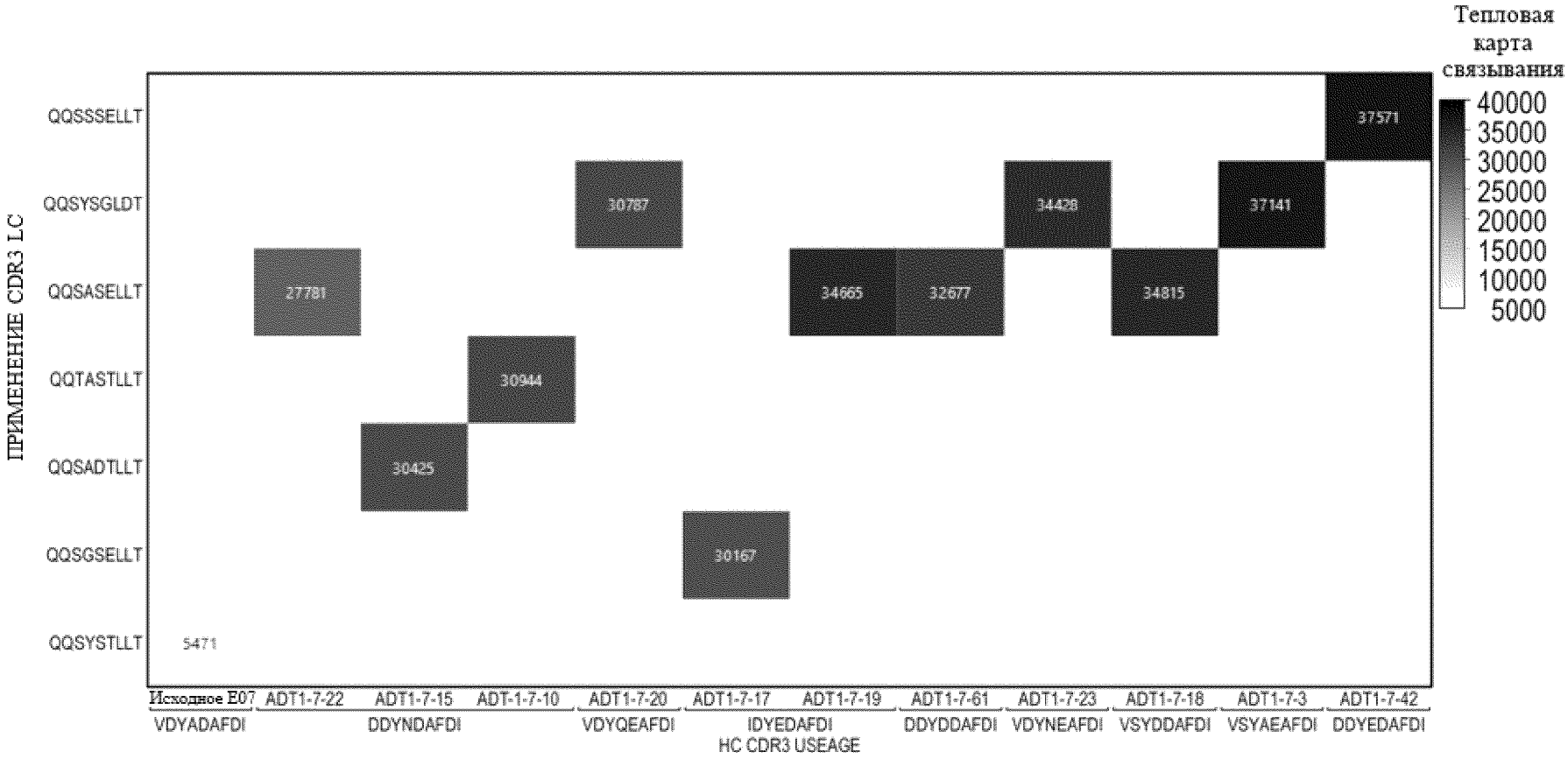
Фиг. 3C


ПРИМЕНЕНИЕ CDR3 LC
QQRYSTPQIT
QQKYSDPQVT
QQKYSTPQVT
QQRYSTPPVT
QQKYSTPKVT
QQKYSAPQVT
QQRYSTPIVT
QQRYSTHQVT
QQKYSEPQVT
QQKYSTPQLT
QQKYSTPEVT
QQKYSTPQIT
QQKYSTPWVT
QQRYSTPRVT
QQGYSTPQLT
QQKYSQPQVT
QQKYKTPQVT
QQSYSTPQVT
1198
10290
35951
14969
38399
35106
41441
42783
40484
39846
41268
41194
42662
45324
45425
47175
47234
48752
49917
47215
46182
49105
46390
5071
ADT1-4 (исходное)
ADT1-4-112
ADT1-4-139
ADT1-4-6
ADT1-4-173
ADT1-4-21
ADT1-4-3
ADT1-4-53
ADT1-4-86
ADT1-4-117
ADT1-4-105
ADT1-4-4
ADT1-4-8
ADT1-4-143
ADT1-4-1
ADT1-4-31
ADT1-4-107
ADT1-4-84
ADT1-4-95
ADT1-4-110
ADT1-4-19
ADT1-4-2
ADT1-4-83
ADT1-4-82
TWSGYVDV
TWVGYVDY
TWAGYPDV
TWADYVDV
TWLGNVDV
TWVGYVDV
TWVGYADV
TWVEYVDV
TWVGYVDR
SWVGYVDV
ПРИМЕНЕНИЕ CDR3 HC
Тепловая карта связывания
50000
40000
30000
20000
10000
0

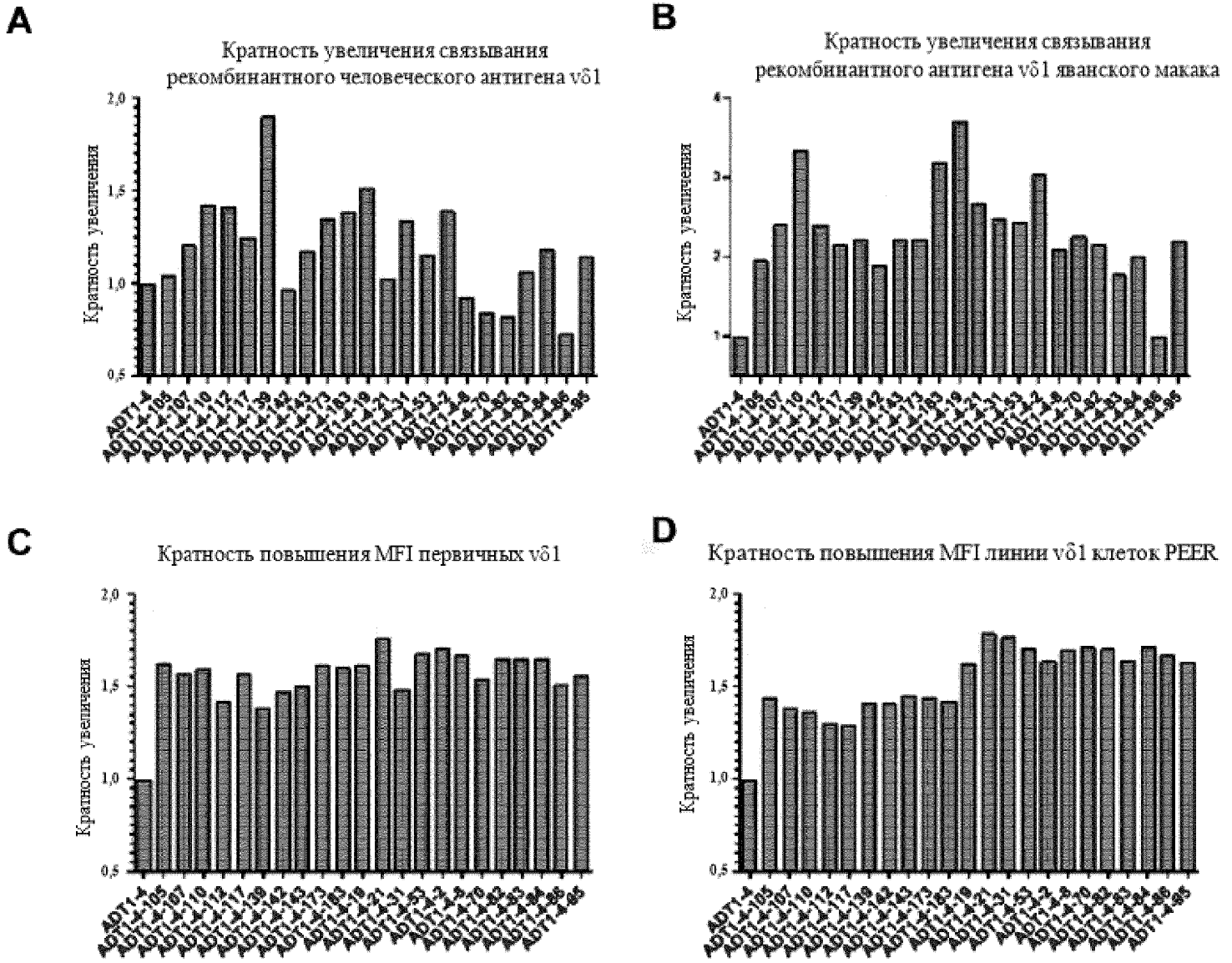
Фиг. 4A


Тепловая карта (Яванский макак)
500000
400000
300000
200000
100000
0
ПРИМЕНЕНИЕ CDR3 LC
QQKYSTPKVT
QQKYSTPQLT
QQKYSAPQVT
QQRYSTPIVT
QQRYSTPPVT
QQRYSTHQVT
QQRYSTPQIT
QQKYSDPQVT
QQKYSQPQVT
QQKYSEPQVT
QQRYSTPRVT
QQKYSTPWVT
QQKYSTPQIT
QQKYSTPQVT
QQKYSTPEVT
QQGYSTPQLT
QQKYKTPQVT
QQSYSTPQVT
487068
364935
61843
485007
139452
260153
255500
221615
126481
264635
189930
172483
124068
144879
132397
252616
110488
128310
96961
130095
59283
57811
5743
196
ADT1-4 (исходное)
ADT1-4-110
TWSGYVDV
TWVEYVDV
TWLGNVDV
TWVGYVDV
SWVGYVDV
TWVGYVDY
TWAGYPDV
TWADYVDV
TWVGYVDR
TWVGYADV
ПРИМЕНЕНИЕ CDR3 HC

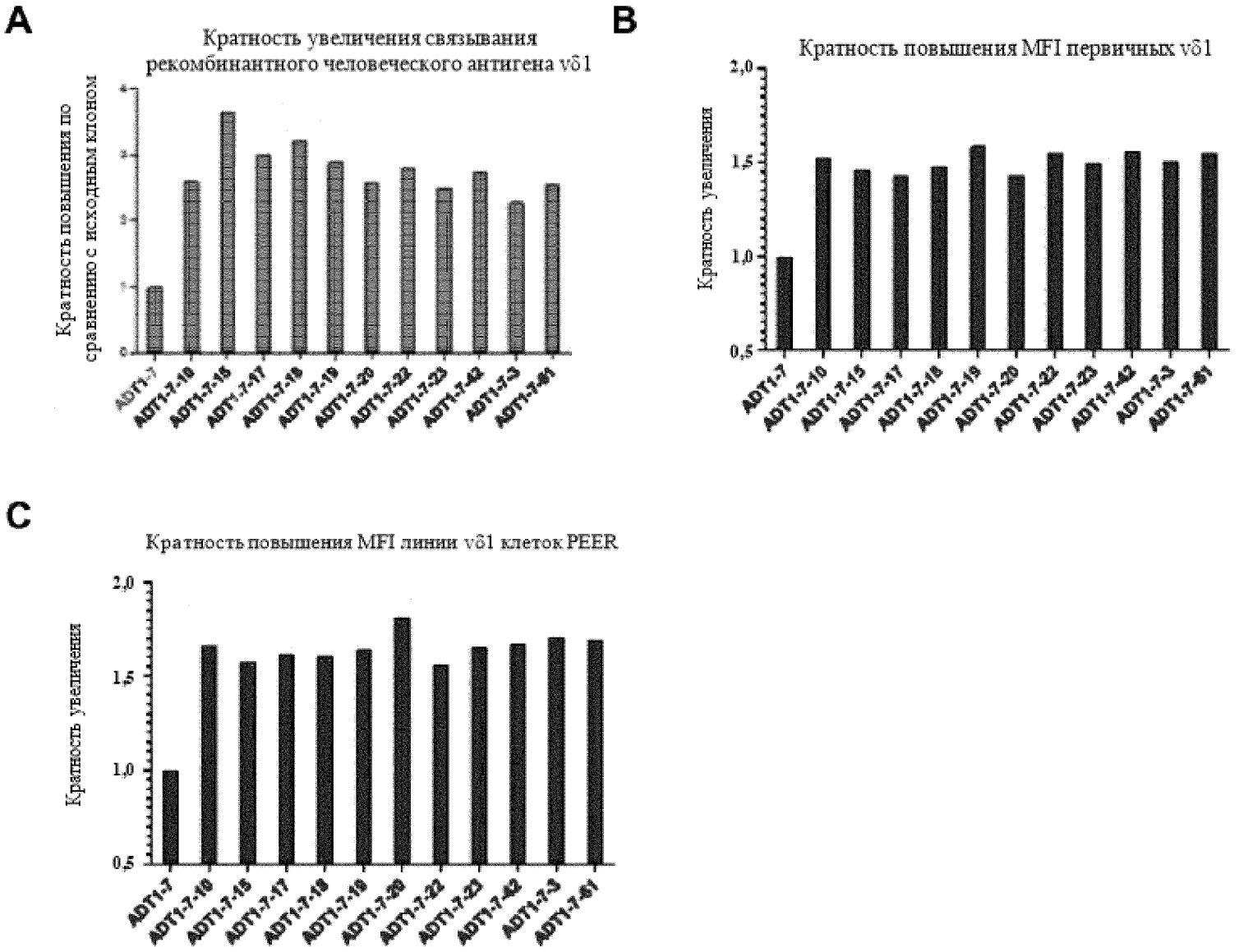
Фиг. 4B


Тепловая карта связывания
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
ПРИМЕНЕНИЕ CDR3 LC
QQSSSELLT
QQSYSGLDT
QQSASELLT
QQTASTLLT
QQSADTLLT
QQSGSELLT
QQSYSTLLT
27781
30787
30944
30425
30167
5471
34665
32677
34428
34815
37141
37571
Исходное E07
ADT1-7-22
ADT1-7-15
ADT-1-7-10
ADT1-7-20
ADT1-7-17
ADT1-7-19
ADT1-7-61
ADT1-7-23
ADT1-7-18
ADT1-7-3
ADT1-7-42
VDYADAFDI
DDYNDAFDI
VDYQEAFDI
IDYEDAFDI
DDYDDAFDI
VDYNEAFDI
VSYDDAFDI
VSYAEAFDI
DDYEDAFDI
HC CDR3 USEAGE

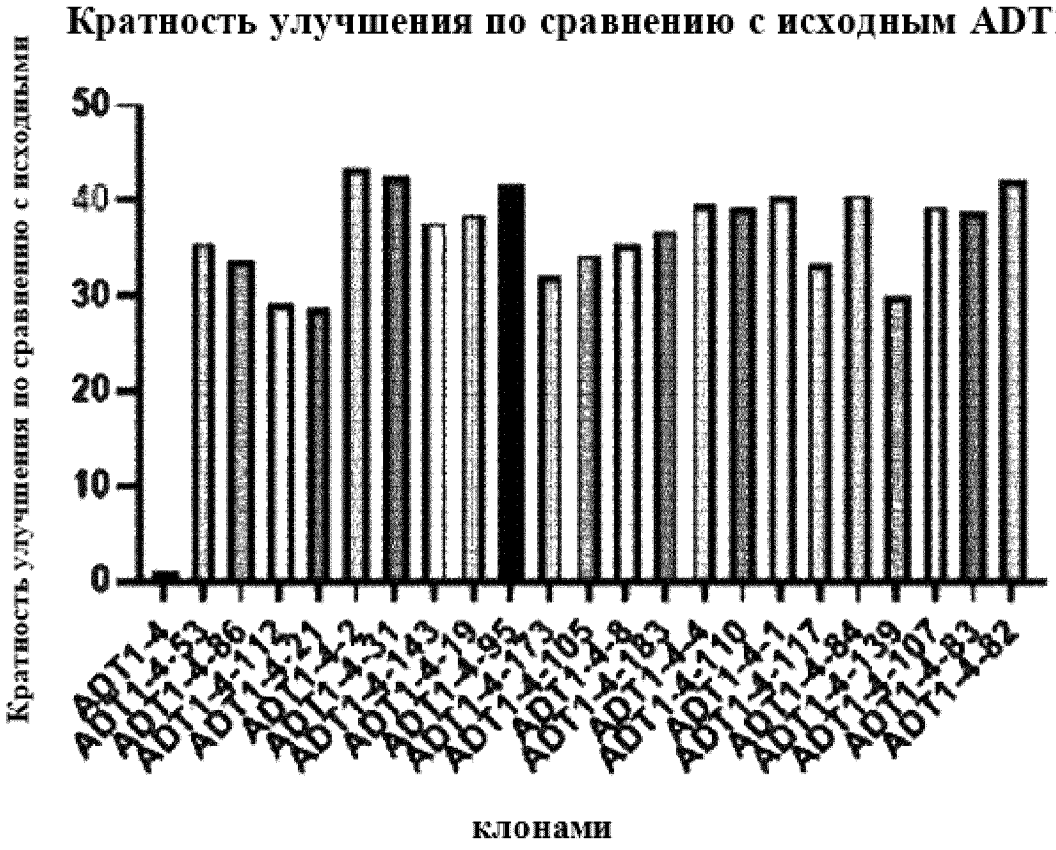
Фиг. 4C


A
Кратность увеличения связывания рекомбинантного человеческого антигена vδ1
Кратность увеличения
B
Кратность увеличения связывания рекомбинантного антигена vδ1 яванского макака
Кратность увеличения
C
Кратность повышения MFI первичных vδ1
Кратность увеличения
D
Кратность повышения MFI линии vδ1 клеток PEER
Кратность увеличения

Фиг. 5

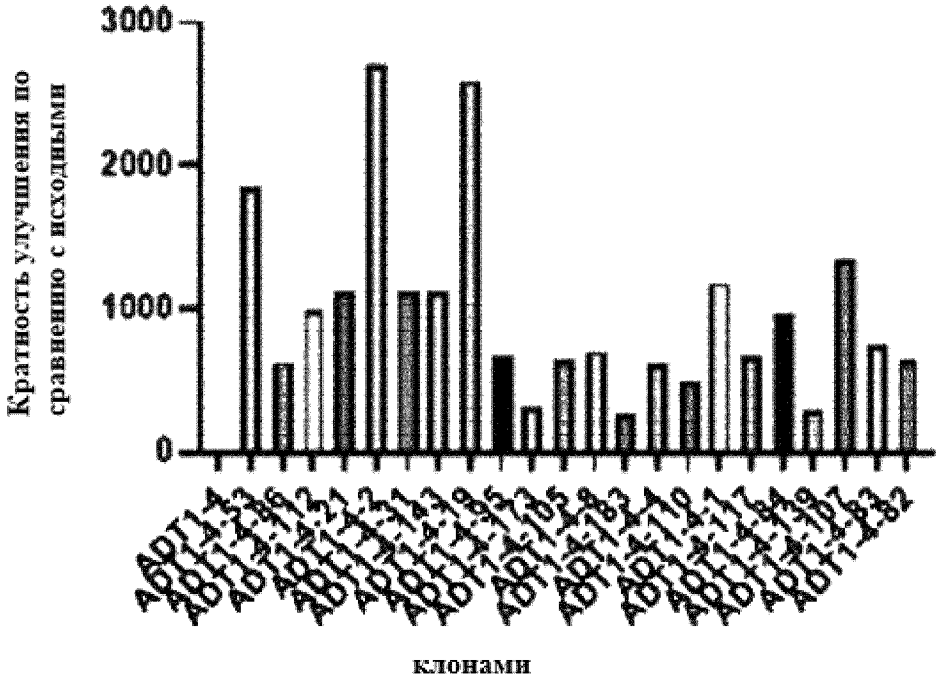

A
Кратность увеличения связывания рекомбинантного человеческого антигена vδ1
Кратность повышения по сравнению с исходным клоном
ADT1-7
ADT1-7-10
ADT1-7-15
ADT1-7-17
ADT1-7-18
ADT1-7-19
ADT1-7-20
ADT1-7-22
ADT1-7-23
ADT1-7-42
ADT1-7-3
ADT1-7-61
B
Кратность повышения MFI первичных vδ1
Кратность увеличения
2,0
1,5
1,0
0,5
C
Кратность повышения MFI линии vδ1 клеток PEER
Кратность увеличения
2,0
1,5
1,0
0,5

Фиг. 6



Фиг. 7A

Кратность улучшения связывания с антигеном яванского макака по сравнению с исходным ADT1-4

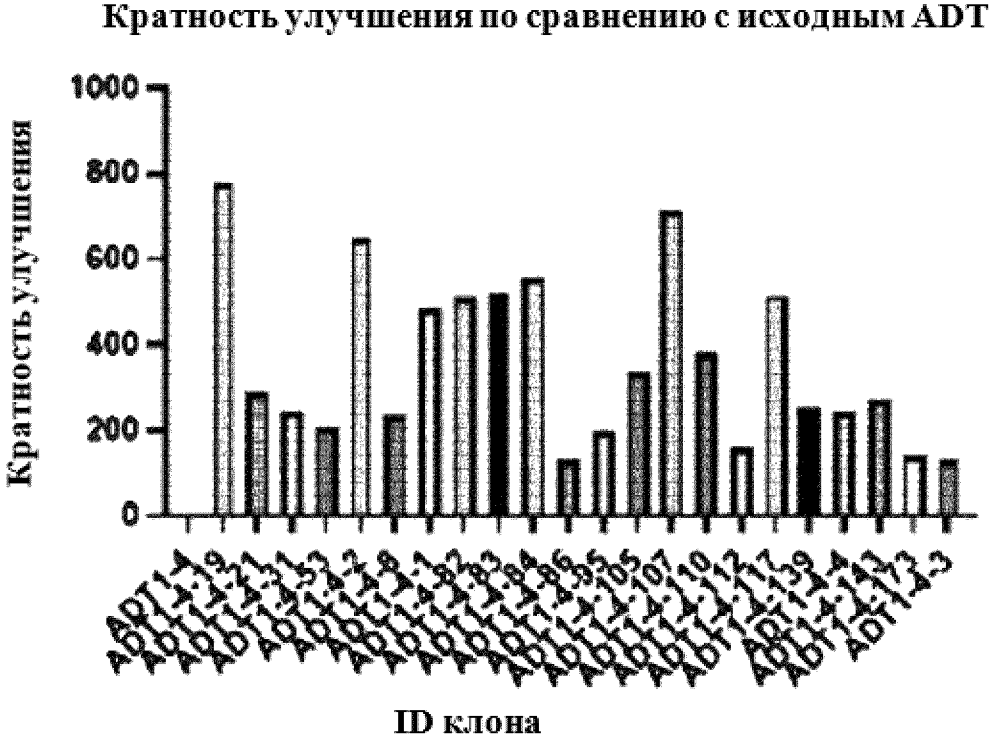


Фиг. 7B


Кратность улучшения связывания в ELISA
Кратность улучшения по сравнению с исходными
6
4
2
0
ADT1-7
ADT1-7-18
ADT1-7-42
ADT1-7-15
ADT1-7-10
ADT1-7-23
ADT1-7-17
ADT1-7-19
ADT1-7-22
ADT1-7-20
ADT1-7-3
ADT1-7-61
клонами

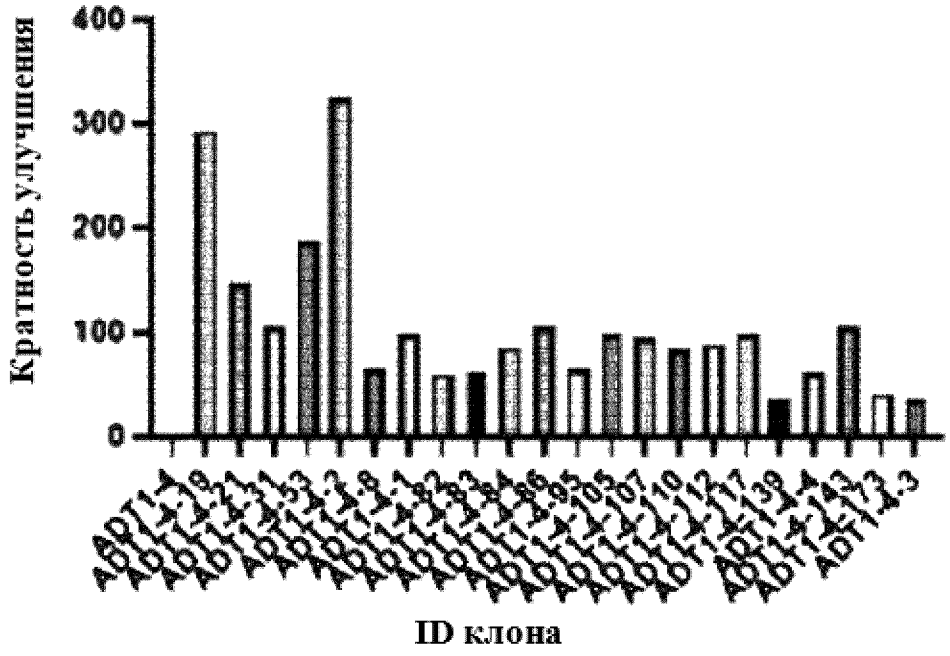
Фиг. 7C

KD для молекул человека



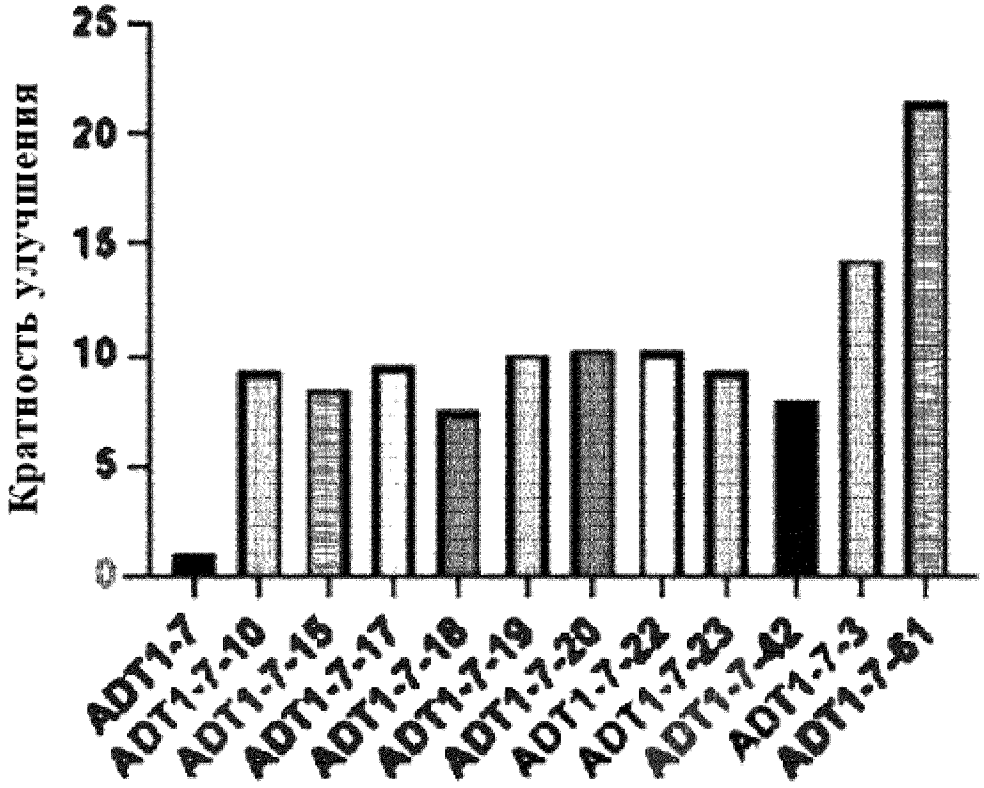
Фиг. 8A

KD для молекул яванского макака



Фиг. 8B

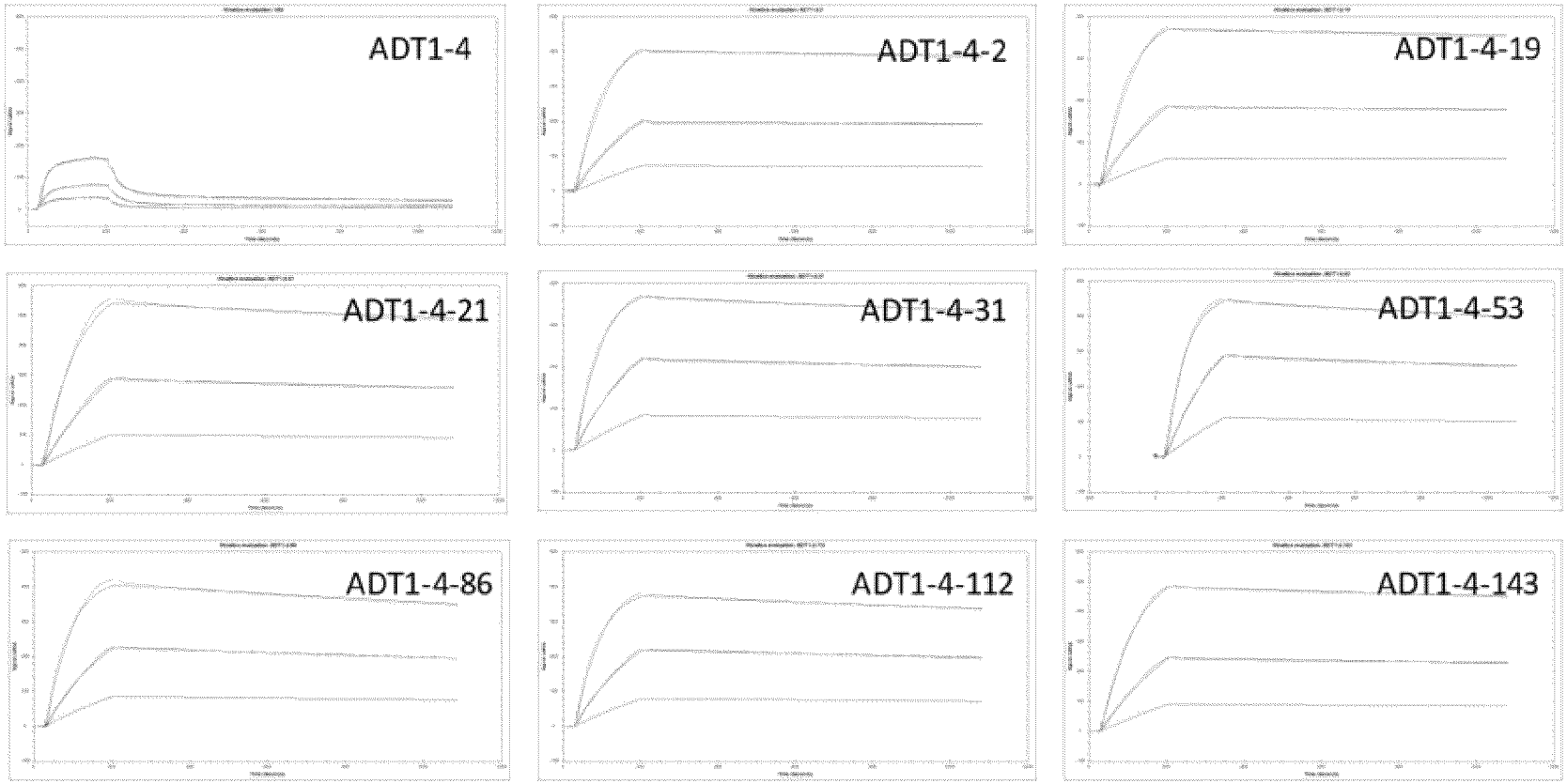
Кратность улучшения по сравнению с исходным ADT1-7



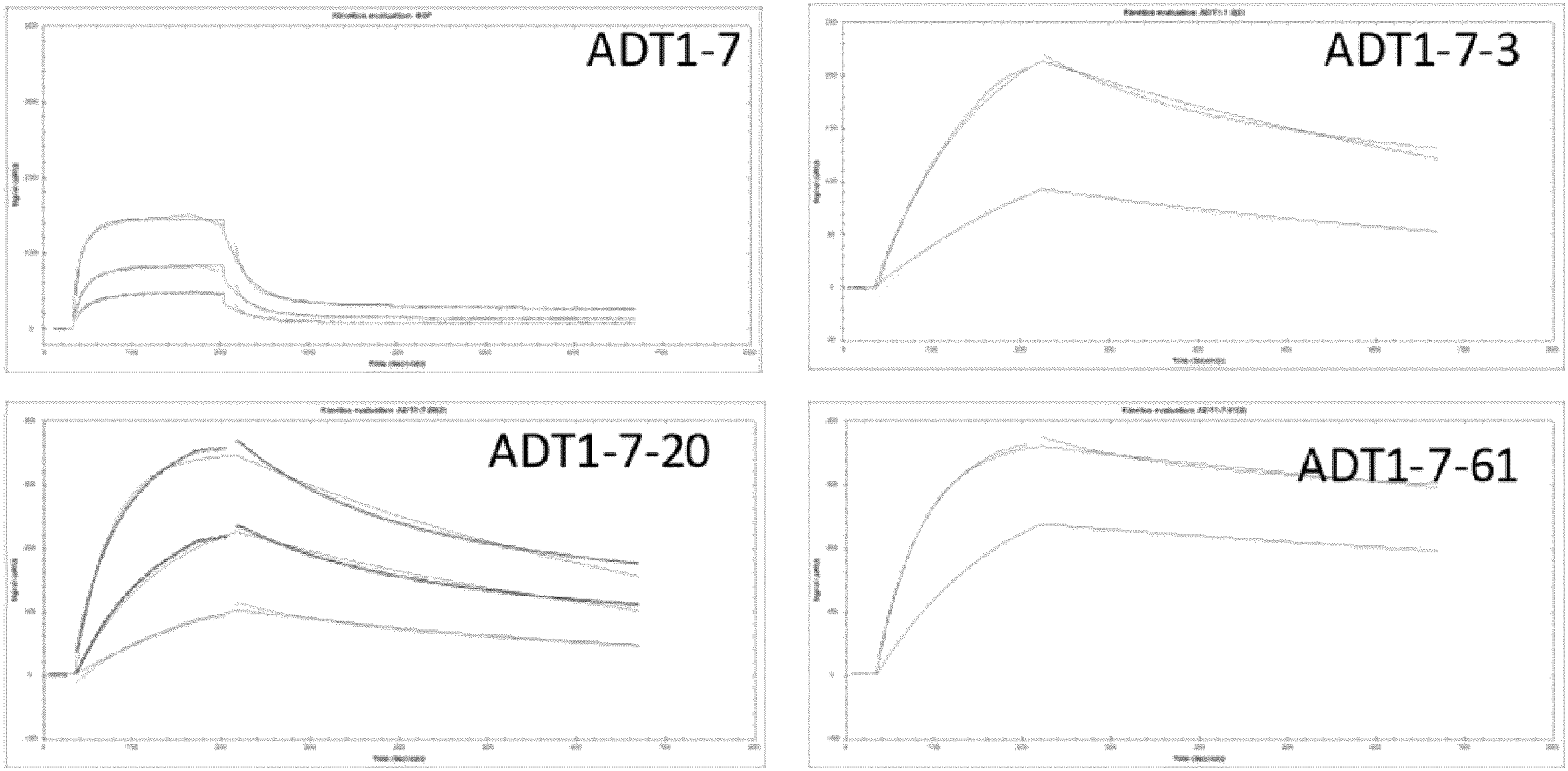
Фиг. 8C

Клоны: Аналит, производный ADT1-4: человеческий VD1

A



Фиг. 9A



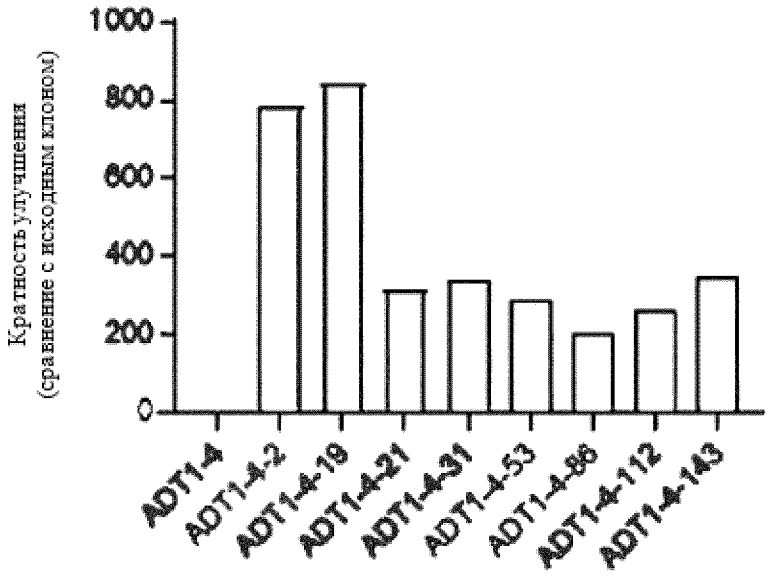
Фиг. 9B

Клон	Средняя KD (M)	Кратность изменения
ADT1-4	1,49E-07	1,00
ADT1-4-2	1,90E-10	784,21
ADT1-4-19	1,77E-10	841,81
ADT1-4-21	4,74E-10	314,35
ADT1-4-31	4,42E-10	337,49
ADT1-4-53	5,07E-10	294,18
ADT1-4-86	7,16E-10	208,25
ADT1-4-112	5,65E-10	263,95
ADT1-4-143	4,24E-10	351,42

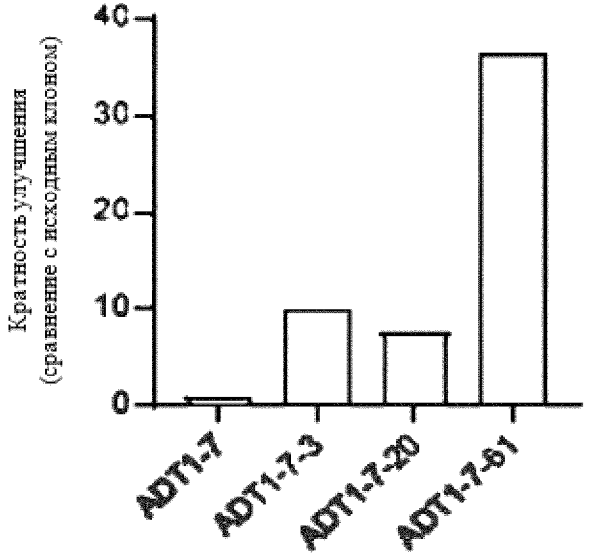
Фиг. 9C

Клон	Средняя KD (M)	Кратность изменения
ADT1-7	3,81E-08	1,00
ADT1-7-3	3,78E-09	10,07
ADT1-7-20	4,99E-09	7,63
ADT1-7-61	1,04E-09	36,62

Фиг. 9D

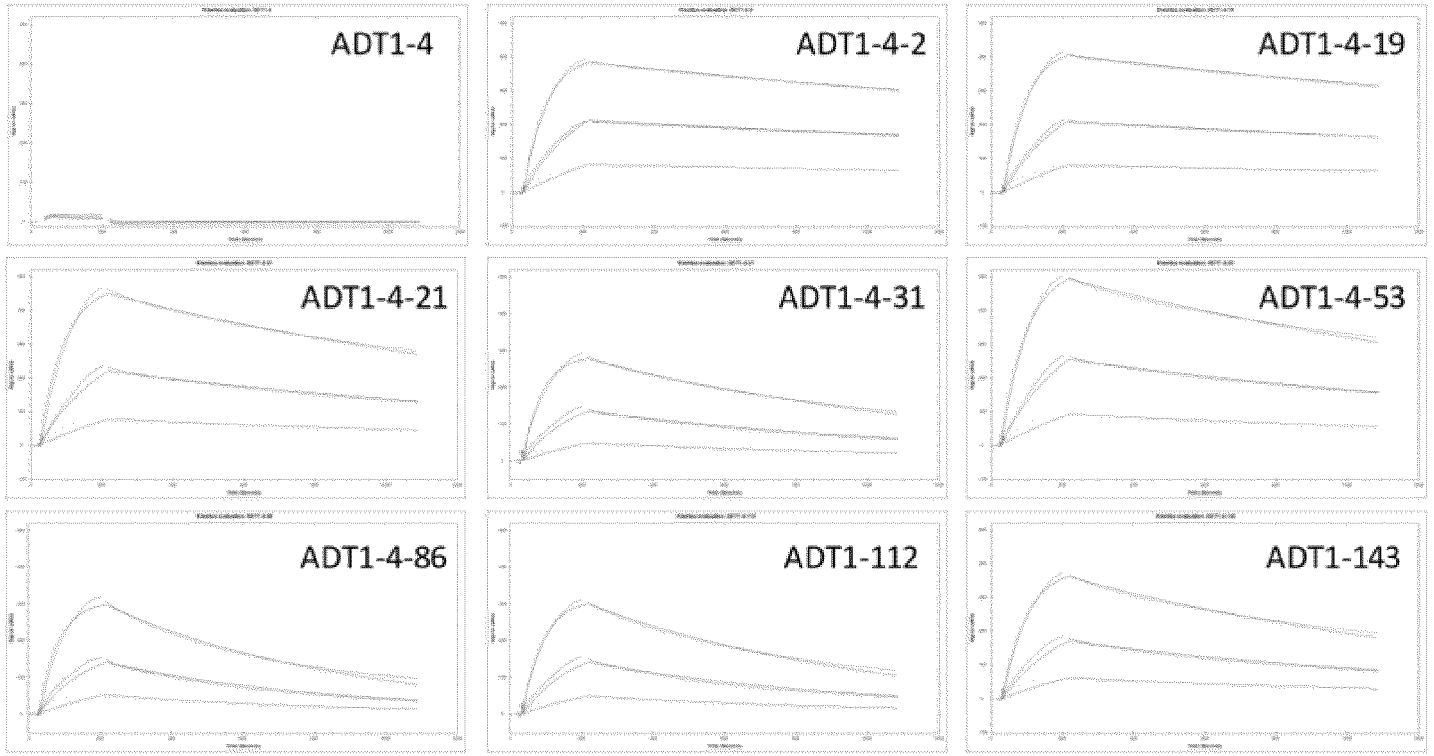


Фиг. 9E



Фиг. 9F

A

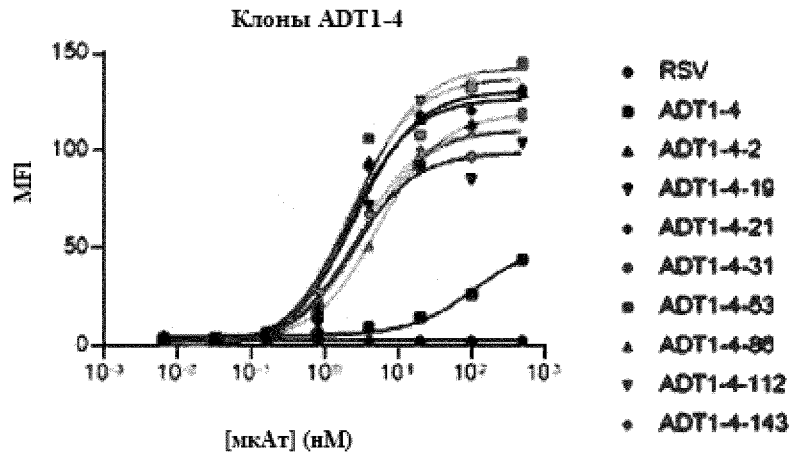


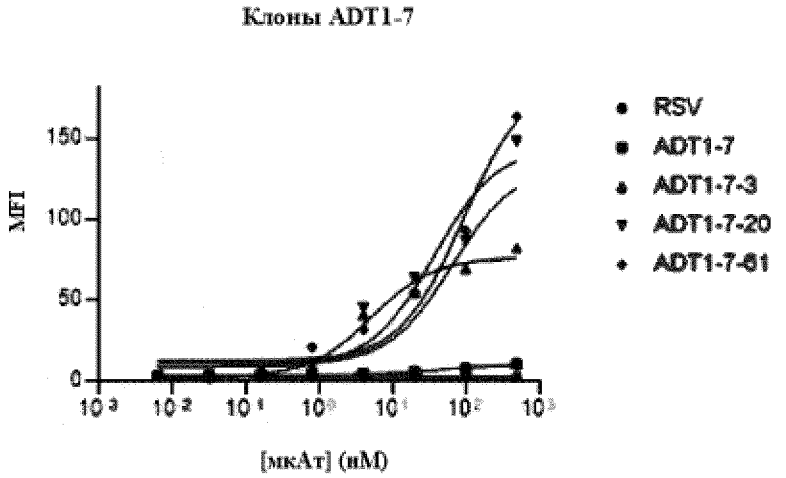
B

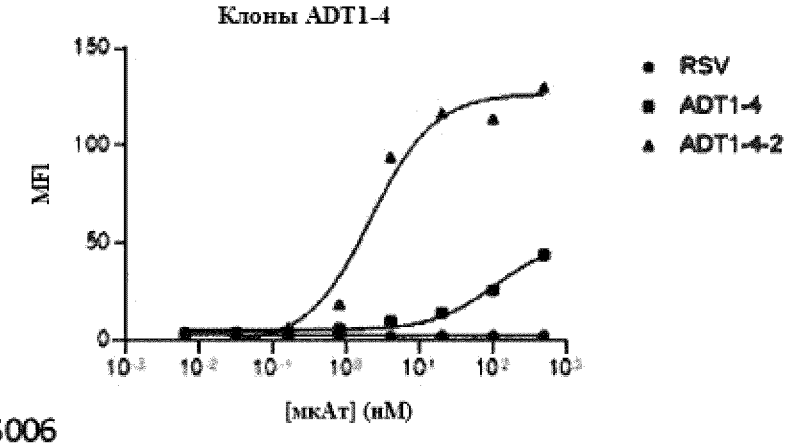
Клон	Средняя KD (M)
ADT1-4	Отсутствие связывания
ADT1-4-2	1,92E-09
ADT1-4-19	2,25E-09
ADT1-4-21	4,38E-09
ADT1-4-31	6,45E-09
ADT1-4-53	4,01E-09
ADT1-4-86	9,22E-09
ADT1-4-112	8,27E-09
ADT1-4-143	7,61E-09

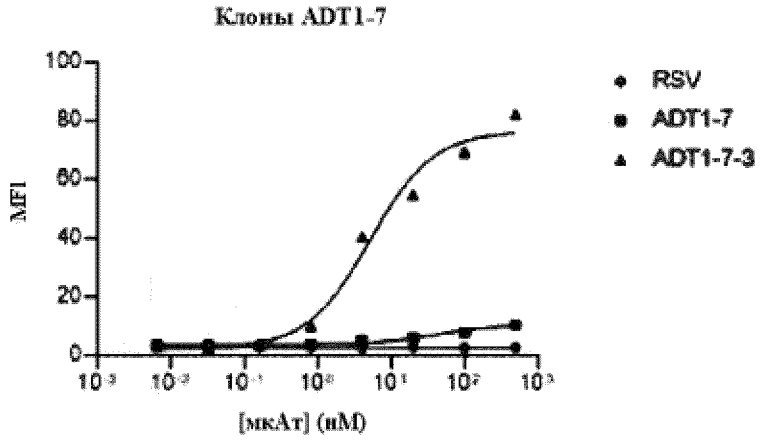
Фиг. 10

A





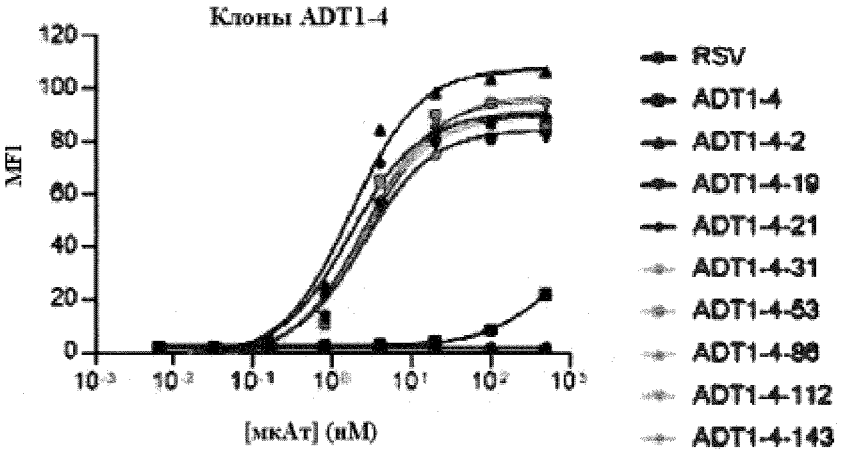


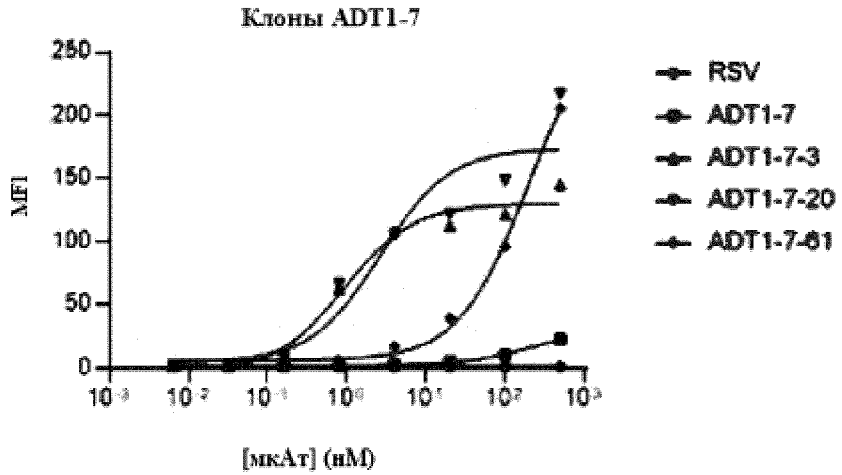


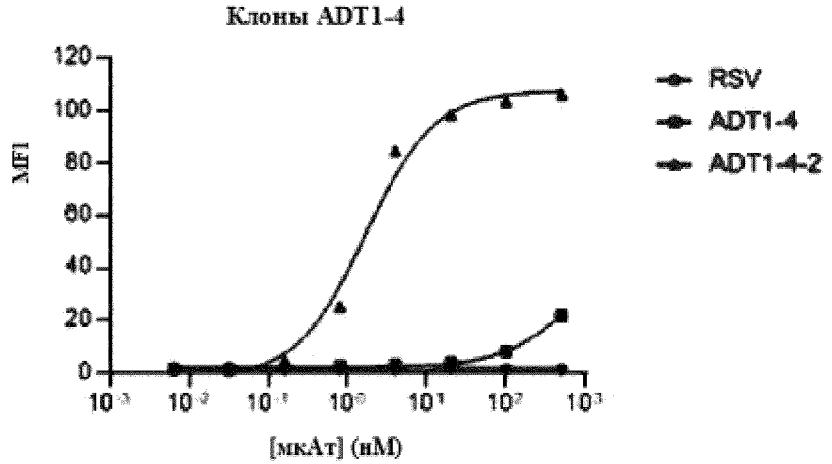
ATS006

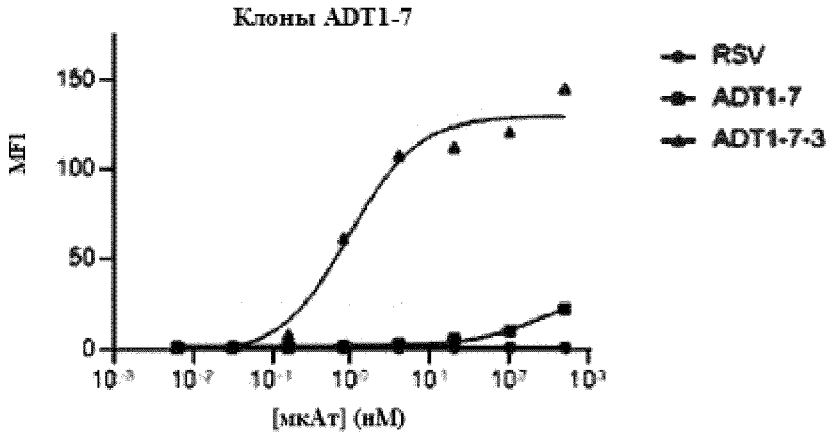
Фиг. 11A

B


Клоны ADT1-4
MFI
[мкАт] (нМ)
RSV
ADT1-4
ADT1-4-2
ADT1-4-19
ADT1-4-21
ADT1-4-31
ADT1-4-53
ADT1-4-86
ADT1-4-112
ADT1-4-143


Клоны ADT1-7
MFI
[мкАт] (нМ)
RSV
ADT1-7
ADT1-7-3
ADT1-7-20
ADT1-7-61


Клоны ADT1-4
MFI
[мкАт] (нМ)
RSV
ADT1-4
ADT1-4-2

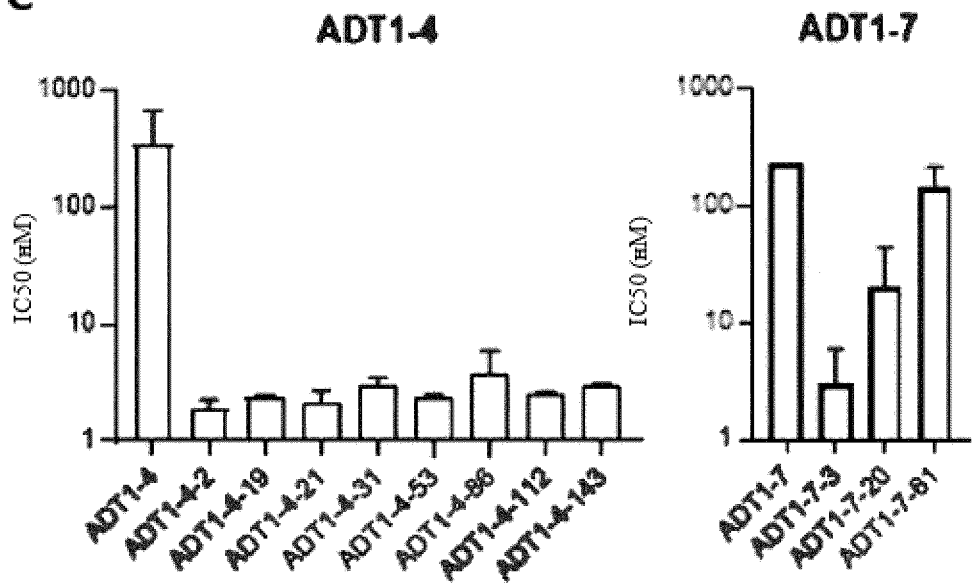

Клоны ADT1-7
MFI
[мкАт] (нМ)
RSV
ADT1-7
ADT1-7-3

Фиг. 11B

	ATS006		TS164	
мкАт	IC50	% улучшения IC50	IC50	% улучшения IC50
ADT1-4	107,7	0,00	575,9	0,00
ADT1-4-2	2,164	4876,89	1,703	33716,79
ADT1-4-19	2,375	4434,74	2,456	23348,70
ADT1-4-21	2,536	4146,85	1,675	34282,09
ADT1-4-31	3,33	3134,23	2,63	21797,34
ADT1-4-53	2,228	4733,93	2,456	23348,70
ADT1-4-86	5,357	1910,45	2,34	24511,11
ADT1-4-112	2,621	4009,12	2,436	23541,22
ADT1-4-143	2,819	3720,50	3,066	18683,43

	ATS006		TS164	
	IC50	% улучшения IC50	IC50	% улучшения IC50
ADT1-7	>100	0,00	225,6	0,00
ADT1-7-3	5,153	Н/П	0,9517	23604,95
ADT1-7-20	37,22	Н/П	2,684	8305,37
ADT1-7-61	93,01	Н/П	195,7	15,28

C



Фиг. 11C

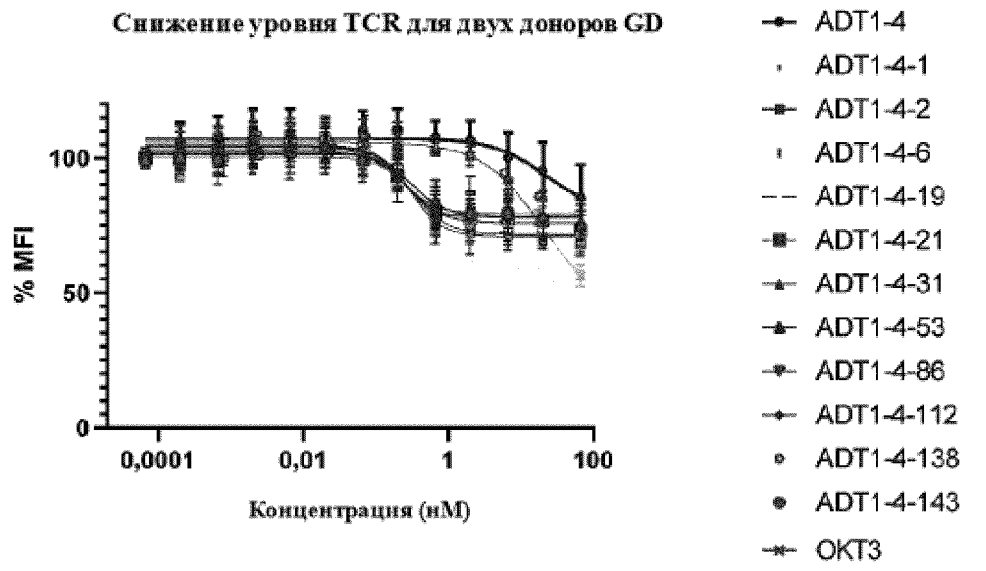
			IC50 (нМ)						
мкАт	Донор 1 (ATS006)	Донор 2 (TS164)	HEK293T	Raji	CD8 (PBMC)	CD4 (PBMC)	CD56 (PBMC)	CD19 (PBMC)	CD14 (PBMC)
ADT1-4	107,7	575,9	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-4-2	2,164	1,703	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-4-19	2,375	2,456	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-4-21	2,536	1,675	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-4-31	3,33	2,63	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-4-53	2,228	2,456	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-4-86	5,357	2,34	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-4-112	2,621	2,436	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-4-143	2,819	3,066	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания

			IC50 (нМ)						
мкАт	Донор 1 (ATS006)	Донор 2 (TS164)	HEK293T	Raji	CD8 (PBMC)	CD4 (PBMC)	CD56 (PBMC)	CD19 (PBMC)	CD14 (PBMC)
ADT1-7	>100	225,6	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-7-3	5,153	0,9517	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-7-20	37,22	2,684	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
ADT1-7-61	93,01	195,7	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания

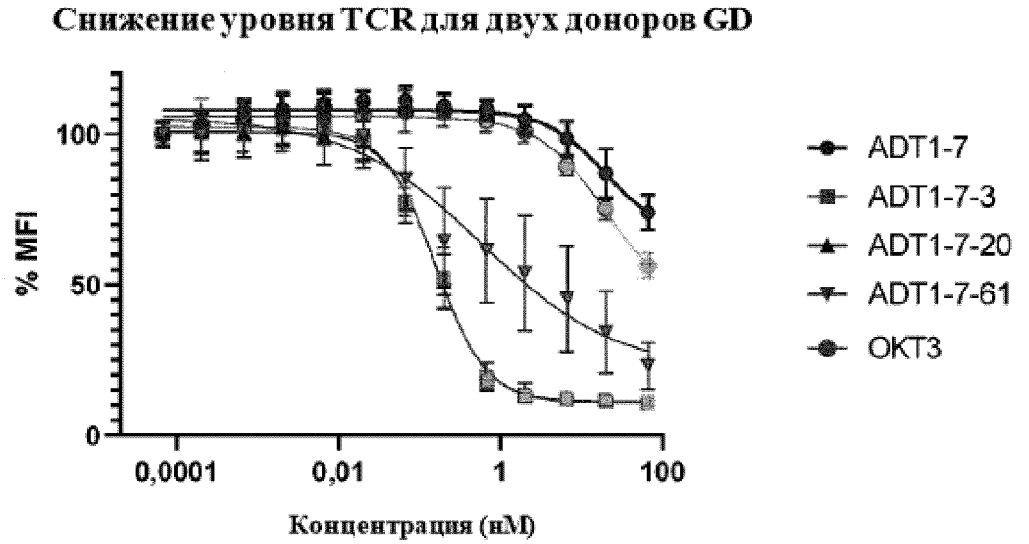
		IC50 (нМ)				
мкАт	Донор 1 (ATS006)	CD8 (PBMC)	CD4 (PBMC)	CD56 (PBMC)	CD19 (PBMC)	CD14 (PBMC)
0KT3	2,889	0,252	0,1906	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
RSV (контроль IgG)	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания

Фиг. 11D

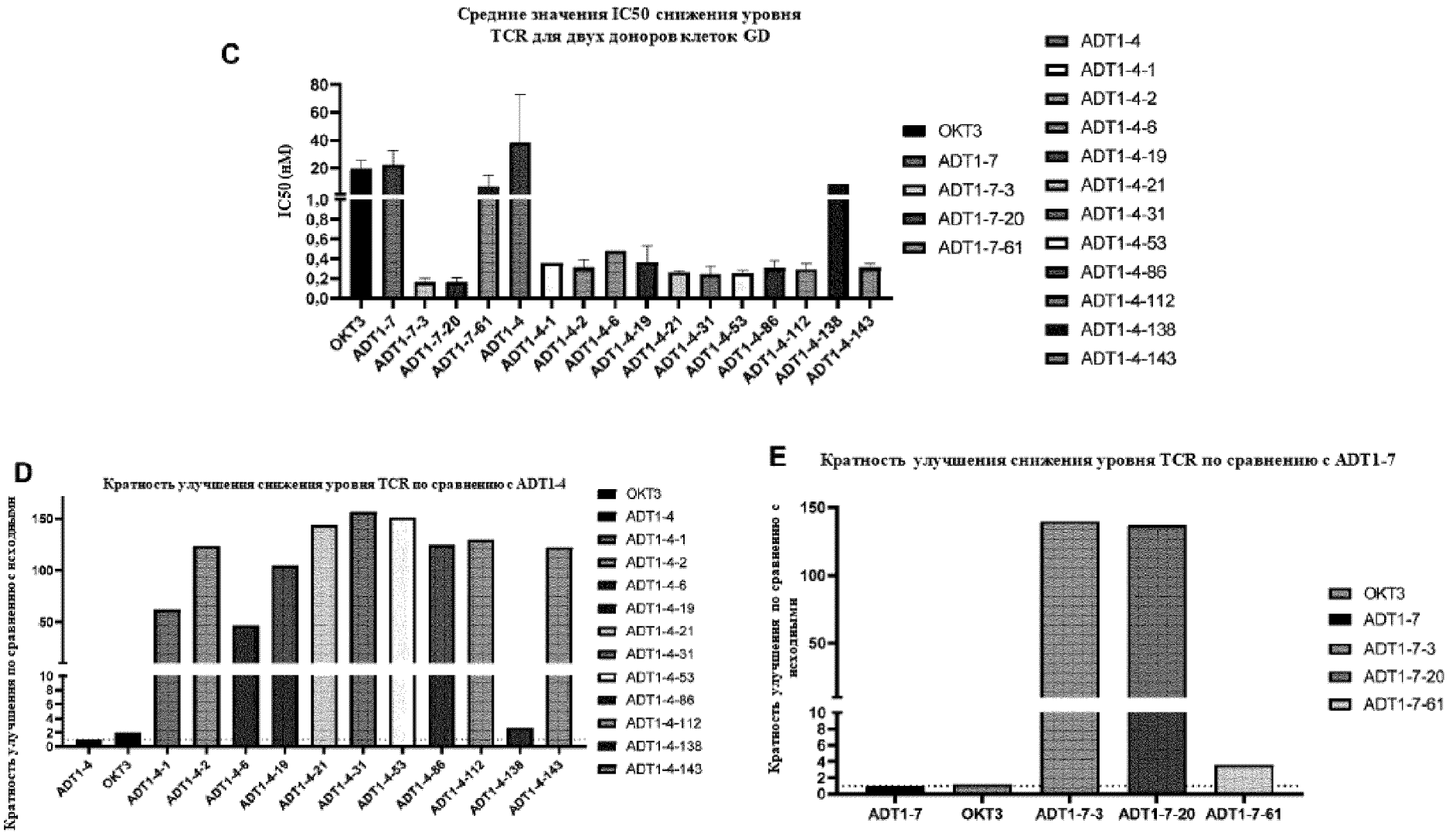
A


Снижение уровня TCR для двух доноров GD
% MFI
100
50
0
0,0001
0,01
1
100
Концентрация (нМ)
ADT1-4
ADT1-4-1
ADT1-4-2
ADT1-4-6
ADT1-4-19
ADT1-4-21
ADT1-4-31
ADT1-4-53
ADT1-4-86
ADT1-4-112
ADT1-4-138
ADT1-4-143
OKT3

B


Снижение уровня TCR для двух доноров GD
% MFI
100
50
0
0,0001
0,01
1
100
Концентрация (нМ)
ADT1-7
ADT1-7-3
ADT1-7-20
ADT1-7-61
OKT3

Фиг. 12



Фиг. 12, продолжение

F

	IC50	% улучшения IC50
ADT1-4	38,28	100
0KT3	19,43	197
ADT1-4-2	0,31	12348
ADT1-4-31	0,24	15630
ADT1-4-21	0,27	14372
ADT1-4-86	0,31	12472
ADT1-4-143	0,31	12219
ADT1-4-19	0,37	10420
ADT1-4-53	0,25	15090
ADT1-4-112	0,30	12964
ADT1-4-1	0,36	6185
ADT1-4-6	0,48	4648
ADT1-4-138	8,38	266

	IC50	% улучшения IC50
ADT1-7	22,42	100
0KT3	19,43	115
ADT1-7-3	0,16	13968
ADT1-7-20	0,16	13697
ADT1-7-61	6,26	358

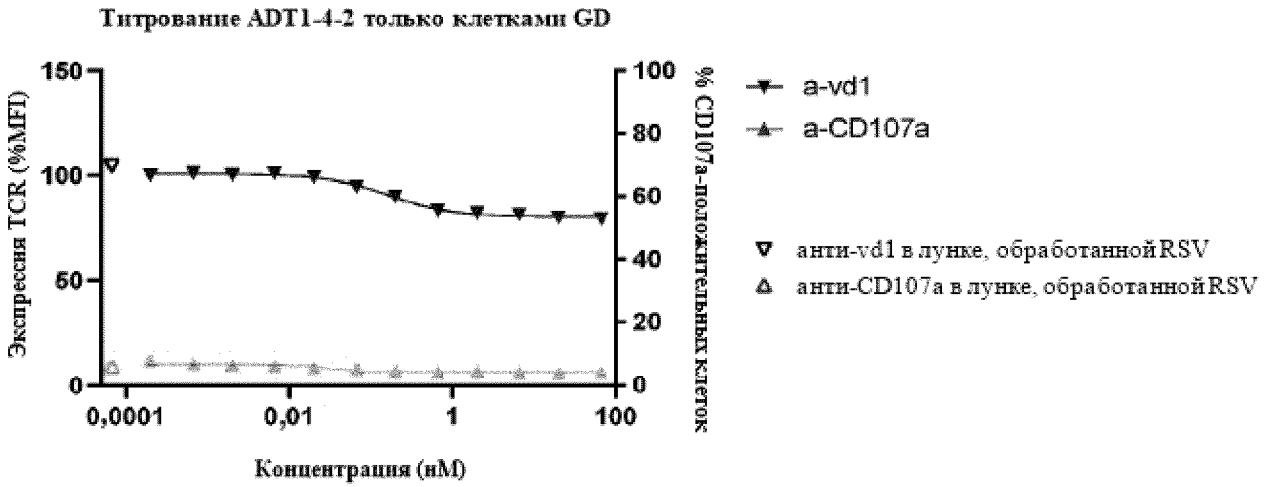
G

	IC50	Кратность улучшения IC50
ADT1-4	38,28	1
0KT3	19,43	2
ADT1-4-1	0,36	62
ADT1-4-2	0,31	123
ADT1-4-6	0,48	46
ADT1-4-19	0,37	104
ADT1-4-21	0,27	144
ADT1-4-31	0,24	156
ADT1-4-53	0,25	151
ADT1-4-86	0,31	125
ADT1-4-112	0,30	130
ADT1-4-138	8,38	3
ADT1-4-143	0,31	122

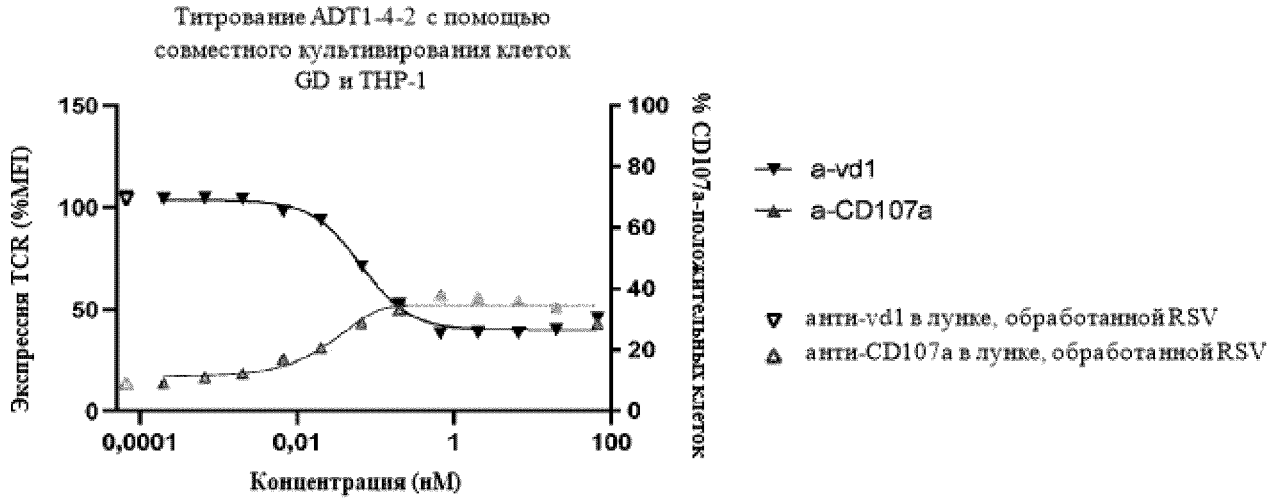
	IC50	Кратность улучшения IC50
ADT1-7	22,42	1
0KT3	19,43	1
ADT1-7-3	0,16	140
ADT1-7-20	0,16	137
ADT1-7-61	6,26	4

Фиг. 12, продолжение

A

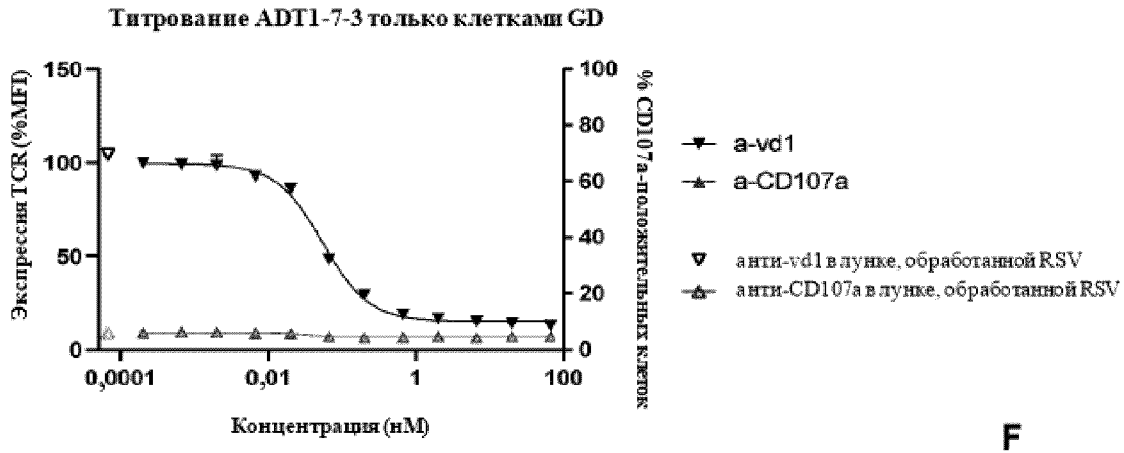

Титрование ADT1-4-2 только клетками GD
Экспрессия TCR (%MFI)
% CD107a-положительных клеток
150
100
50
0
100
80
60
40
20
0
0,0001
0,01
1
100
Концентрация (нМ)
a-vd1
a-CD107a
анти-vd1 в лунке, обработанной RSV
анти-CD107a в лунке, обработанной RSV

B


Титрование ADT1-4-2 с помощью совместного культивирования клеток GD и THP-1
Экспрессия TCR (%MFI)
% CD107a-положительных клеток
150
100
50
0
100
80
60
40
20
0
0,0001
0,01
1
100
Концентрация (нМ)
a-vd1
a-CD107a
анти-vd1 в лунке, обработанной RSV
анти-CD107a в лунке, обработанной RSV

Фиг. 13

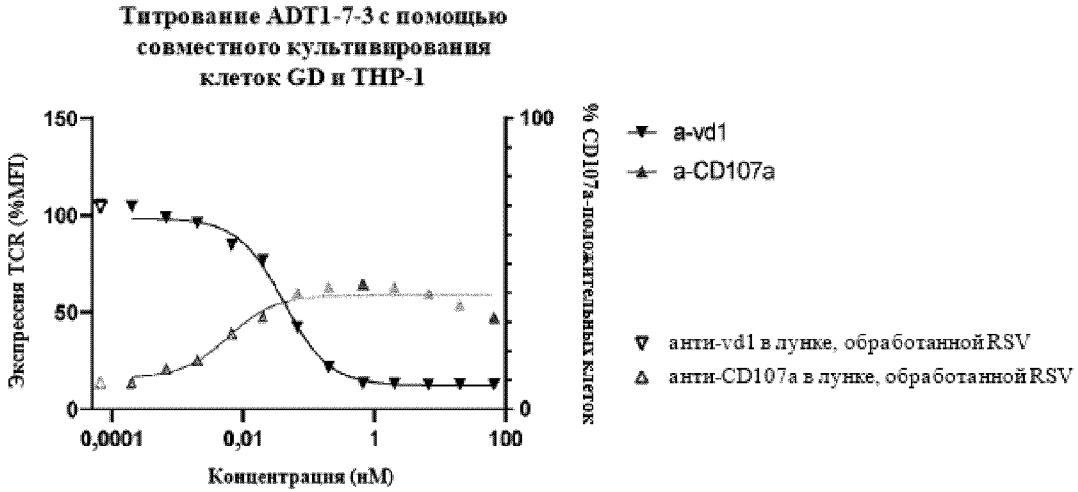
C



E

	% увеличения CD107a-положительных клеток
ADT1-4-2	24,705
ADT1-7-3	26,7

D

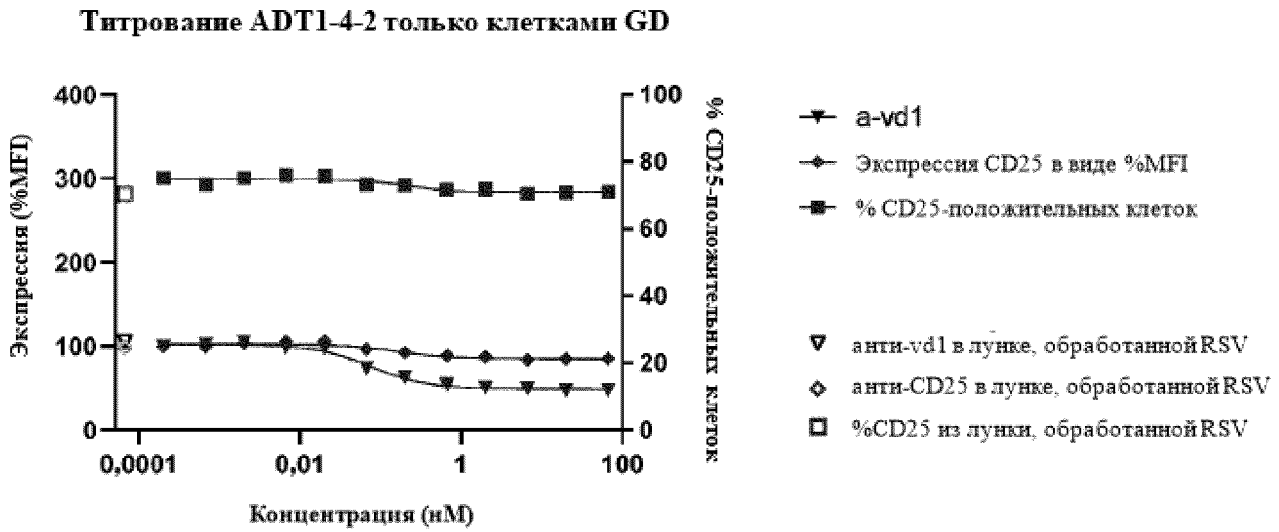


F

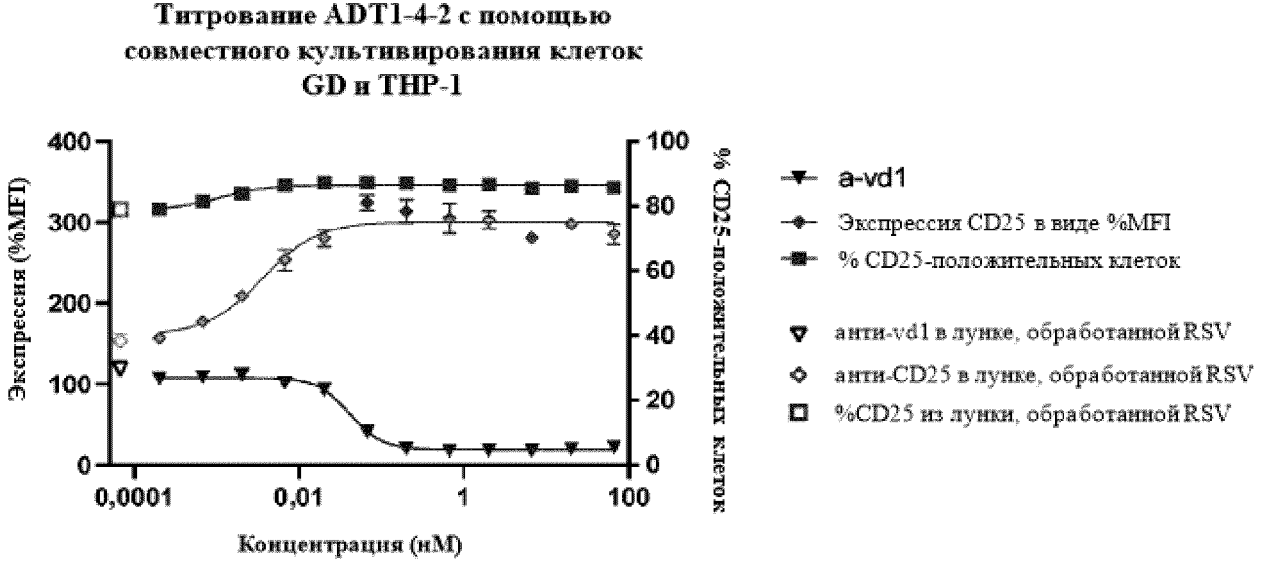
Условие	мкАт	% максимального увеличения CD107a-положительных клеток
GD	ADT1-4-2	-3,73
GD	ADT1-7-3	-1,28
GD + THP-1	ADT1-4-2	19,53
GD + THP-1	ADT1-7-3	22,3

Фиг. 13, продолжение

A

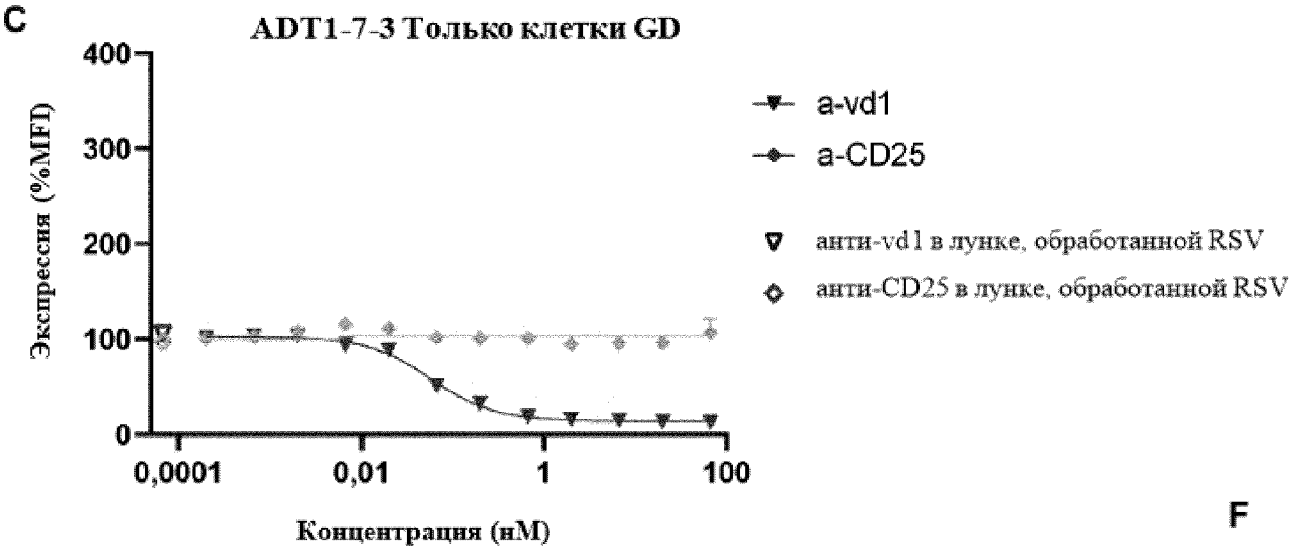

Титрование ADT1-4-2 только клетками GD
Экспрессия (%MFI)
% CD25-положительных клеток
Концентрация (нМ)
0,0001
0,01
1
100
a-vd1
Экспрессия CD25 в виде %MFI
% CD25-положительных клеток
анти-vd1 в лунке, обработанной RSV
анти-CD25 в лунке, обработанной RSV
%CD25 из лунки, обработанной RSV

B


Титрование ADT1-4-2 с помощью совместного культивирования клеток GD и THP-1
Экспрессия (%MFI)
% CD25-положительных клеток
Концентрация (нМ)
0,0001
0,01
1
100
a-vd1
Экспрессия CD25 в виде %MFI
% CD25-положительных клеток
анти-vd1 в лунке, обработанной RSV
анти-CD25 в лунке, обработанной RSV
%CD25 из лунки, обработанной RSV

Фиг. 14

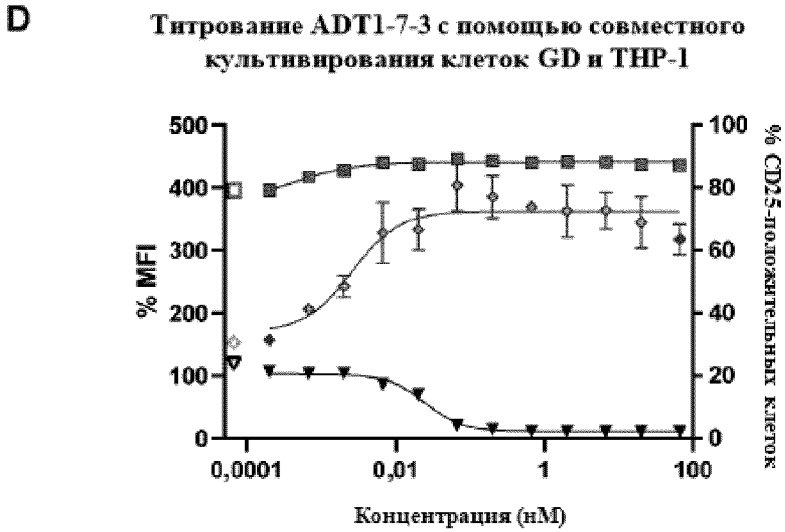
C



E

	% увеличения экспрессии CD25
ADT1-4-2	170,1
ADT1-7-3	220,9

D

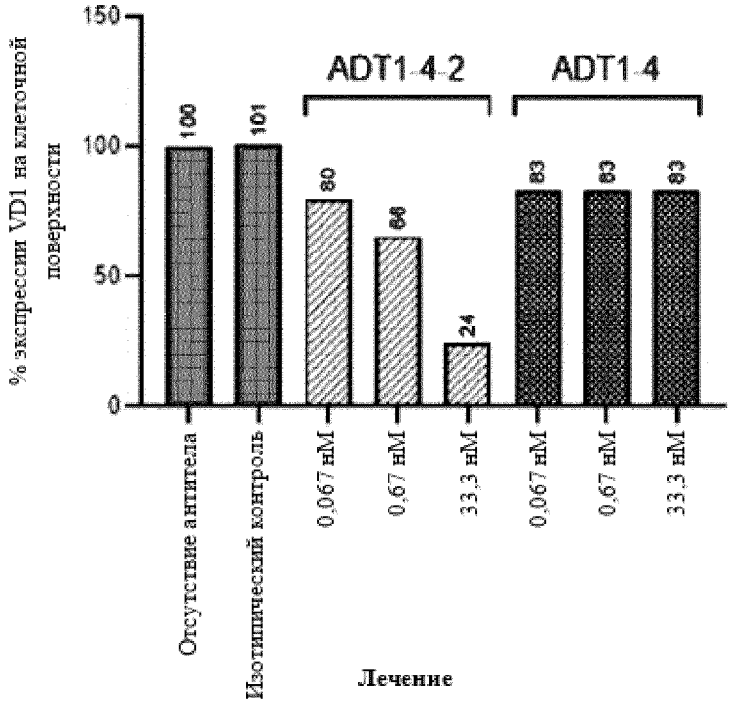


F

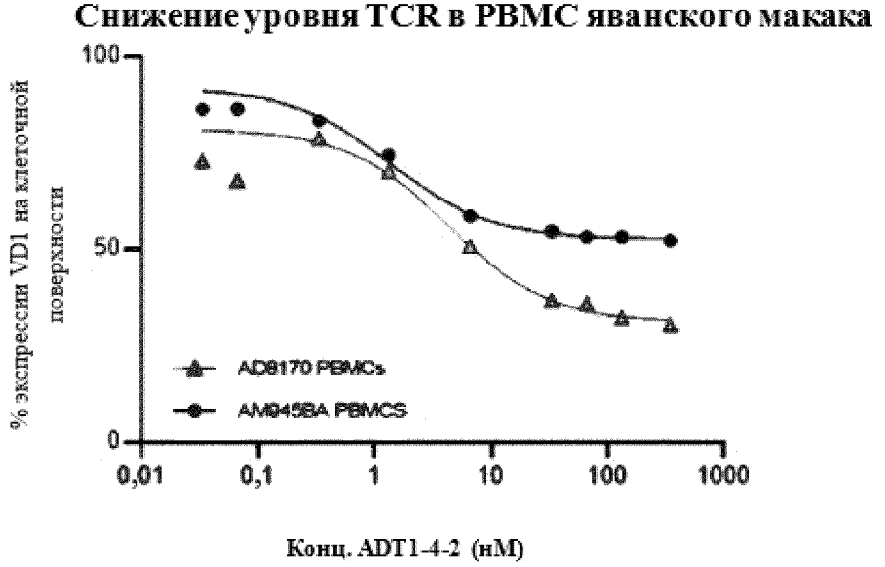
Условие	мкАт	% максимального увеличения экспрессии CD25
GD	ADT1-4-2	-15,23
GD + THP-1	ADT1-4-2	116,8
GD	ADT1-7-3	3,84
GD + THP-1	ADT1-7-3	162,2

Фиг. 14, продолжение

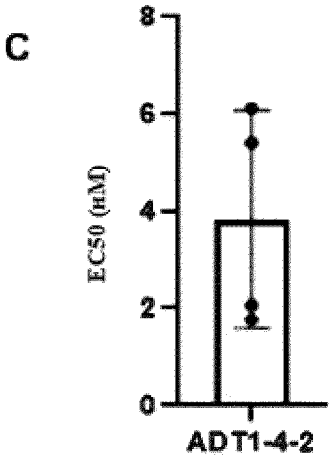
A


% экспрессии VD1 на клеточной поверхности
150
100
50
0
ADT1-4-2
ADT1-4
100
101
80
66
24
83
83
83
Отсутствие антитела
Изотипический контроль
0,067 нМ
0,67 нМ
33,3 нМ
0,067 нМ
0,67 нМ
33,3 нМ
Лечение

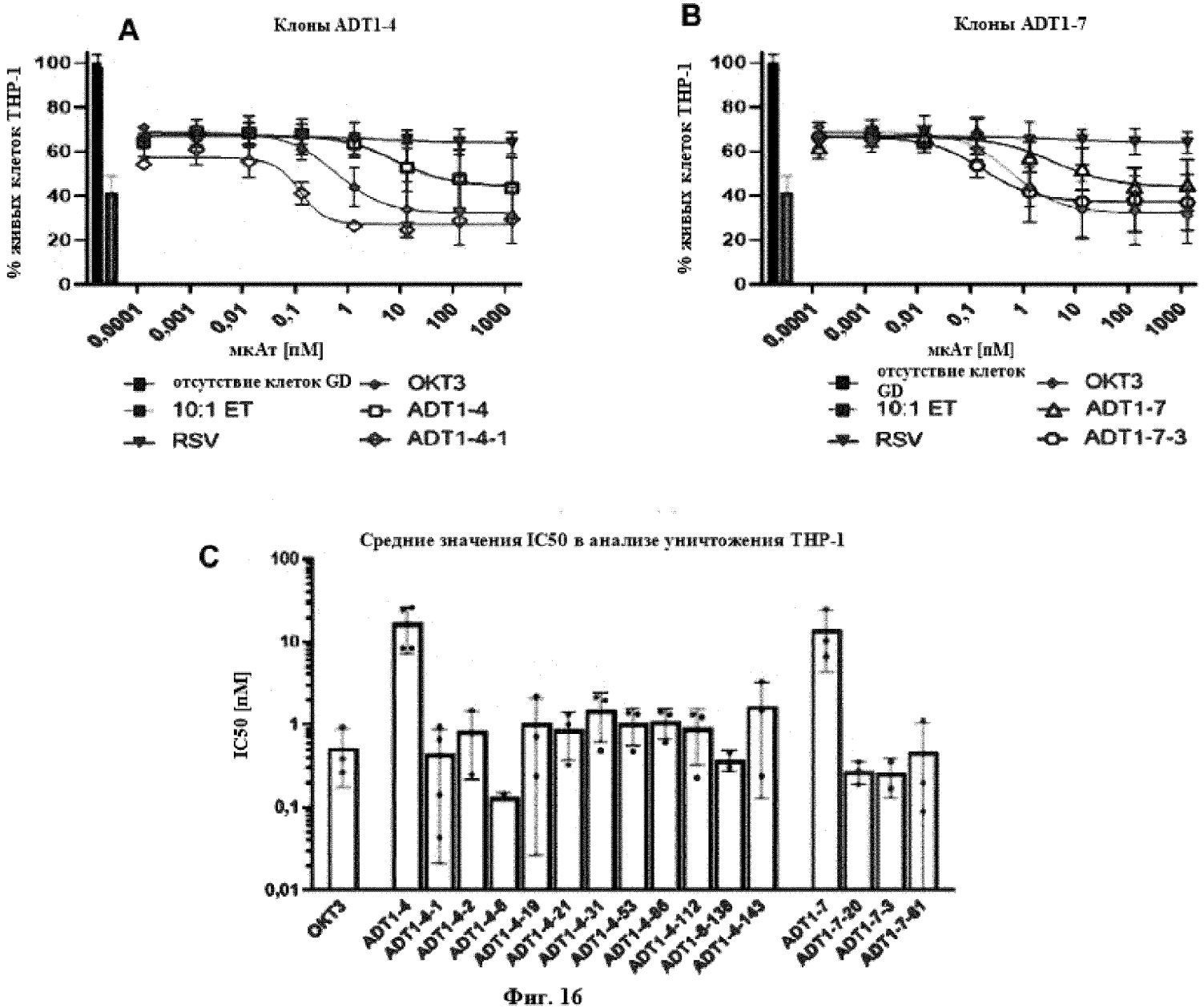
B


Снижение уровня TCR в PBMC яванского макака
% экспрессии VD1 на клеточной поверхности
100
50
0
AD8170 PBMCs
AM945BA PBMCS
0,01
0,1
1
10
100
1000
Конц. ADT1-4-2 (нМ)

C


8
6
4
2
0
EC50 (нМ)
ADT1-4-2

Фиг. 15

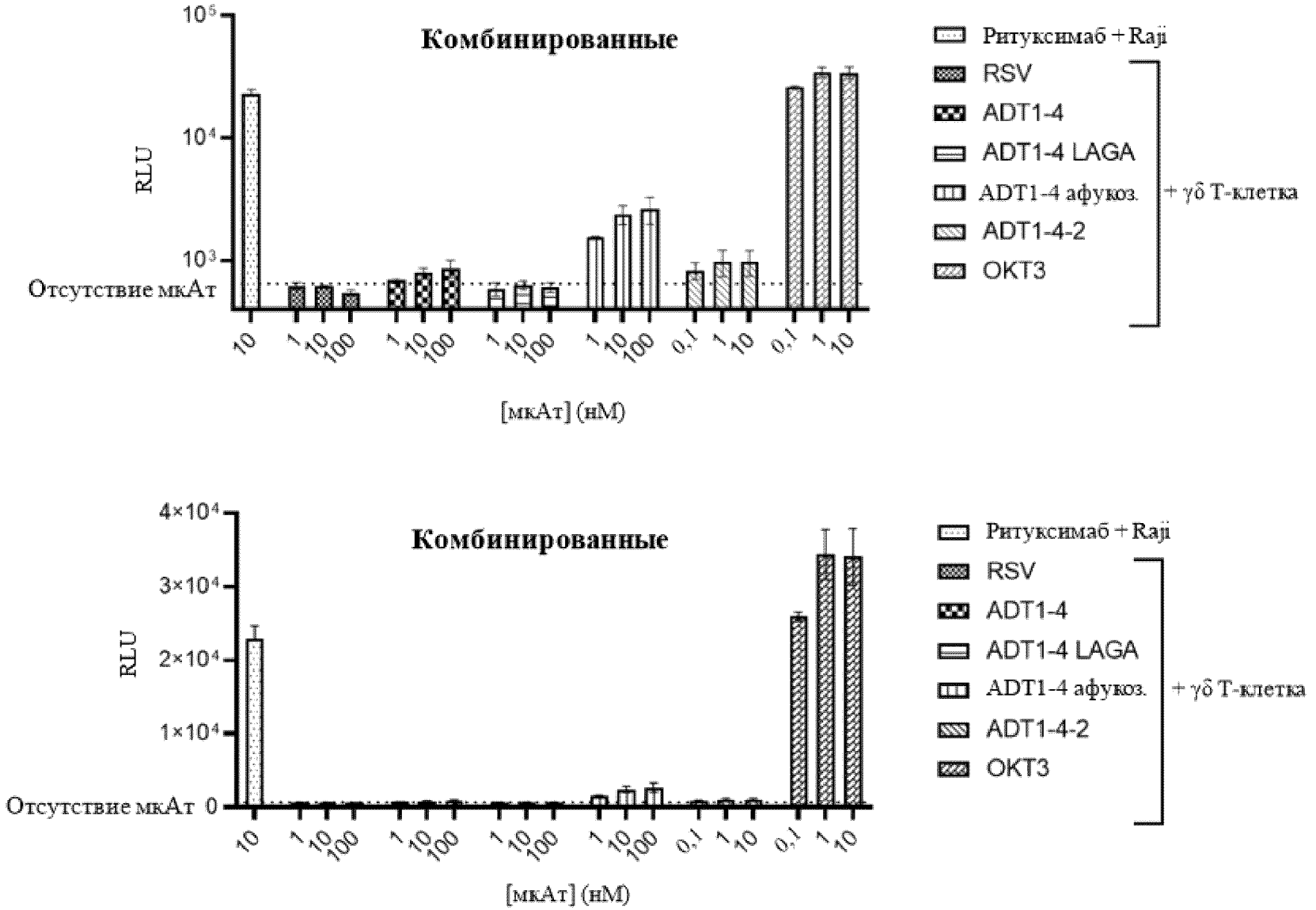

A
Клоны ADT1-4
% живых клеток THP-1
100
80
60
40
20
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
мкАт [nM]
отсутствие клеток GD
10:1 ET
RSV
OKT3
ADT1-4
ADT1-4-1
B
Клоны ADT1-7
% живых клеток THP-1
мкАт [nM]
отсутствие клеток GD
10:1 ET
RSV
OKT3
ADT1-7
ADT1-7-3
C
Средние значения IC50 в анализе уничтожения THP-1
IC50 [nM]
100
10
1
0,1
0,01
OKT3
ADT1-4
ADT1-4-1
ADT1-4-2
ADT1-4-8
ADT1-4-19
ADT1-4-21
ADT1-4-31
ADT1-4-53
ADT1-4-86
ADT1-4-112
ADT1-4-138
ADT1-4-143
ADT1-7
ADT1-7-20
ADT1-7-3
ADT1-7-61

Фиг. 16

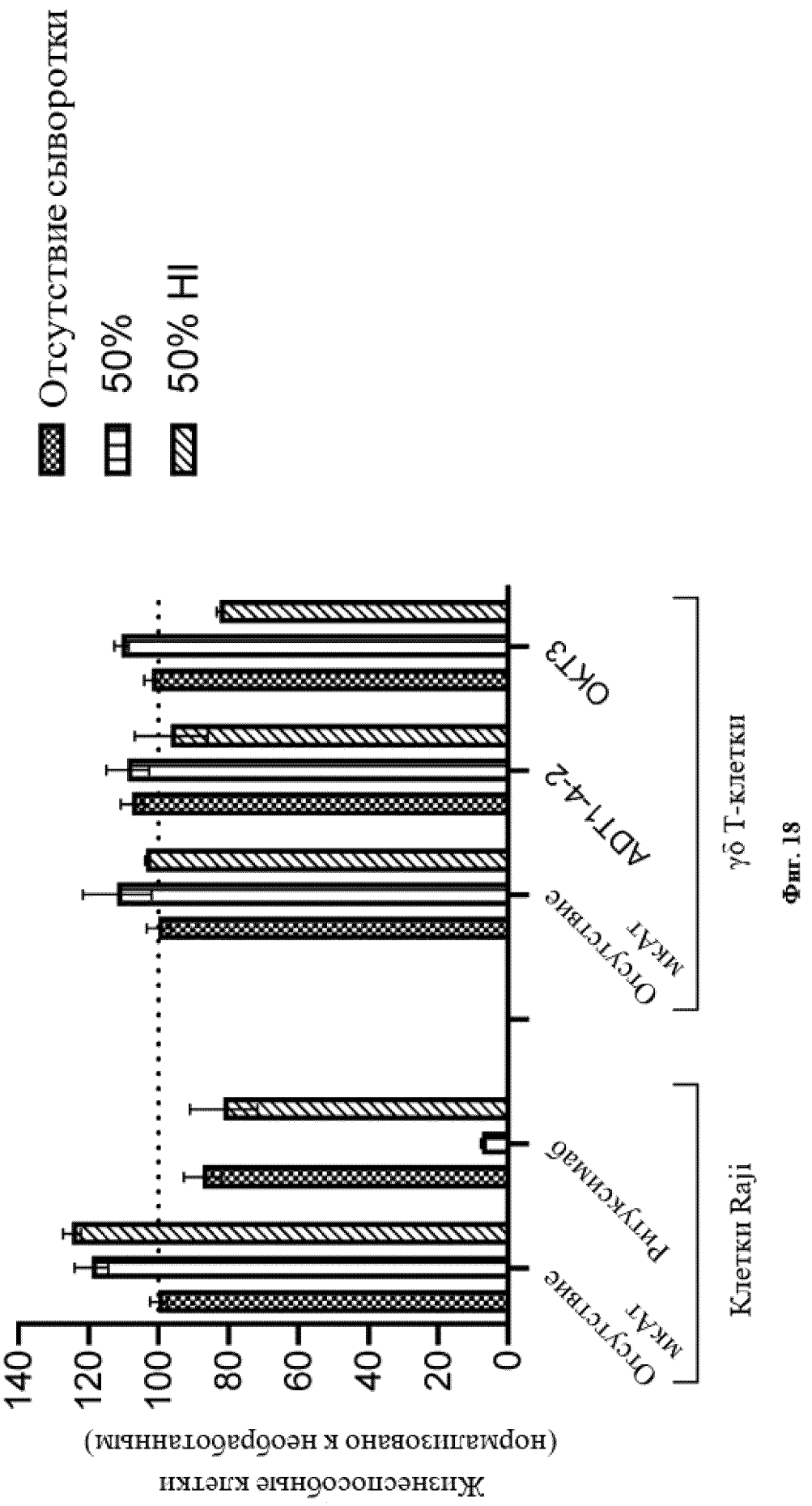
D

ID клона	EC50 [nM] для анализ уничтожения THP-1 (среднее значение для >3 доноров)	Стандартное отклонение	Кратность улучшения	% улучшения по сравнению с исходным клоном
OKT3 (анти-CD3)	3,53	2,40		
ADT1-4	121,47	136,80	1,0	100%
ADT1-4-1	3,00	2,87	40,5	4049%
ADT1-4-2	6,33	3,67	19,2	1918%
ADT1-4-6	0,93	0,07	130,1	13014%
ADT1-4-19	8,33	6,13	14,6	1458%
ADT1-4-21	6,13	2,93	19,8	1980%
ADT1-4-31	10,93	4,73	11,1	1111%
ADT1-4-53	7,40	3,13	16,4	1641%
ADT1-4-86	7,60	2,87	16,0	1598%
ADT1-4-112	6,47	3,53	18,8	1878%
ADT1-6-138	2,53	0,73	47,9	4795%
ADT1-4-143	13,07	9,27	9,3	930%
ADT1-7	65,20	54,80	1,0	100%
ADT1-7-20	1,87	0,53	34,9	3493%
ADT1-7-3	1,33	0,87	48,9	4890%
ADT1-7-61	3,60	3,60	18,1	1811%

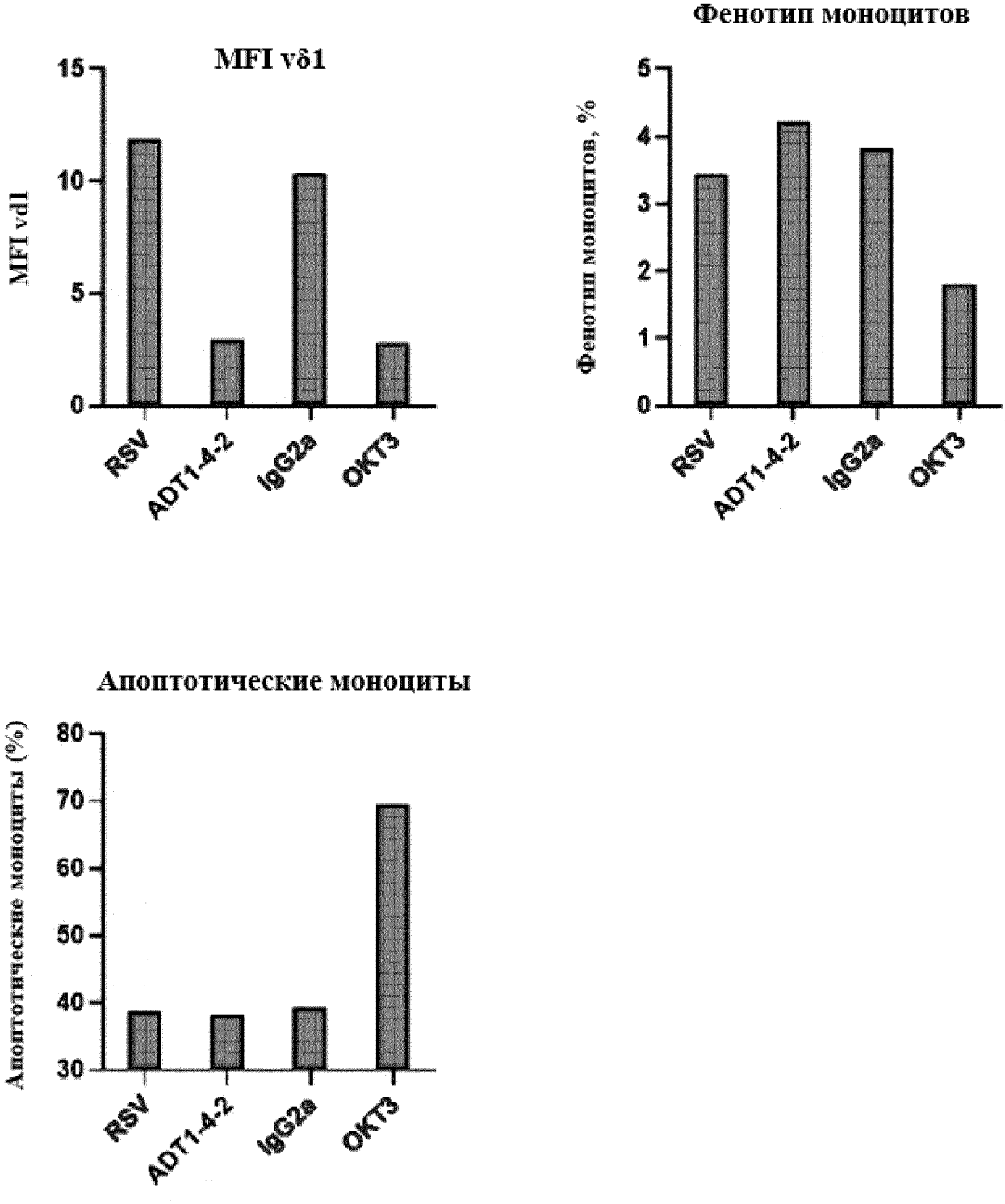
Фиг. 16, продолжение


Комбинированные
RLU
Отсутствие мкАт
[мкАт] (нМ)
Ритуксимаб + Raji
RSV
ADT1-4
ADT1-4 LAGA
ADT1-4 афукоз.
ADT1-4-2
OKT3
+ γδ Т-клетка

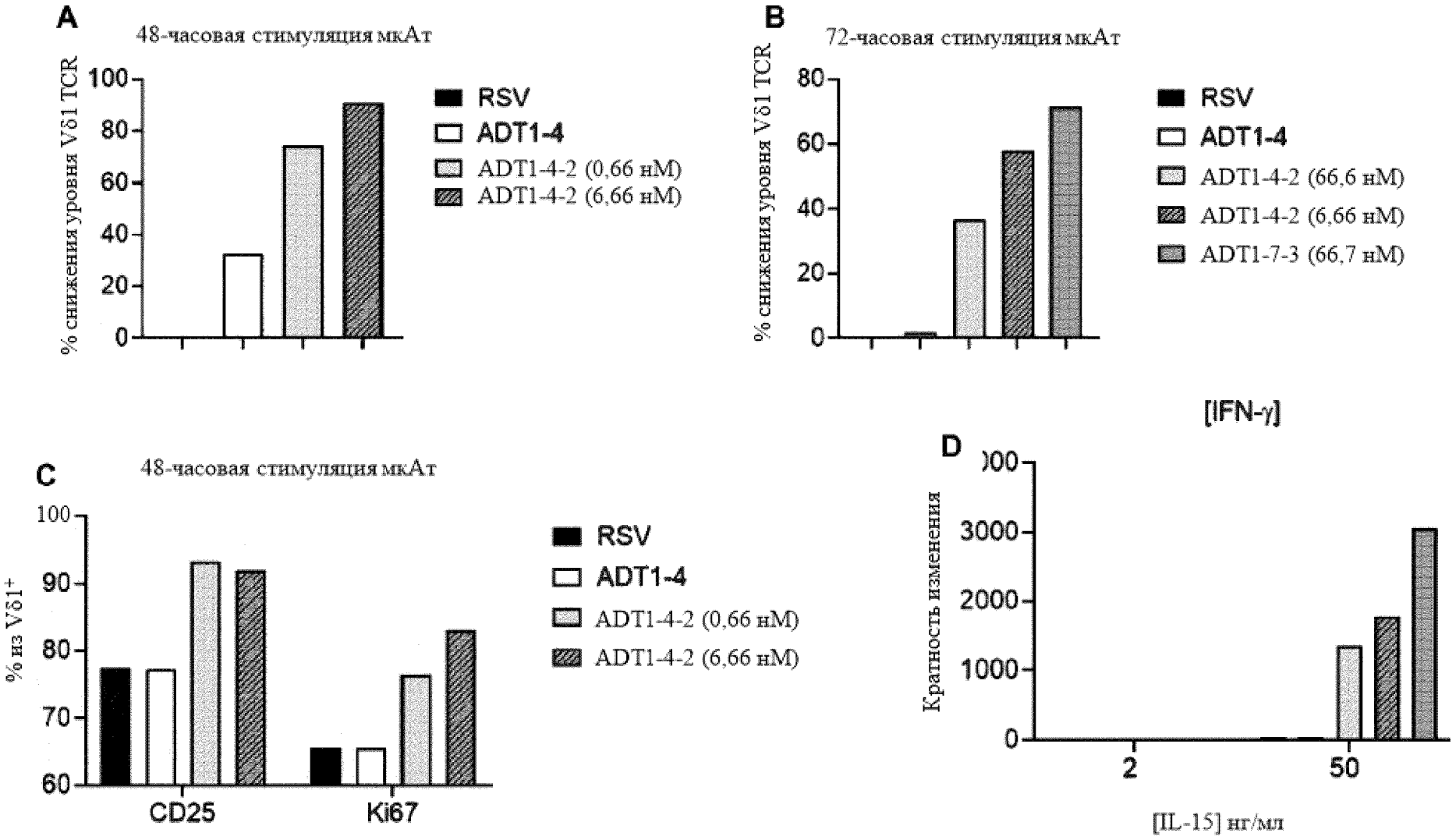
Фиг. 17


Отсутствие сыворотки
50%
50% HI
Жизнеспособные клетки
(нормализовано к необработанным)
140
120
100
80
60
40
20
0
Отсутствие мкАт
Рituximab
Отсутствие мкАт
Клетки Raji
OKT3
ADT1-A-2
γδ Т-клетки

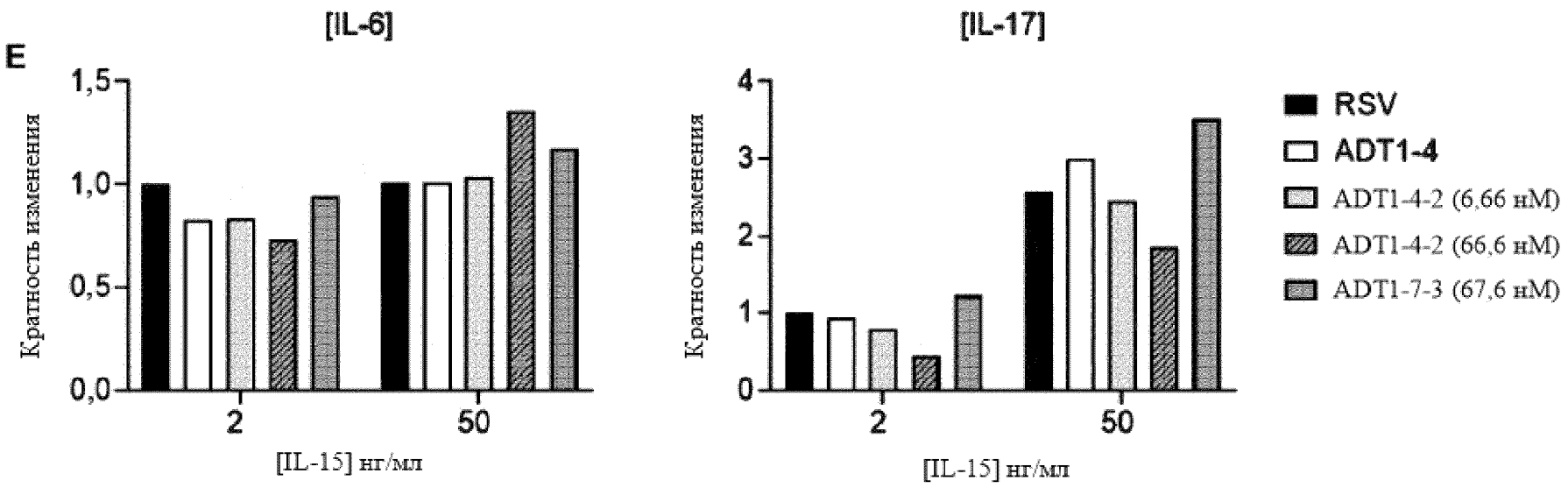
Фиг. 18

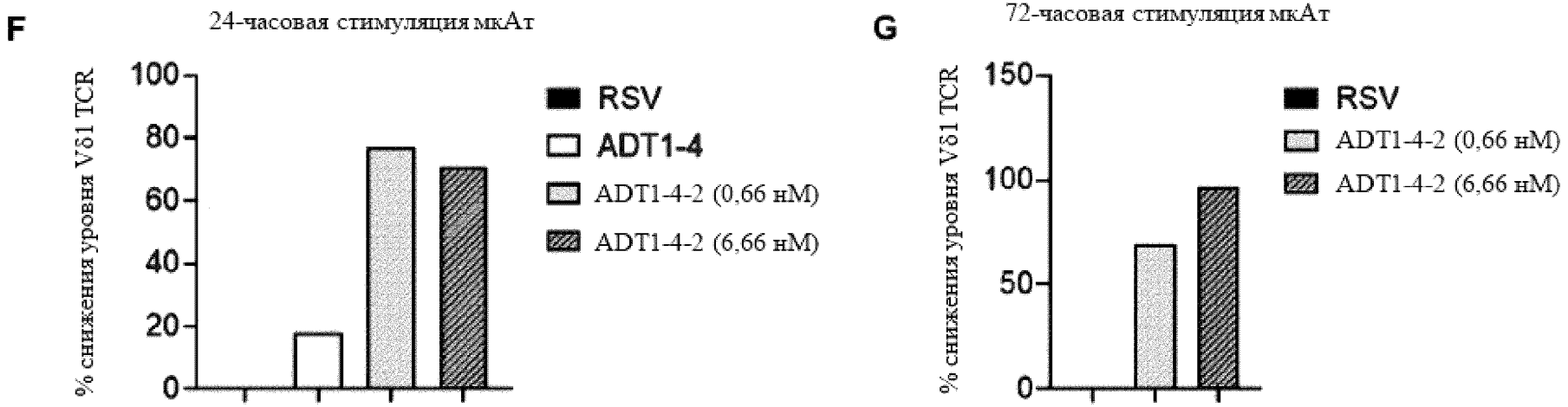

MFI vδ1
MFI vd1
15
10
5
0
RSV
ADT1-4-2
IgG2a
OKT3
Фенотип моноцитов
Фенотип моноцитов, %
5
4
3
2
1
0
RSV
ADT1-4-2
IgG2a
OKT3
Апоптотические моноциты
Апоптотические моноциты (%)
80
70
60
50
40
30
RSV
ADT1-4-2
IgG2a
OKT3

Фиг. 19

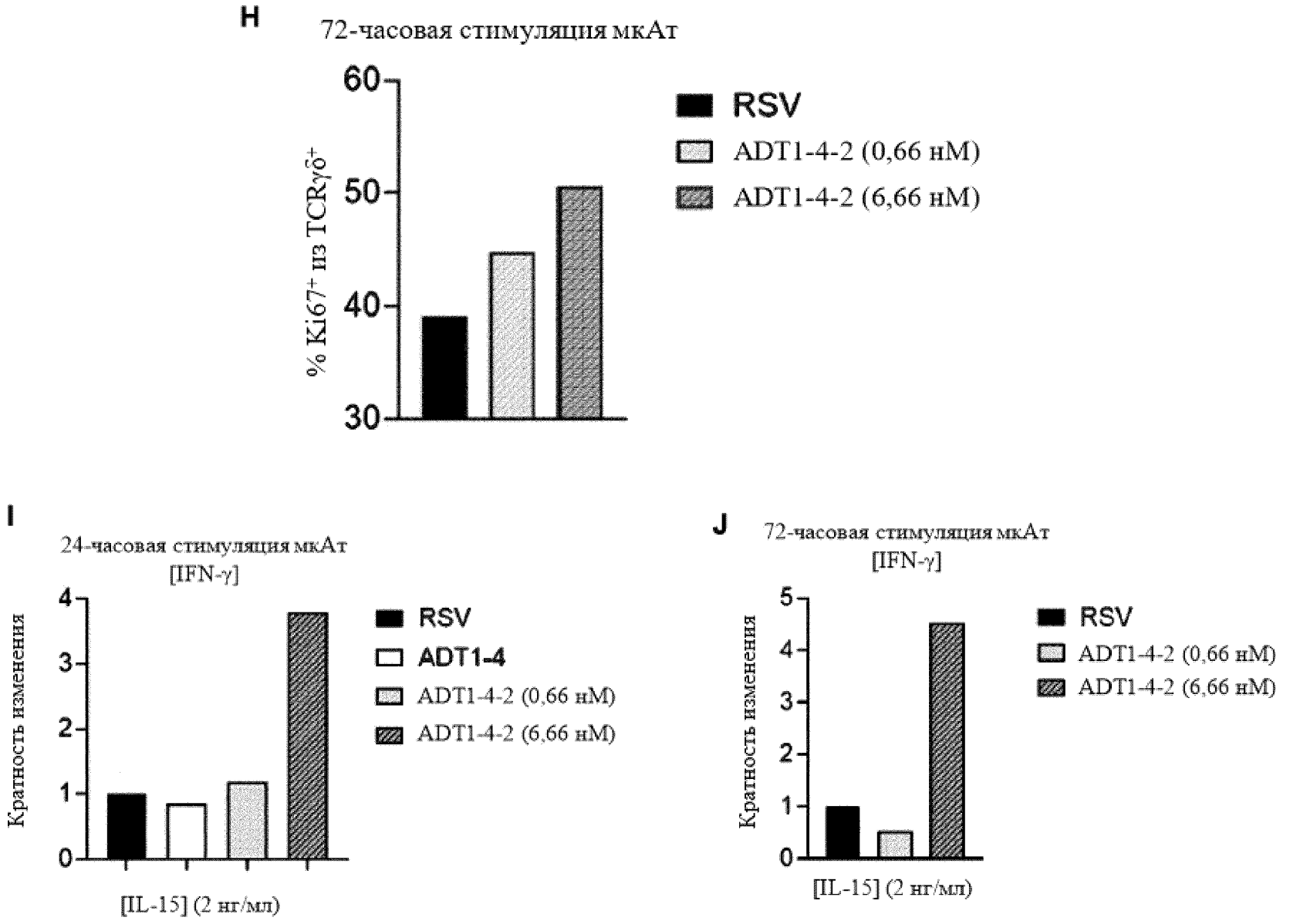

A
48-часовая стимуляция мкАт
% снижения уровня Vδ1 TCR
100
80
60
40
20
0
RSV
ADT1-4
ADT1-4-2 (0,66 нМ)
ADT1-4-2 (6,66 нМ)
B
72-часовая стимуляция мкАт
% снижения уровня Vδ1 TCR
80
60
40
20
0
RSV
ADT1-4
ADT1-4-2 (66,6 нМ)
ADT1-4-2 (6,66 нМ)
ADT1-7-3 (66,7 нМ)
C
48-часовая стимуляция мкАт
% из Vδ1+
100
90
80
70
60
CD25
Ki67
RSV
ADT1-4
ADT1-4-2 (0,66 нМ)
ADT1-4-2 (6,66 нМ)
[IFN-γ]
D
Кратность изменения
3000
2000
1000
0
2
50
[IL-15] нг/мл

Фиг. 20

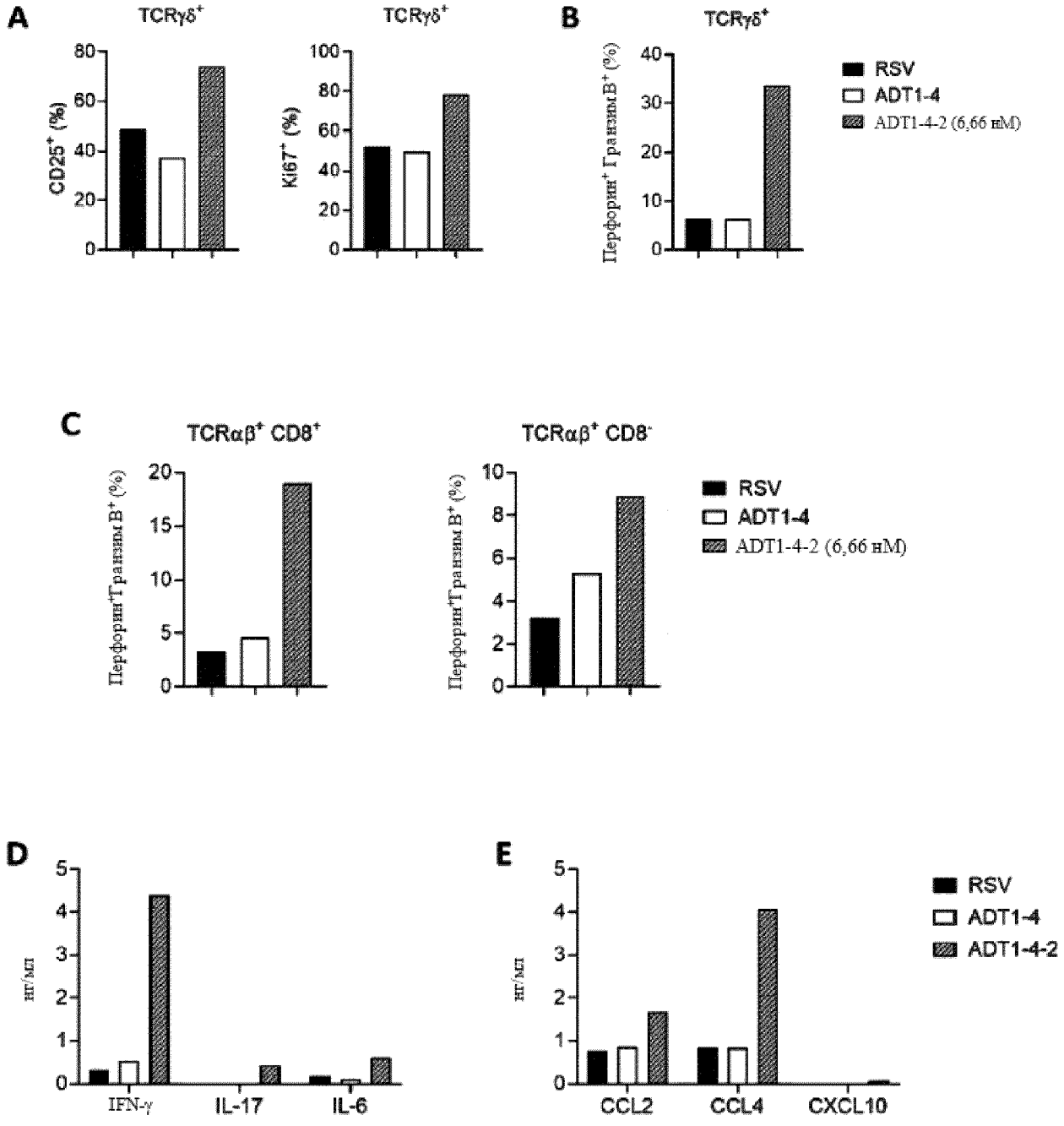




Фиг. 20, продолжение



Фиг. 20, продолжение


A
TCRγδ+
CD25+ (%)
0
20
40
60
80
TCRγδ+
Ki67+ (%)
0
20
40
60
80
100
B
TCRγδ+
Перфорин+ Гранзим B+ (%)
0
10
20
30
40
RSV
ADT1-4
ADT1-4-2 (6,66 нМ)
C
TCRαβ+ CD8+
Перфорин+Гранзим B+ (%)
0
5
10
15
20
TCRαβ+ CD8-
Перфорин+Гранзим B+ (%)
0
2
4
6
8
10
RSV
ADT1-4
ADT1-4-2 (6,66 нМ)
D
нг/мл
0
1
2
3
4
5
IFN-γ
IL-17
IL-6
E
нг/мл
0
1
2
3
4
5
CCL2
CCL4
CXCL10
RSV
ADT1-4
ADT1-4-2

Фиг. 21

ADT1-4-105 2499_01_D07

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQKYSTPQIT**FGQGTRLEIK

ADT1-4-107 2499_01_F07

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQRYSTPQIT**FGQGTRLEIK

ADT1-4-110 2499_02_A02

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQKYSTPQVT**FGAGTRLEIK

ADT1-4-112 2499_02_B04

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQKYSQPQVT**FGQGTRLEIK

ADT1-4-117 2499_02_F12

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQRYSTPRVT**FGQGTRLEIK

ADT1-4-19 2501_01_H01

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQKYSTPKVT**FGQGTRLEIK

ADT1-4-21 2501_02_A05

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQKYSTPWVT**FGQGTRLEIK

ADT1-4-31 2501_02_G09

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQRYSTPPVT**FGQGTRLEIK

ADT1-4-139 2502_01_C07

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQGYSTPQLT**FGQGTRLEIK

ADT1-4-4 2502_01_E01

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQKYSTPWVT**FGQGTRLEIK

ADT1-4-143 2502_01_E05

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQRYSTHQVT**FGQGTRLVIK

ADT1-4-53 2505_02_E12

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRAS**QDINDW**LAWYQHKPGKAPKLLIY**DAS**SLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQKYSTPQLT**FGQGTRLEIK

Фиг. 22

ADT1-4-173 2505_02_G11

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQKYSAPQVTFGQGTRLEIK

ADT1-4-2 2506_01_B10

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQKYSAPQVTFGQGTRLEIK

ADT1-4-8 2506_01_B11

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQKYSAPQVTFGQGTRLEIK

ADT1-4-82 2506_02_B09

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQRYSTPQITFGQGTRLEIK

ADT1-4-83 2506_02_B10

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQKYSEPQVTFGQGTRLEIK

ADT1-4-3 2506_02_C01

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQKYSTPEVTFGQGTRLEIK

ADT1-4-84 2506_02_C02

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQKYSDPQVTFGQGTRLEIK

ADT1-4-86 2506_02_C12

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQKYSEPQVTFGQGTRLEIK

ADT1-4-95 2506_02_H04

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQKYSTPQVTFGSGTRLEIK

ADT1-4-1 2501_01_C09

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQRYSTPIVTFGQGTRLEIK

ADT1-4-6 2506_1_B06

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQKYKTPQVTFGQGTRLEIK

ADT1-4-138 2502_01_B03

DIQMTQSPPALSASVGDRVTITCRASQDINDWLAWYQHKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQRYSTDQVTFGQGTRLEIK

Фиг. 22, продолжение

ADT1-4-105 2499_01_D07

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYVDV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-107 2499_01_F07

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYADV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-110 2499_02_A02

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVEYVDV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-112 2499_02_B04

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYVDY**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-117 2499_02_F12

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYVDV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-19 2501_01_H01

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYVDR**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-21 2501_02_A05

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSVA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWADYVDV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-31 2501_02_G09

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYADV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-139 2502_01_C07

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYVDY**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-4 2502_01_E01

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYADV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-143 2502_01_E05

EVQLLQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYADV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-53 2505_02_E12

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSVA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWADYVDV**WGQGTLVTVSS

Фиг. 23

ADT1-4-173 2505_02_G11

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWAGYPDV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-2 2506_01_B10

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYVDR**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-8 2506_01_B11

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYADV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-82 2506_02_B09

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**SWVGYVDV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-83 2506_02_B10

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**SWVGYVDV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-3 2506_02_C01

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWADYVDV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-84 2506_02_C02

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYADV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-86 2506_02_C12

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSVA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWLGNVDV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-95 2506_02_H04

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYADV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-1 2501_01_C09

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWVGYADV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-6 2506_1_B06

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWAGYPDV**WGQGTLVTVSS

ADT1-4-138 2502_01_B03

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSKSAA**WNWIRQSPSRGLEWLGR**TYYRSKWST**DYAASVKSRITINPDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**TWADYVDV**WGQGTLVTVSS

Фиг. 23, продолжение

ADT1-7-10 2503_1_C12

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRAG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQTASTLLT**FGRGTKVEIK

ADT1-7-15 2503_1_F01

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRAG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSADTLLT**FGRGTKVEIK

ADT1-7-17 2503_1_G05

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRAG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSGSELLT**FGRGTKVEIK

ADT1-7-18 2503_1_G06

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRVG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSASELLT**FGRGTKVEIK

ADT1-7-19 2503_1_G10

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRAG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSASELLT**FGRGTKVEIK

ADT1-7-20 2503_1_H02

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRAG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSGLDT**FGRGTKVEIK

ADT1-7-22 2503_2_A02

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRAG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSASELLT**FGRGTKVEIK

ADT1-7-23 2503_2_A07

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRAG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSGLDT**FGRGTKVEIK

ADT1-7-42 2503_2_H06

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRAG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSSSELLT**FGRGTKVEIK

ADT1-7-3 2504_1_A01

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRAG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSGLDT**FGRGTKVEIK

ADT1-7-61 2504_1_F02

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRAG**QSIGTY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**VAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSASELLT**FGRGTKVEIK

Фиг. 24

ADT1-7-10 2503_1_C12

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**DDYNDAFDI**WGQGTLVTVSS

ADT1-7-15 2503_1_F01

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**DDYNDAFDI**WGQGTLVTVSS

ADT1-7-17 2503_1_G05

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**IDYEDAFDI**WGQGTLVTVSS

ADT1-7-18 2503_1_G06

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**VSYDDAFDI**WGQGTLVTVSS

ADT1-7-19 2503_1_G10

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**IDYEDAFDI**WGQGTLVTVSS

ADT1-7-20 2503_1_H02

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**VDYQEAFDI**WGQGTLVTVSS

ADT1-7-22 2503_2_A02

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**DDYNDAFDI**WGQGTLVTVSS

ADT1-7-23 2503_2_A07

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**VDYNEAFDI**WGQGTLVTVSS

ADT1-7-42 2503_2_H06

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**DDYEDAFDI**WGQGTLVTVSS

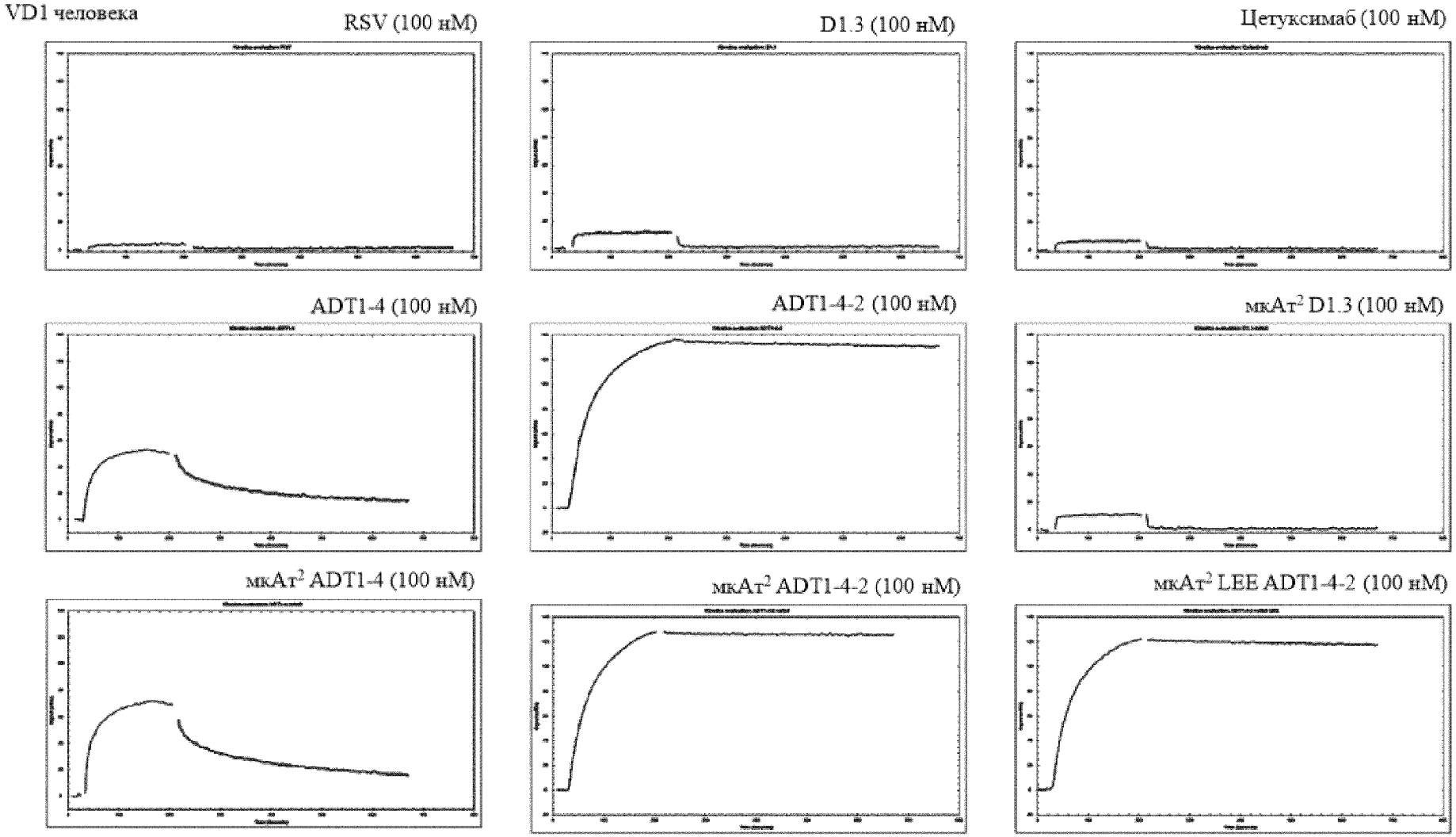
ADT1-7-3 2504_1_A01

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**VSYAEAFDI**WGQGTLVTVSS

ADT1-7-61 2504_1_F02

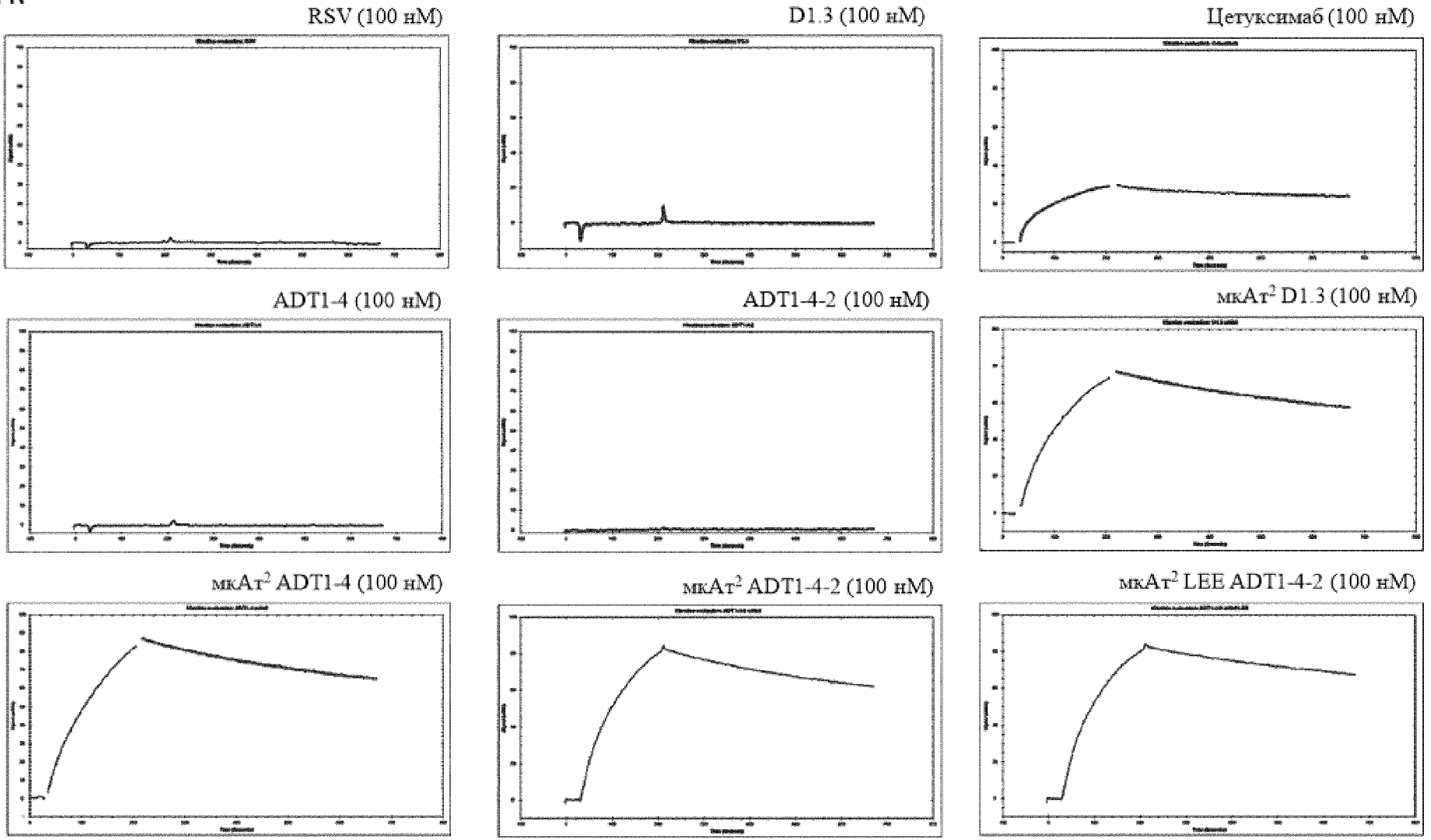
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISSSGSTI**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**DDYDDAFDI**WGQGTLVTVSS

Фиг. 25

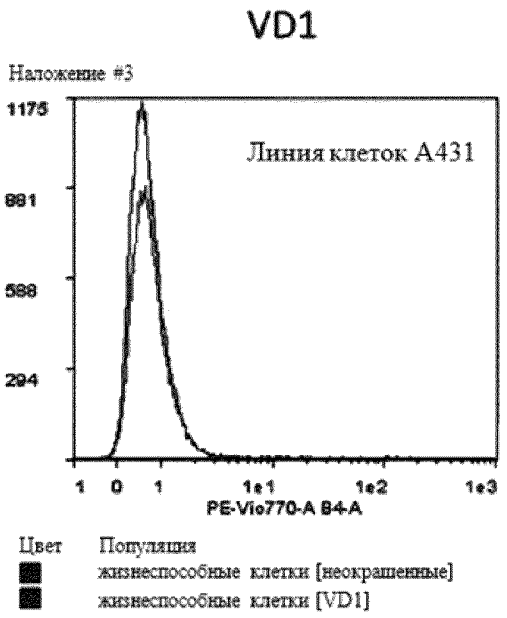

VD1 человека
RSV (100 нМ)
D1.3 (100 нМ)
Цетуксимаб (100 нМ)
ADT1-4 (100 нМ)
ADT1-4-2 (100 нМ)
мкАт2 D1.3 (100 нМ)
мкАт2 ADT1-4 (100 нМ)
мкАт2 ADT1-4-2 (100 нМ)
мкАт2 LEE ADT1-4-2 (100 нМ)

Фиг. 26A

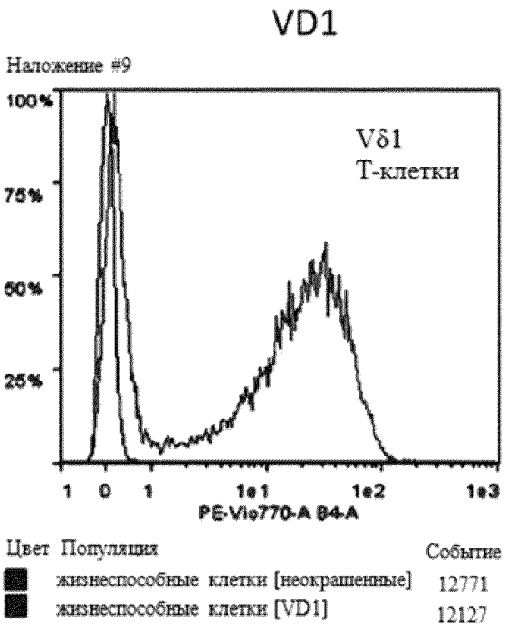
EGFR

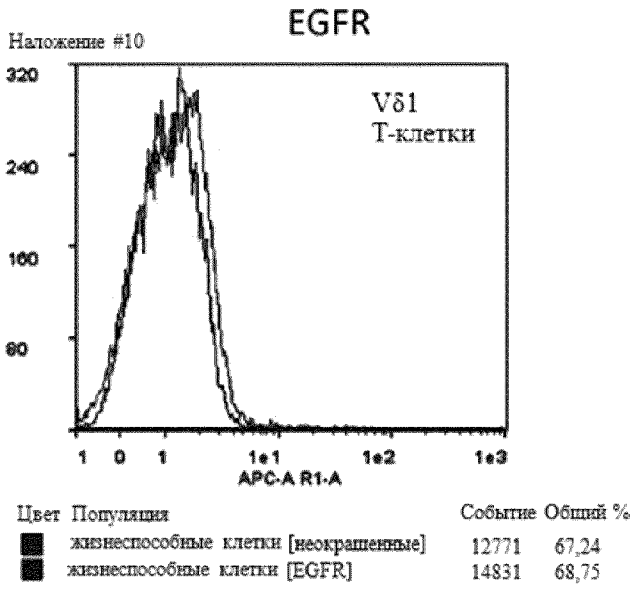

RSV (100 нМ)
D1.3 (100 нМ)
Цетуксимаб (100 нМ)
ADT1-4 (100 нМ)
ADT1-4-2 (100 нМ)
мкАт2 D1.3 (100 нМ)
мкАт2 ADT1-4 (100 нМ)
мкАт2 ADT1-4-2 (100 нМ)
мкАт2 LEE ADT1-4-2 (100 нМ)

Фиг. 26B

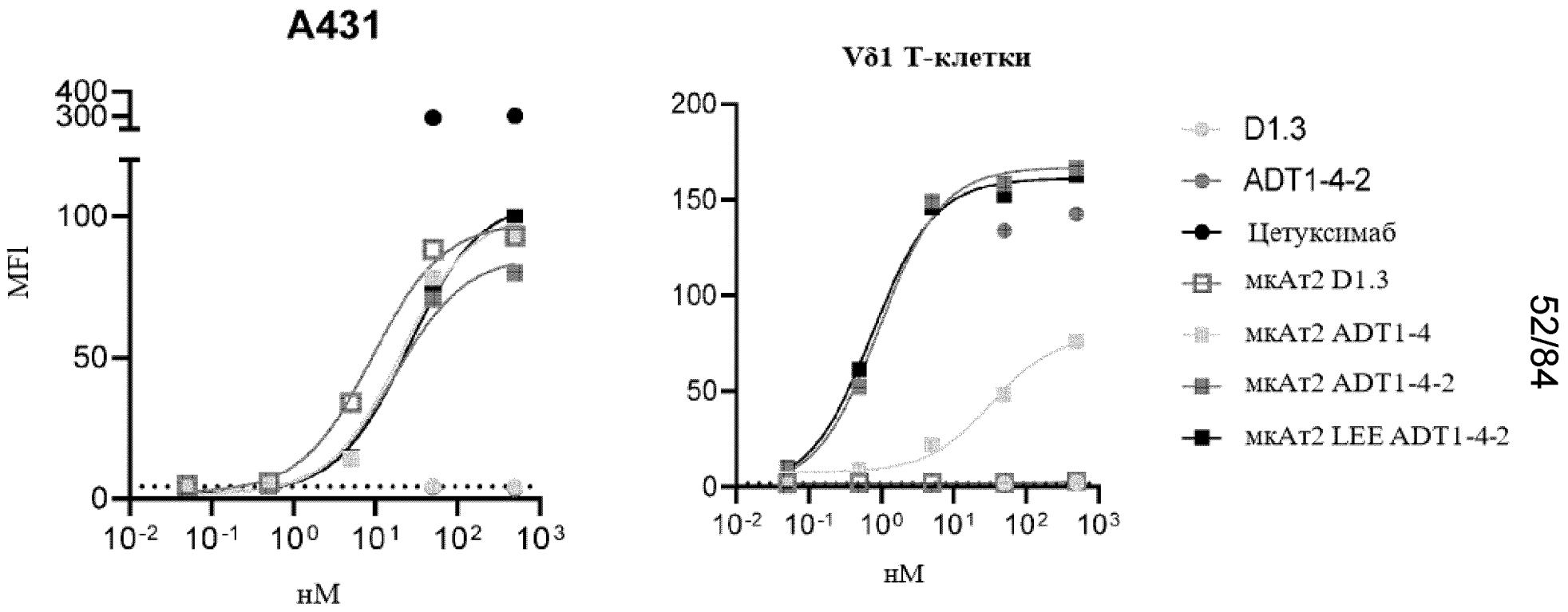

VD1
Наложение #3
1175
881
588
294
Линия клеток A431
1 0 1 1e1 1e2 1e3
PE-Vio770-A B4-A
Цвет Популяция
жизнеспособные клетки [неокрашенные]
жизнеспособные клетки [VD1]


EGFR
Наложение #4
2744
2058
1372
686
Линия клеток A431
1 0 1 1e1 1e2 1e3
APC-H R1-H
Цвет Популяция
жизнеспособные клетки [неокрашенные]
жизнеспособные клетки [EGFR]


VD1
Наложение #9
100%
75%
50%
25%
Vδ1
T-клетки
1 0 1 1e1 1e2 1e3
PE-Vio770-A B4-A
Цвет Популяция Событие Общий %
жизнеспособные клетки [неокрашенные] 12771 67,24
жизнеспособные клетки [VD1] 12127 68,94

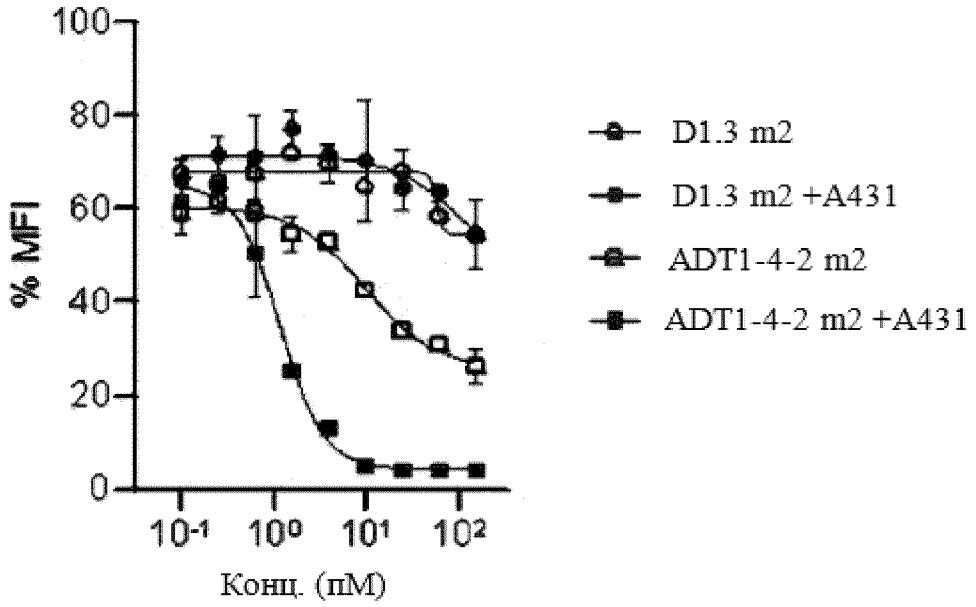

EGFR
Наложение #10
320
240
160
80
Vδ1
T-клетки
1 0 1 1e1 1e2 1e3
APC-A R1-A
Цвет Популяция Событие Общий %
жизнеспособные клетки [неокрашенные] 12771 67,24
жизнеспособные клетки [EGFR] 14831 68,75

Фиг. 27A

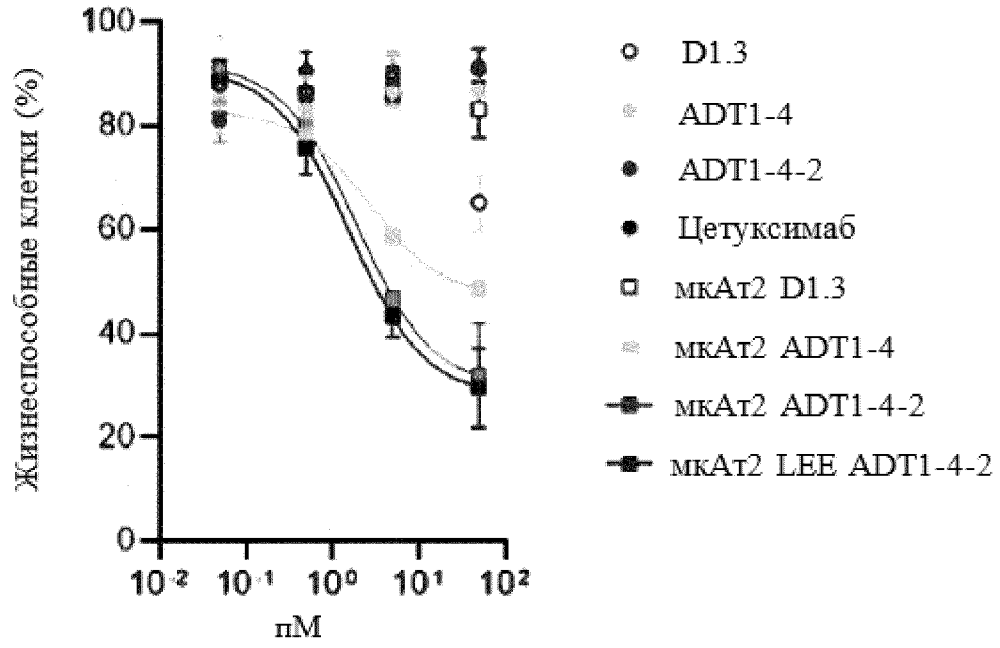

A431
MFI
400
300
100
50
0
10-2 10-1 100 101 102 103
нМ
Vδ1 Т-клетки
200
150
100
50
0
10-2 10-1 100 101 102 103
нМ
D1.3
ADT1-4-2
Цетуксимаб
мкАт2 D1.3
мкАт2 ADT1-4
мкАт2 ADT1-4-2
мкАт2 LEE ADT1-4-2

Фиг. 27B

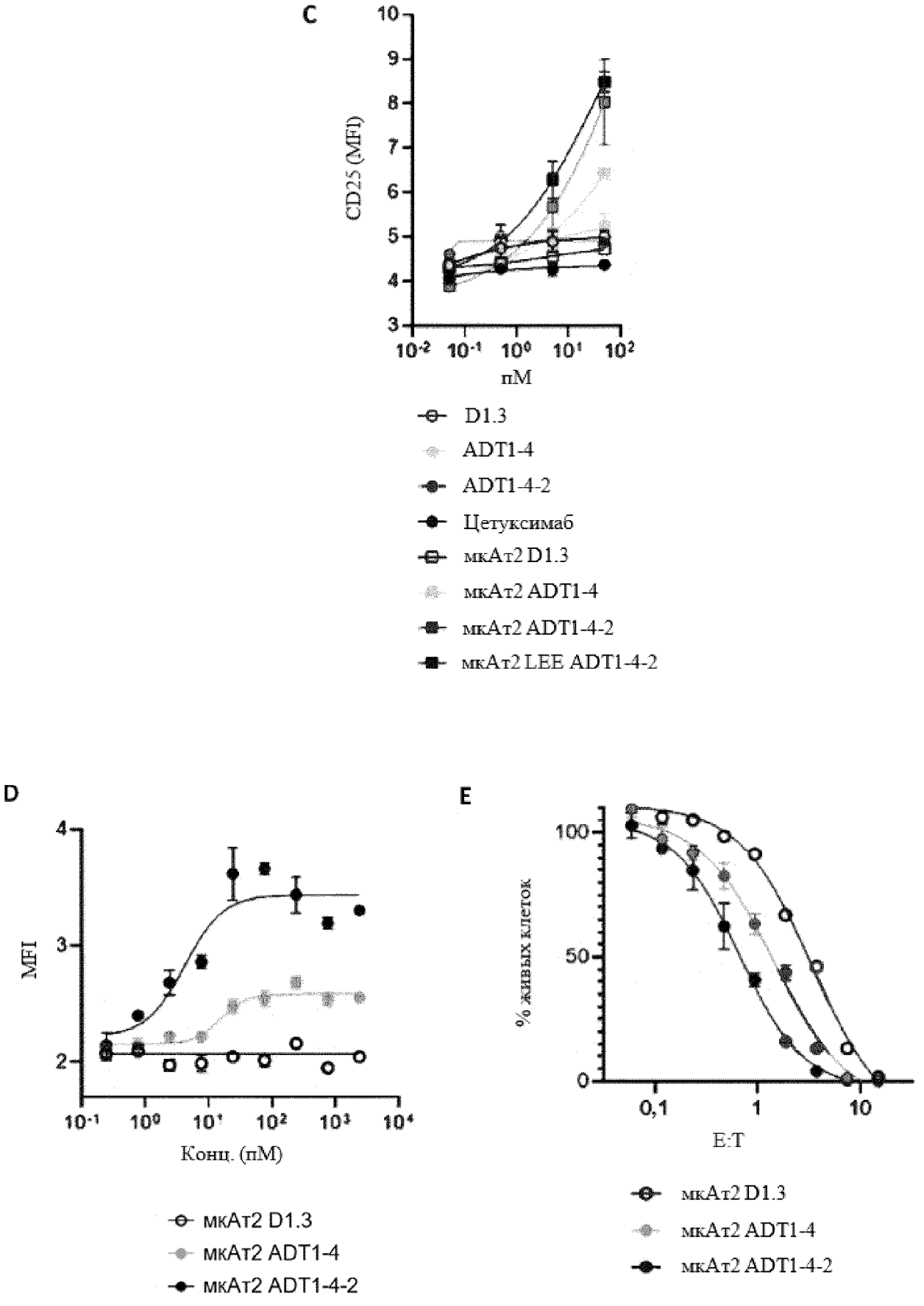
A


100
80
60
40
20
0
% MFI
10-1
100
101
102
Конц. (пМ)
D1.3 m2
D1.3 m2 +A431
ADT1-4-2 m2
ADT1-4-2 m2 +A431

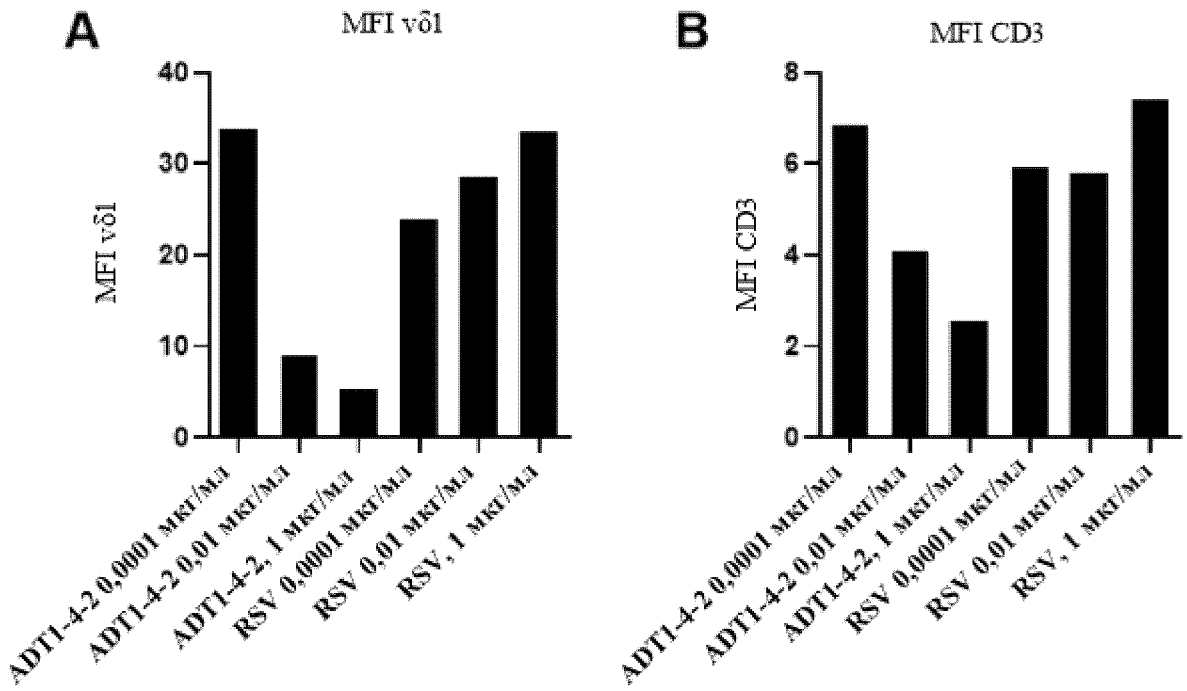
B


100
80
60
40
20
0
Жизнеспособные клетки (%)
10-2
10-1
100
101
102
пМ
D1.3
ADT1-4
ADT1-4-2
Цетуксимаб
мкАт2 D1.3
мкАт2 ADT1-4
мкАт2 ADT1-4-2
мкАт2 LEE ADT1-4-2

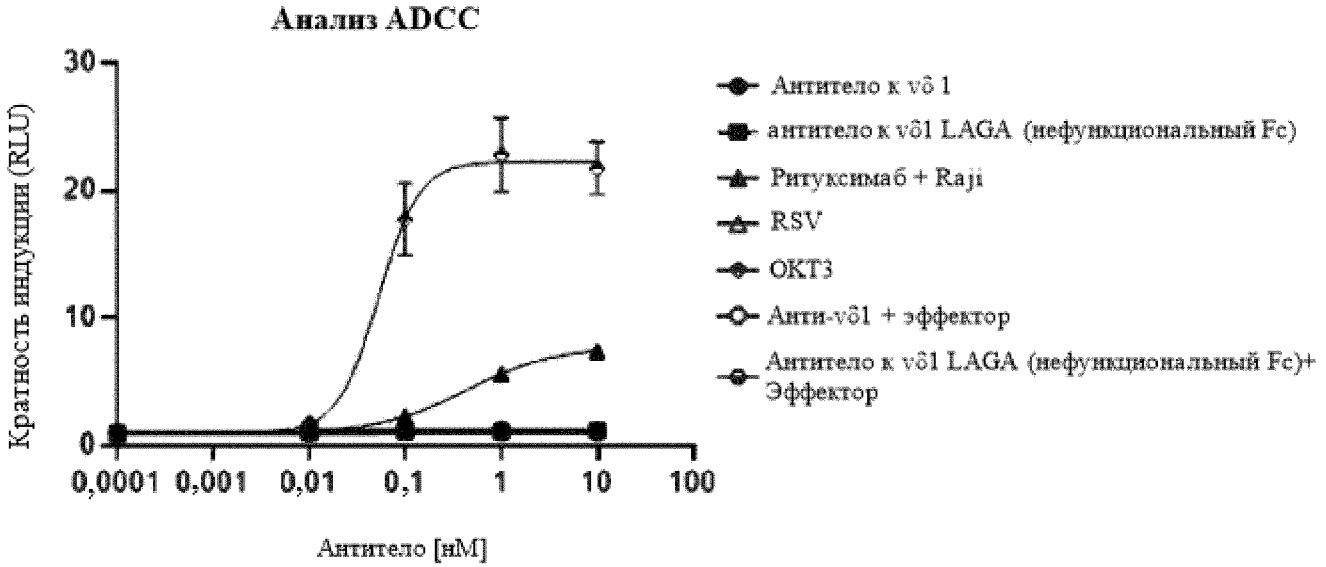
Фиг. 28



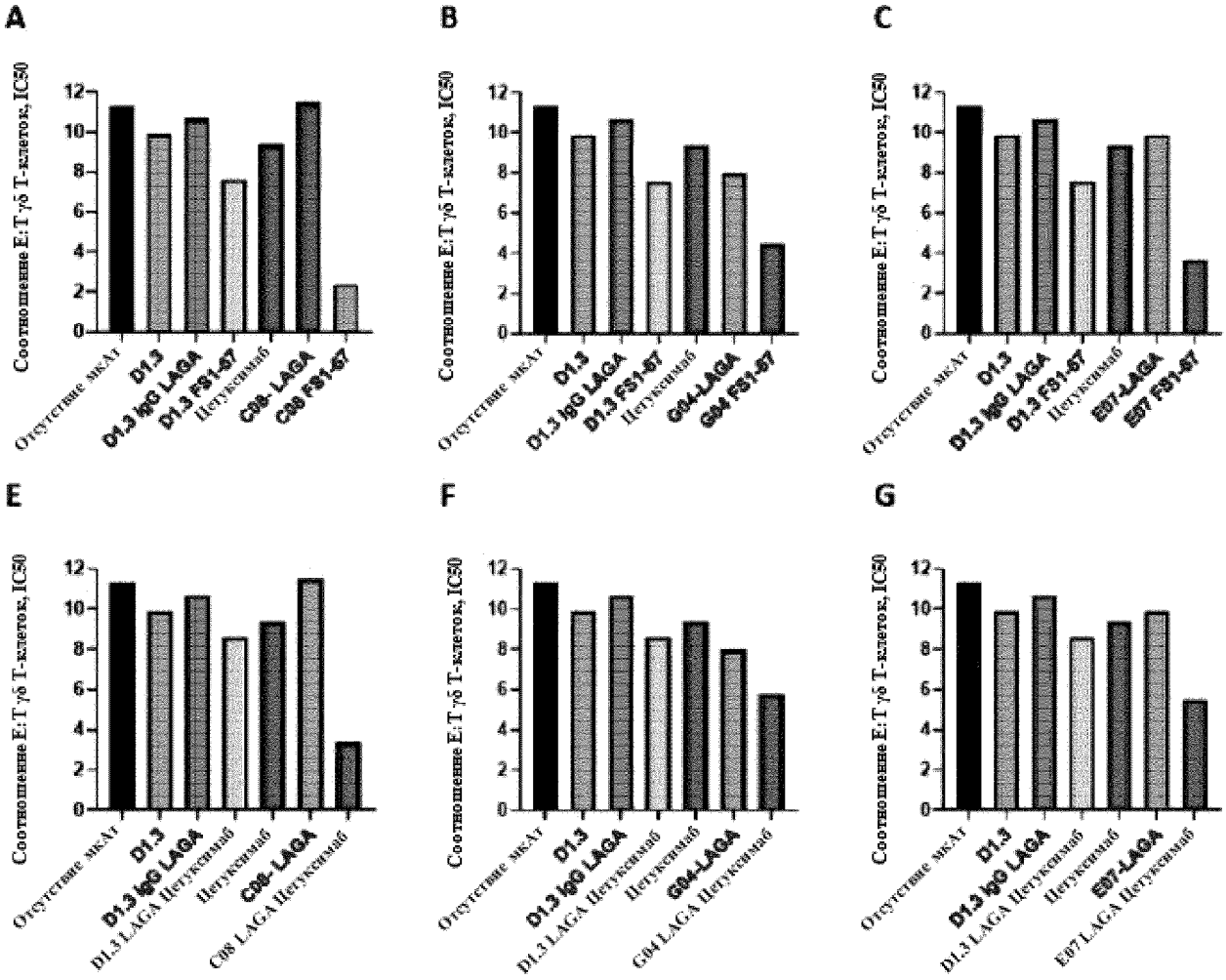
Фиг. 28, продолжение


A
MFI vδ1
MFI vδ1
40
30
20
10
0
ADT1-4-2 0,0001 мкг/мл
ADT1-4-2 0,01 мкг/мл
ADT1-4-2, 1 мкг/мл
RSV 0,0001 мкг/мл
RSV 0,01 мкг/мл
RSV, 1 мкг/мл
B
MFI CD3
MFI CD3
8
6
4
2
0
ADT1-4-2 0,0001 мкг/мл
ADT1-4-2 0,01 мкг/мл
ADT1-4-2, 1 мкг/мл
RSV 0,0001 мкг/мл
RSV 0,01 мкг/мл
RSV, 1 мкг/мл

ФИГ. 29


Анализ ADCC
Кратность индукции (RLU)
30
20
10
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Антитело [нМ]
Антитело к vδ 1
антитело к vδ1 LAGA (нефункциональный Fc)
Ритуксимаб + Raji
RSV
OKT3
Анти-vδ1 + эффектор
Антитело к vδ1 LAGA (нефункциональный Fc)+ Эффектор

ФИГ. 30



D

	5 ч	12 ч	24 ч
Отсутствие мкАт	100%	100%	100%
D1.3	114%	99%	112%
D1.3 IgG LAGA	106%	96%	113%
D1.3 FS1-67	149%	143%	147%
Цетуксимаб	121%	110%	126%
C08-LAGA	99%	34%	101%
E07-LAGA	115%	117%	127%
G04-LAGA	141%	128%	163%
C08 FS1-67	467%	424%	371%
E07 FS1-67	303%	292%	259%
G04 FS1-67	254%	232%	212%

H

	5 ч	12 ч	24 ч
Отсутствие мкАт	100%	100%	100%
D1.3	114%	99%	112%
D1.3 IgG LAGA	106%	96%	113%
D1.3 LAGA Цетуксимаб	132%	123%	118%
Цетуксимаб	121%	110%	126%
C08-LAGA	99%	84%	101%
E07-LAGA	115%	117%	127%
G04-LAGA	141%	128%	163%
C08 LAGA Цетуксимаб	334%	313%	245%
E07 LAGA Цетуксимаб	208%	216%	187%
G04 LAGA Цетуксимаб	197%	210%	158%

Фиг. 31

EGFR-связывающие домены(CH1-CH2-CH3 IgG1)

FS1-67 (SEQ ID NO: 385)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDETDDGPVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESTYGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVSYWRWYKGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

LEE (SEQ ID NO: 392)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELEEGPVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESTYGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVSYWRWYKGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

LEE1 (SEQ ID NO: 509)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESTYGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVSYWRWYKGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

LEE2 (SEQ ID NO: 521)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELEEGPVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVSYWRWYKGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

LEE3 (SEQ ID NO: 531)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELEEGPVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESTYGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVSYWRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

FS1-65 (SEQ ID NO: 540)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELDEGGPVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESTYGPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVSYWRWVKGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

747 (SEQ ID NO: 551)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDETESGPVSLTCLVKGFYPSDIVVEWESKFGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVSNLRWTKGHVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Фиг. 32

EGFR-связывающие домены (только CH3 IgG1, с номерами по нумерации EU 341–446 включительно)

```
        34        35        36         37        38        39         40        41        42        43        44
        123456789012345678901 2345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456
IgG1    GQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
FS1-67  GQPREPQVYTLPPSRDETDDG PVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESTYGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSYWRWYKGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
LEE     GQPREPQVYTLPPSRDELEEG PVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESTYGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSYWRWYKGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
LEE1    GQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESTYGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSYWRWYKGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
LEE2    GQPREPQVYTLPPSRDELEEG PVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSYWRWYKGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
LEE3    GQPREPQVYTLPPSRDELEEG PVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESTYGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSYWRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
747     GQPREPQVYTLPPSRDETESG PVSLTCLVKGFYPSDIVVEWESKFGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSNLRWTKGHVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
FS1-65  GQPREPQVYTLPPSRDELDEGGPVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESTYGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSYWRWVKGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
```

Изменения CH3 IgG1 по нумерации EU

	ПЕТЛЯ AB		ПЕТЛЯ CD	ПЕТЛЯ EF
FS1-67	L358T.T359D.K360D.N361G.Q362P		N384T.G385Y.Q386G	D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K
LEE	T359E.K360E.N361G.Q362P		N384T.G385Y.Q386G	D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K
LEE1			N384T.G385Y.Q386G	D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K
LEE2	T359E.K360E.N361G.Q362P			D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K
LEE3	T359E.K360E.N361G.Q362P		N384T.G385Y.Q386G	D413S.K414Y.S415W
747	L358T.T359E.K360S.N361G.Q362P	A378V	N384K.G385F.Q386G	D413S.K414N.S415L.Q418T.Q419K.N421H
FS1-65	T359D.K360E.N361G.361-1G.Q362P		N384K.G385F.Q386G	D413S.K414Y.S415W.Q418V.Q419K

Фиг. 32, продолжение

Соглашение о нумерации CH3 человека (с перекрестной ссылкой на дикий тип IGHG1*01)				
Трансляция аминокислот J00228 человеческой последовательности IGHG1 CH3 (J00228 соответствует аллелю IGHG1*01	Уникальная нумерация IMGT для С-ДОМЕНА	Нумерация экзонов IMGT CH3 — см. IMGT.Org (также источник этой адаптированной таблицы)	Нумерация EU - см. Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63,78-85 (1969).	Нумерация Kabat — см. Kabat, E.A. et al., NIH publication n° 91-3242, pp 662,680,689 (1991).
(G)	1,4	1	341	361
Q	1,3	2	342	363
P	1,2	3	343	364
R	1,1	4	344	365
E	1	5	345	366
P	2	6	346	367
Q	3	7	347	368
V	4	8	348	369
Y	5	9	349	370
T	6	10	350	371
L	7	11	351	372
P	8	12	352	373
P	9	13	353	374
S	10	14	354	375
R	11	15	355	376
D	12	16	356	377
E	13	17	357	378
L	14	18	358	381
T	15	19	359	382
K	16	20	360	383
N	17	21	361	384
(дополнительная вставка найдена в одном примере конструкции)	17,1	21,1	361,1	384,1
Q	18	22	362	385
V	19	23	363	386
s	20	24	364	387
L	21	25	365	388
T	22	26	366	389
C	23	27	367	390
L	24	28	368	391
V	25	29	369	392
K	26	30	370	393
G	27	31	371	394
F	28	32	372	395
Y	29	33	373	396
P	30	34	374	397
S	35	35	375	398
D	36	36	376	399
I	37	37	377	400
A	38	38	378	401

Фиг. 33, продолжение

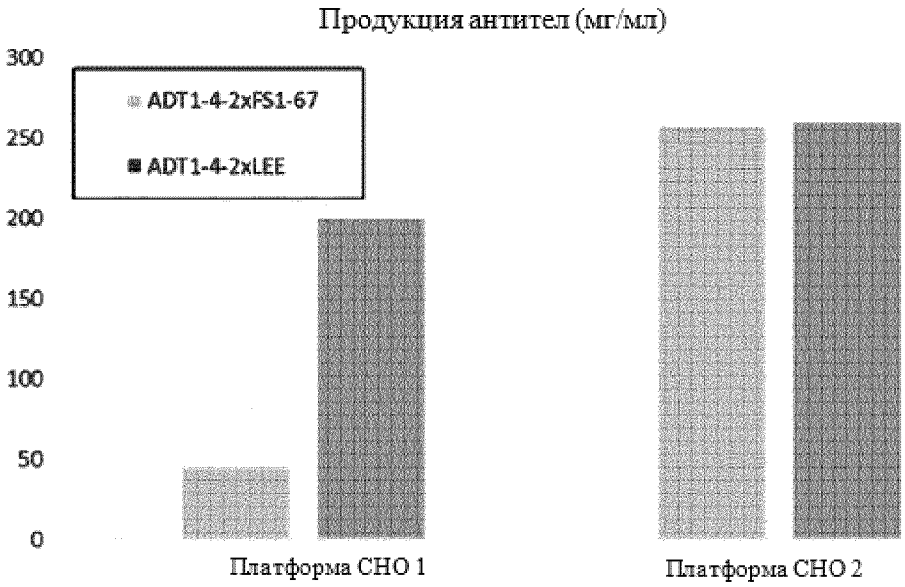
V	39	39	379	402
E	40	40	380	405
W	41	41	381	406
E	42	42	382	407
S	43	43	383	408
N	44	44	384	410
G	45	45	385	411
Q	45,1	46	386	414
P	45,2	47	387	415
E	45,3	48	388	416
N	45,4	49	389	417
N	77	50	390	418
Y	78	51	391	419
K	79	52	392	420
T	80	53	393	421
T	81	54	394	422
P	82	55	395	423
P	83	56	396	424
V	84	57	397	425
L	84,1	58	398	426
D	84,2	59	399	427
S	84,3	60	400	428
D	84,4	61	401	430
G	85,4	62	402	433
S	85,3	63	403	434
F	85,2	64	404	435
F	85,1	65	405	436
L	85	66	406	437
Y	86	67	407	438
S	87	68	408	439
K	88	69	409	440
L	89	70	410	441
T	90	71	411	442
V	91	72	412	443
D	92	73	413	444
K	93	74	414	445
S	94	75	415	446
R	95	76	416	447
W	96	77	417	448
Q	97	78	418	449
Q	98	79	419	450
G	99	80	420	451
N	100	81	421	452
V	101	82	422	453
F	102	83	423	454
S	103	84	424	455

Фиг. 33, продолжение

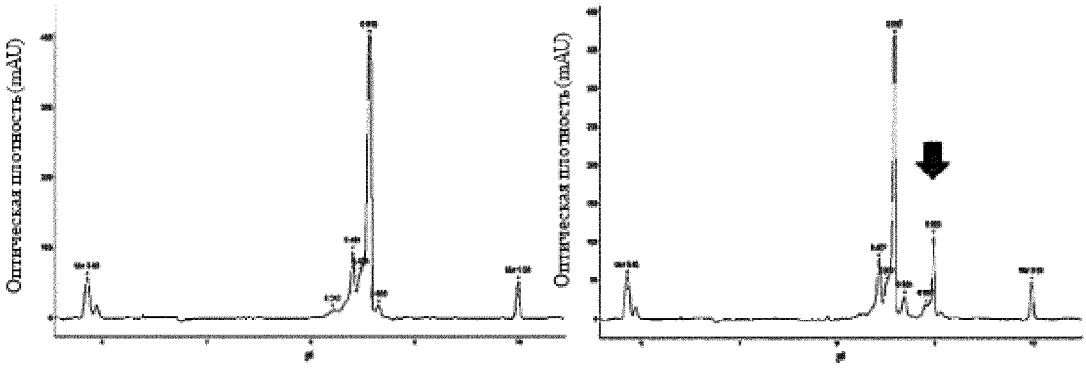
C	104	85	425	456
S	105	86	426	457
V	106	87	427	458
M	107	88	428	459
H	108	89	429	460
E	109	90	430	461
A	110	91	431	462
L	112	92	432	463
H	113	93	433	464
N	114	94	434	465
H	115	95	435	466
Y	116	96	436	467
T	117	97	437	468
Q	118	98	438	469
K	119	99	439	470
S	120	100	440	471
L	121	101	441	472
S	122	102	442	473
L	123	103	443	474
S	124	104	444	475
P	125	105	445	476
G	129	CHS 106	446	477
K	130	CHS 107	447	478

Фиг. 33 продолжение

(A)



(B)



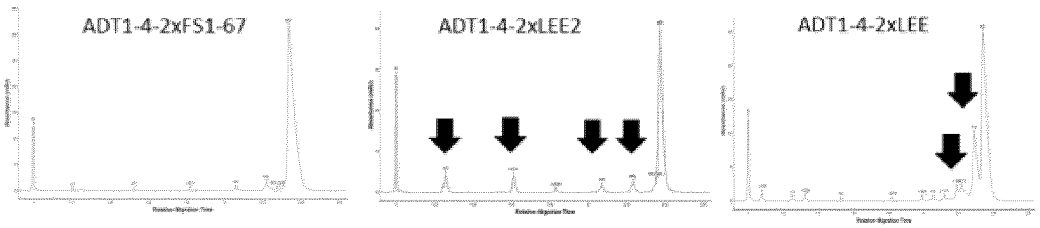
Антитела (при 37C в течение 48 часов)	% исходного клона в нулевой момент времени	% исходного клона через 48 часов	% изменения
ADT1-4-2xLEE	2,8	3,4	+0,6
ADT1-4-2xLEE2	2,6	3,1	+0,5
ADT1-4-2xLEE3	3,9	4,0	+0,1
ADT1-4-2xFS1-67	3,4	23,4	+20,0 ⬅
ADT1-4-2xFS1-65	2,6	3,8	+1,2

Фиг. 34

(C)

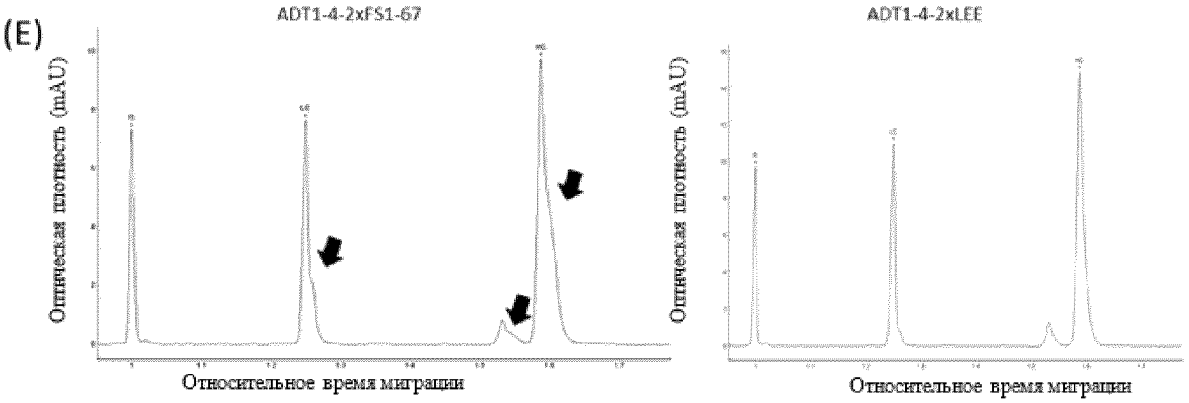
Антитело	Темп. начала плавления (°C)	Темп. начала агрегации(°C)	Дельта (°C)
ADT1-4-2xLEE	63,8	63,8	0
ADT1-4-2xLEE2	67,7	64,2	-3,5
ADT1-4-2xLEE3	67,8	64,4	-3,4
ADT1-4-2xFS1-67	68,9	65,7	-3,2
ADT1-4-2xFS1-65	74	57,6	-16,4

(D)



Антитела при 5 мг/мл	% мономеров (нулевой момент времени)	% мономеров (18 дней, 37°C)	% изменения в течение 18 дней
ADT1-4-2xLEE	98,0	60,6	-37,4
ADT1-4-2xLEE2	97,7	74,0	-23,7
ADT1-4-2xLEE3	97,5	68,3	-29,2
ADT1-4-2XFS1-67	95,6	94,0	-1,6
ADT1-4-2XFS1-65	96,8	72,7	-24,1

(E)



Фиг. 34, продолжение

(F)

Антитело	Выход	Стабильный заряд при 37C	Благоприятная дельта Tm/Tagg	%мономеров 5 мг/мл, 18 дней при 37°C (невосстанавливающие условия)	Типичный профиль HC + LC при дозе 5 мг/мл, 18 дней при 37°C (восстанавливающие условия)	Общая оценка	Модификации петли AB	Модификации петли BC	Модификации петли EF	Количество изменений (и % идентичности) относительно последовательности CH3 человека от P343 до G446 (нумерация EU)
ADT1-4-2xLEE	++	+++	+++	+	++	11	T359E.K360E.N361G.Q362P	N384T.G385Y.Q386G	D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K	12 (88%)
ADT1-4-2xLEE2	++	+++	++	++	++	11	T359E.K360E.N361G.Q362P	Никаких изменений относительно дикого типа	D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K	9(91%)
ADT1-4-2xLEE3	++	+++	++	++	++	11	T359E.K360E.N361G.Q362P	N384T.G385Y.Q386G	D413S.K414Y.S415W	10 (90%)
ADT1-4-2XFS1-67	+	+	++	+++	-	7	L358T.T359D.K360D.N361G.Q362P	N384T.G385Y.Q386G	D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K	13 (88%)
ADT1-4-2XFS1-65	++	+++	-	++	++	9	T359D.K360D.N361G.361.1G.Q362P	N384T.G385Y.Q386G	D413S.K414Y.S415W.Q418V.Q419K	13 (88%)

Фиг. 34, продолжение

A)

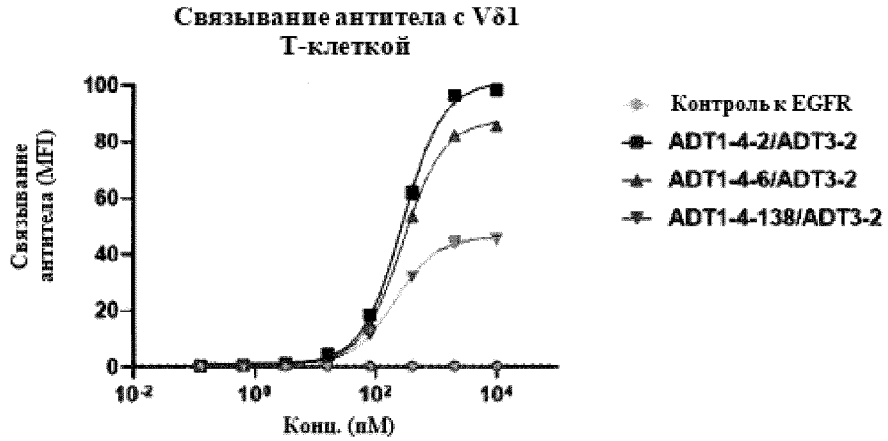
Антитело	Аффинность к Vδ1 (нМ)
ADT1-4-2/ADT3-2	0,24
ADT1-4-6/ADT3-2	1,26
ADT1-4-138/ADT3-2	18,3

Примечание: Аффинность к EGFR одинакова для всех
Прибл. 1 нМ

C)

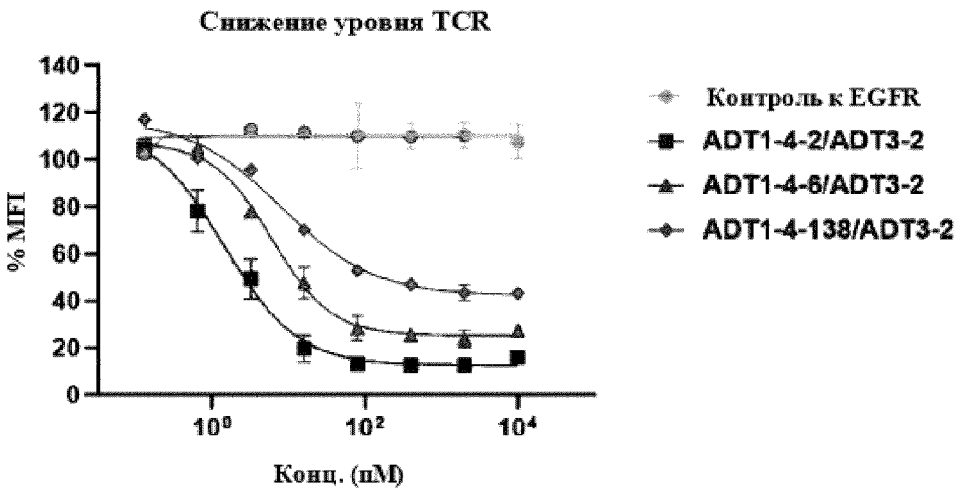
Антитело	EC50 (нМ)	EC95 (нМ)	MFI (при насыщении)
Контроль EGFR	Н/П	Н/П	~0,4950
ADT1-4-2xADT3-2	275,9	2698	101,1
ADT1-4-6xADT3-2	279,2	2766	87,56
ADT1-4-138xADT3-2	208,8	2254	46,31

B)



Фиг. 35

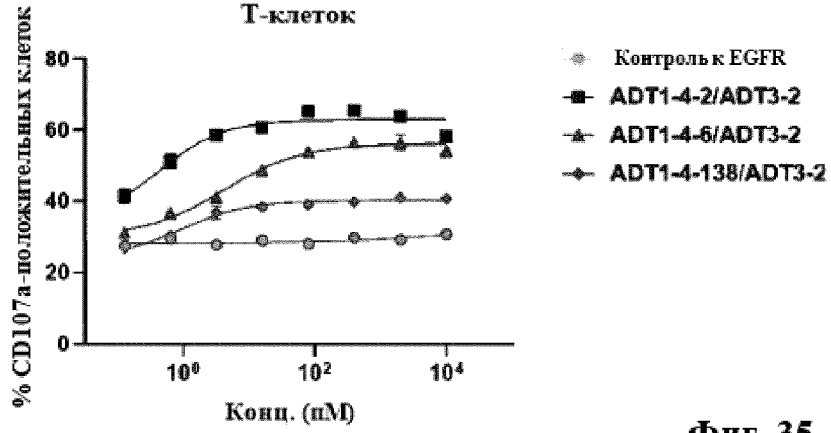
D)



E)

Антитело	EC50 (нМ)	EC95 (нМ)	% изменения (при насыщении)
Контроль EGFR	Н/П	Н/П	-
ADT1-4-2xADT3 2	1,422	37,85	101,9
ADT1-4-6XADT3-2	6,056	83,63	81,94
ADT1-4-138XADT3-2	7,981	495,6	75,34

F)

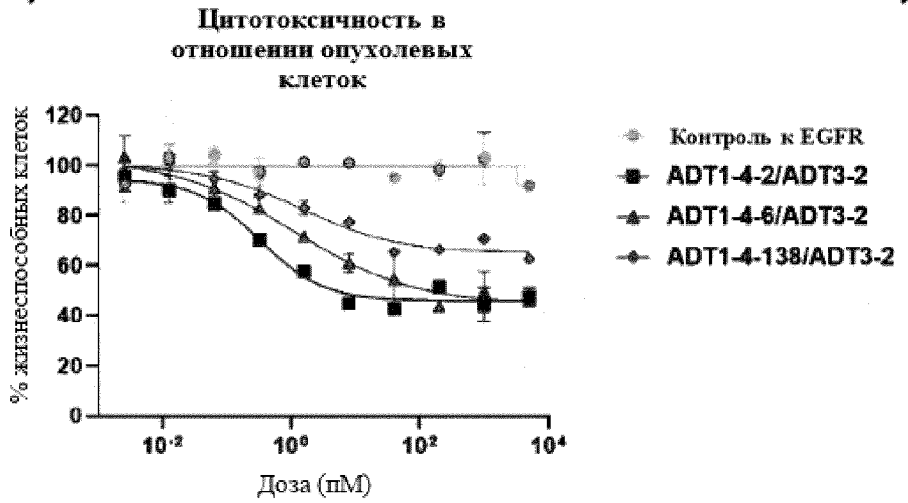


G)

Антитело	% включения CD107a- (при насыщении)
Контроль EGFR	-
ADT1-4-2xADT3-2	34,86
ADT1-4-6XADT3-2	28,09
ADT1-4-138xADT3-2	12,04

Фиг. 35, продолжение

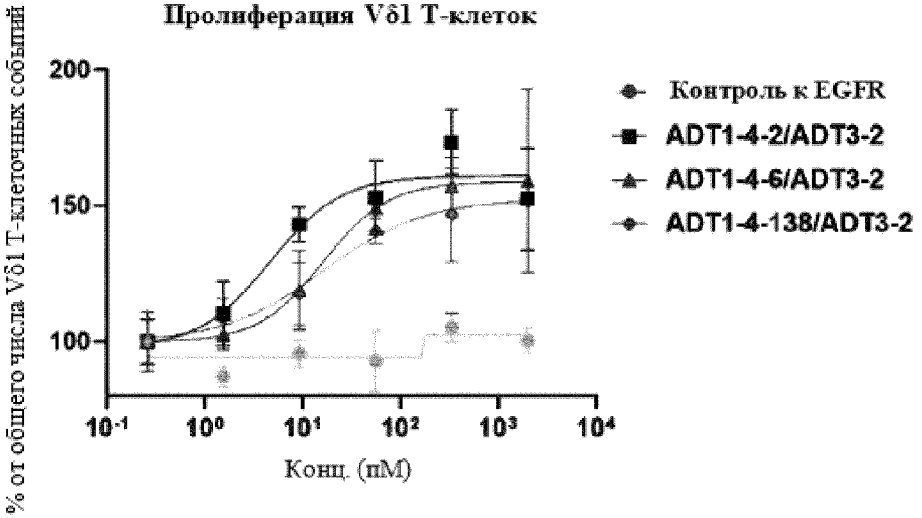
H)



I)

Антитело	EC50 (пМ)	% уничтожения (при насыщении)
Контроль EGFR	-	-
ADT1-4-2XADT3-2	0,3249	54,25
ADT1-4-6XADT3-2	1,140	55,9
ADT1-4-138XADT3-2	1,488	34,97

J)



K)

Антитело	EC50 (пМ)	EC95 (пМ)	% от общего кол-ва Vδ1 Количество Т-клеток (при насыщении)
Контроль EGFR	Н/П	Н/П	-
ADT1-4-2XADT3-2	3,472	54,08	161,1
ADT1-4-6XADT3-2	23,8	152,7	158,8
ADT1-4-138XADT3-2	22,95	528,3	152,5

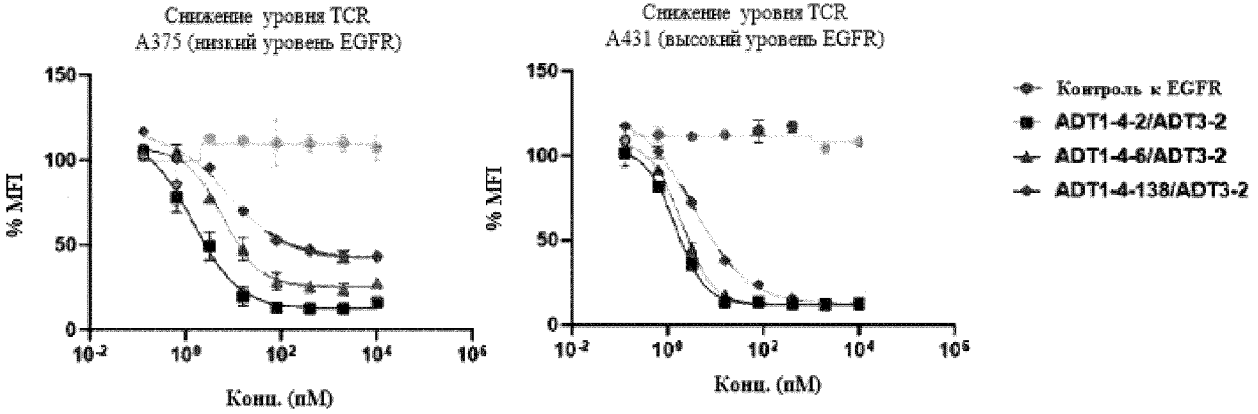
Фиг. 35, продолжение

L)

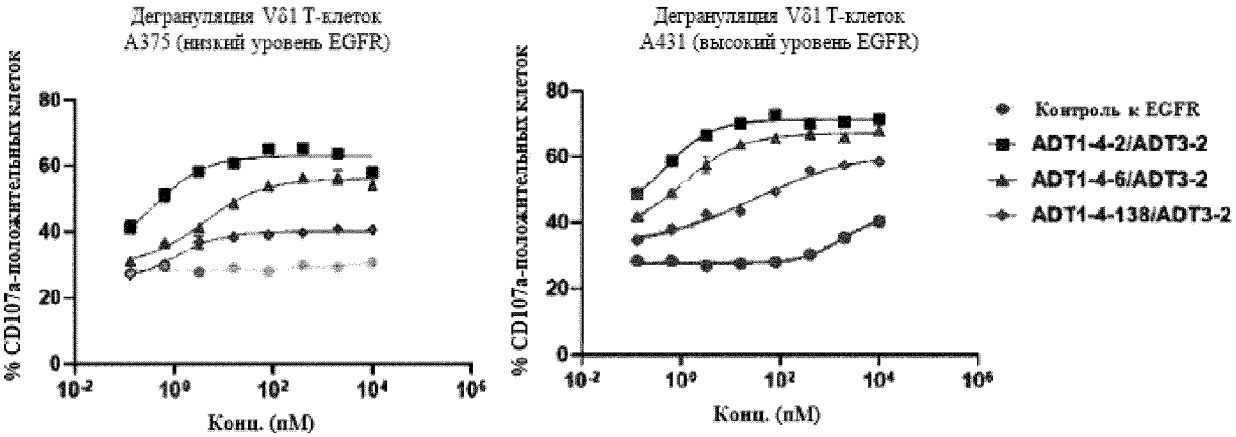
Технический эффект, оказываемый на первичные тканевые Vδ1+ клетки антителами к Vδ1 TCR по данному изобретению	Будет ли этот эффект дополнительно усиливаться за счет увеличения аффинности антитела до уровня менее 10 нМ?	Можно ли компенсировать уменьшенный эффект, оказываемый молекулами с более низкой аффинностью, за счет увеличения концентрации в 100 раз или больше?
Связывание (MFI)	Да	Нет
Снижение уровня V61TCR	Да	Нет
Повышение уровня CD107A	Да	Нет
Цитотоксичность	Да	Нет
Пролиферация	Да	Да

Фиг. 35, продолжение

M)



Антитело	% изменения TCR (при насыщении)	
	A375 (более низкий уровень EGFR)	A431 (высокий уровень EGFR)
Контроль EGFR	-	-
ADT1-4-2XADT3-2	101,9	99
ADT1-4-6XADT3-2	81,94	99,15
ADT1-4-138xADT3-2	75,34	98,73



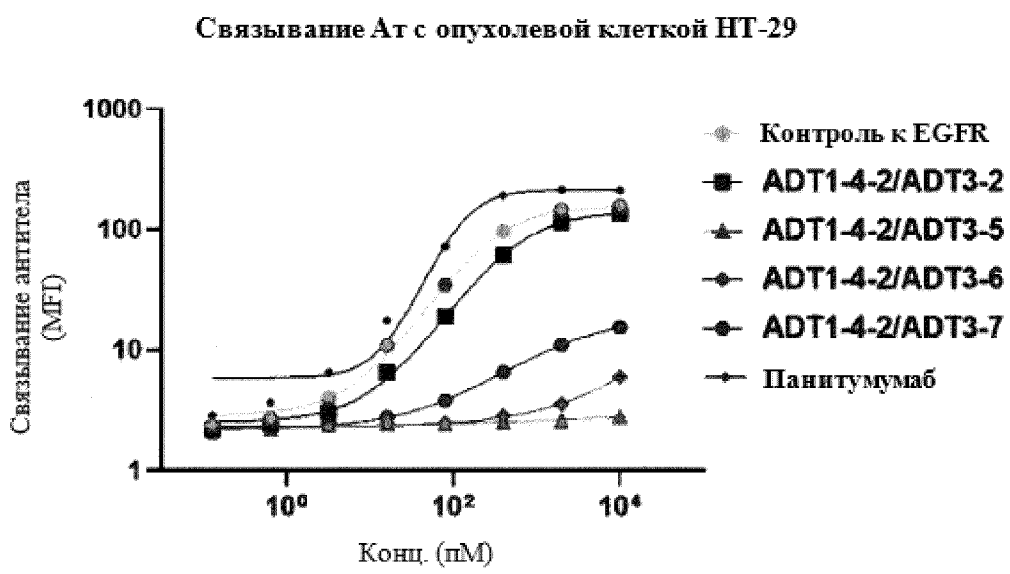
Антитело	% изменения дегрануляции (при насыщении)	
	A375 (более низкий уровень EGFR)	A431 (высокий уровень EGFR)
Контроль EGFR	-	-
ADT1-4-2xADT3-2	34,86	42,92
ADT1-4-6xADT3-2	28,09	38,77
ADT1-4-138xADT3-2	12,04	33,13

Фиг. 35, продолжение

(A)

Антитело	Условное название (если есть)	Аффинность к EGFR (нМ)	Отсутствие изменений по сравнению с последовательностью иммуноглобулина дикого типа.		
			Петля AB	Петля CD	Петля EF
ADT1-4-2	-	-	0	0	0
ADT1-4-2xADT3-1	ADT1-4-2xFS1-67	1,37	5	3	5
ADT1-4-2xADT3-2	ADT1-4-2xLEE	1,49	4	3	5
ADT1-4-2xADT3-3	ADT1-4-2xFS1-65	1,35	6	3	5
ADT1-4-2xADT3-4	ADT1-4-2x747	2,35	5(+1)	3	5
ADT1-4-2xADT3-5	ADT1-4-2xLEE1	142	0	3	5
ADT1-4-2xADT3-6	ADT1-4-2xLEE2	19,2	4	0	5
ADT1-4-2xADT3-7	ADT1-4-2XLEE3	8,63	4	3	3

(B)

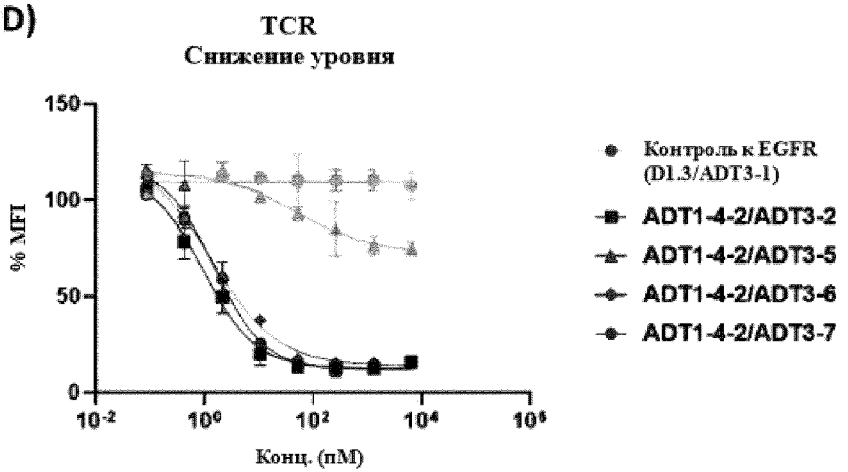


Фиг. 3б

(C)

Антитело	Условное название антитела	EC50 (нМ)	MFI (при насыщении)
Контроль к EGFR (D1.3/ADT3-1)	-	0,2808	158,4
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2XLEE	0,5374	138,9
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2XLEE1	Невозможно определить	Невозможно определить
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2xLEE2	Невозможно определить	Невозможно определить
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2xLEE3	Невозможно определить	Невозможно определить
Панитумумаб	-	0,1217	208,9

D)

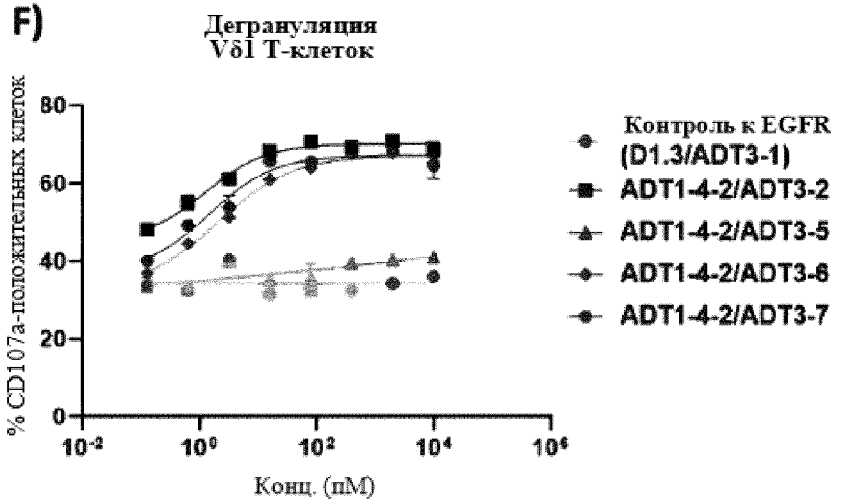


E)

Антитело	Условное название антитела	EC50 (нМ)	% изменения (при насыщении EC100)
Контроль к EGFR (D1.3/ADT3-1)	-	Н/П	Без изменений
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	0.9499	96,75
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2xLEE1	51,87	36,85
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2xLEE2	1,319	95,55
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2/LEE3	1,506	97,4

Фиг. 36, продолжение

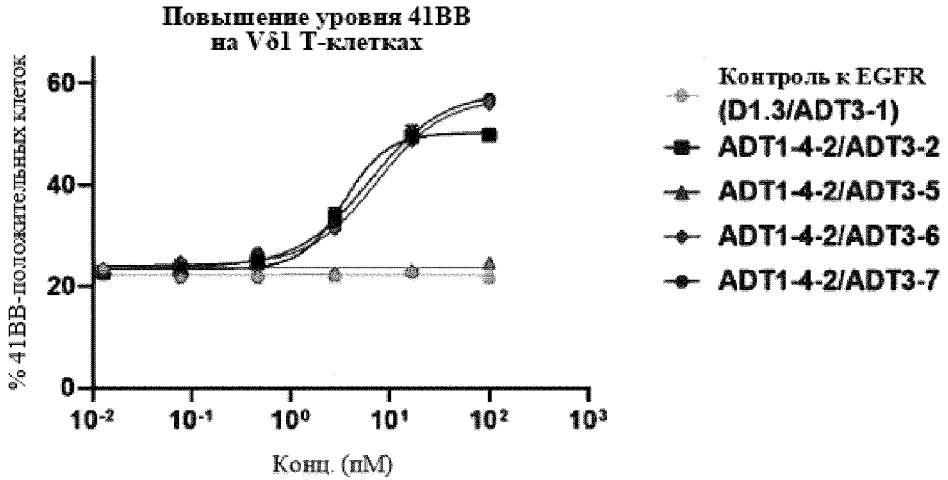
F)



G)

Антитело	Условное название антитела	EC50 (пМ)	EC95 (пМ)	% включения CD107a+ (при насыщении)
Контроль к EGFR (D1.3/ADT3-1)	-	Н/П	Н/П	Без изменений
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2XLEE	1,292	41,86	36,53
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2XLEE1	Невозможно определить	Невозможно определить	7,37
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2XLEE2	2,112	155,7	33,54
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2xLEE3	1,473	61,02	33,53

H)

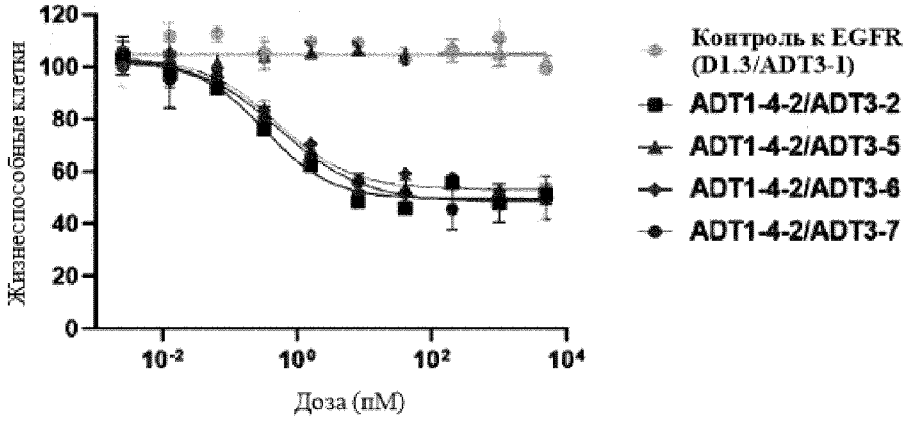


I)

Антитело	Условное название антитела	EC50 (пМ)	EC95 (пМ)	% вкл. 41BB+ (при насыщении EC100)
Контроль к EGFR (D1.3/ADT3-1)	-	Н/П	Н/П	Без изменений
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	3,453	15,06	26,28
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2XLEE1	Невозможно определить	Невозможно определить	Без изменений
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2xLEE2	7,388	73,47	33,18
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2xLEE3	6,369	75,8	34,4

Фиг. 36, продолжение

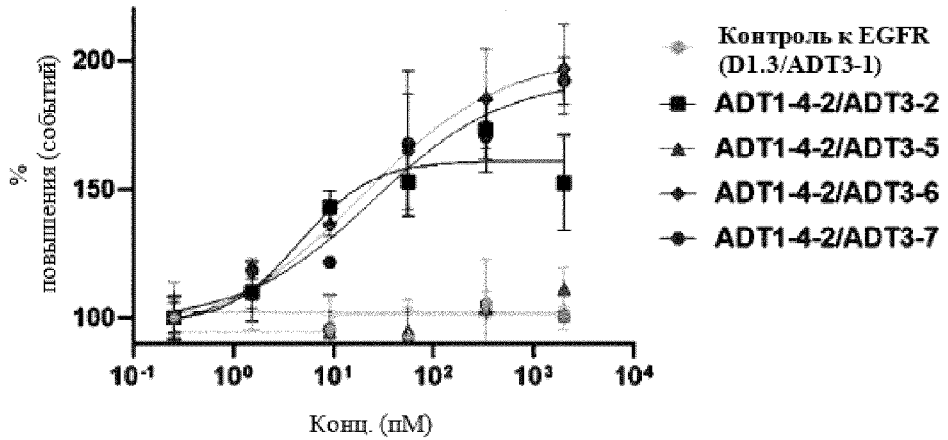
J)



K)

Антитело	Условное название антитела	EC50 (пМ)	% уничтожения (при насыщении)
Контроль к EGFR (D1.3/ADT3-1)	-	Н/П	Без изменений
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2XLEE	0,3249	47,01
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2xLEE1	Н/П	Без изменений
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2XLEE2	0,5055	49,26
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2xLEE3	0,5372	44,57

L)

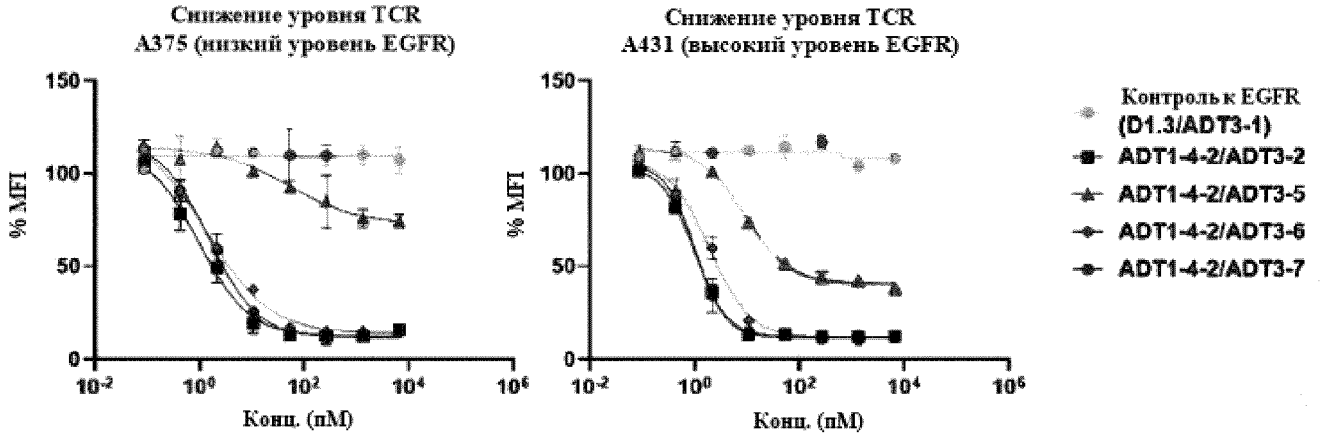


M)

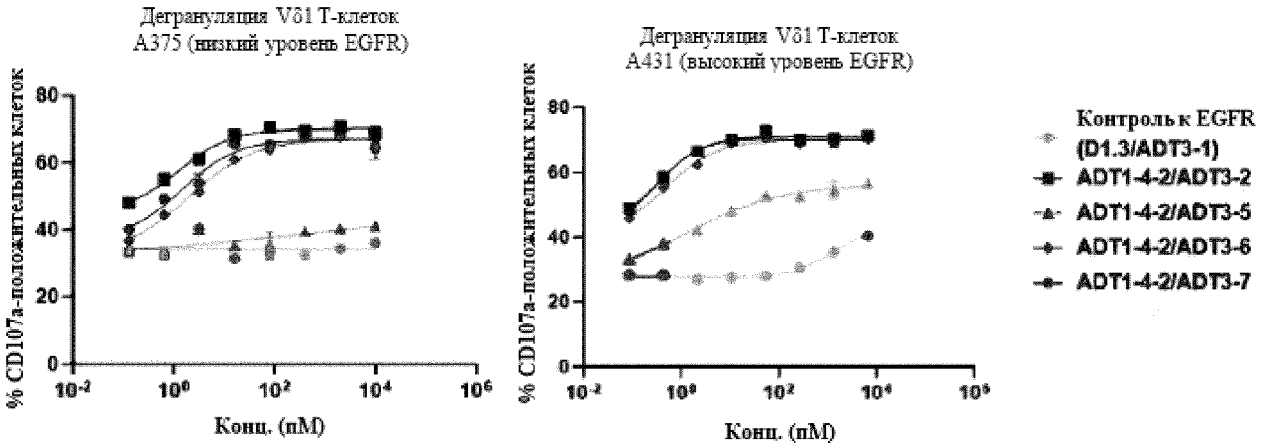
Антитело	Условное название антитела	EC50 (пМ)	% общего кол-ва Vδ1 при насыщении)
Контроль к EGFR (D1.3/ADT3-1)	-	Н/П	Без изменений
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	4,650	161,1
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2XLEE1	Н/П	Без изменений
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2XLEE2	19,03	202,2
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2xLEE3	25,41	193,5

Фиг. 36, продолжение

N)



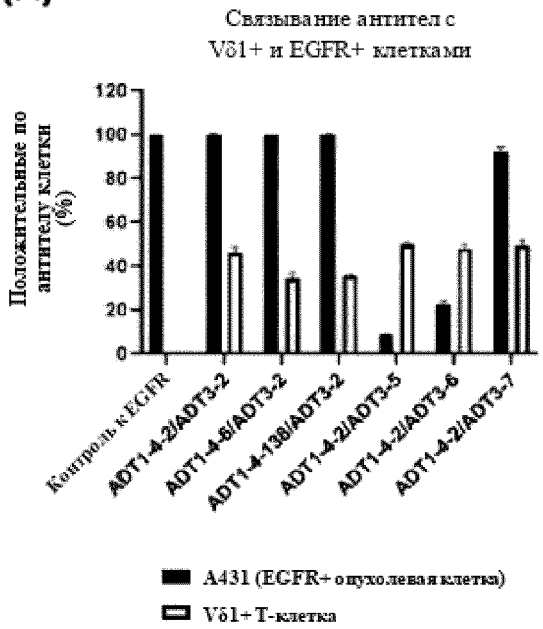
Антитело	% изменения TCR (при насыщении)	
	A375 (низкий уровень EGFR)	A431 (высокий уровень EGFR)
Контроль к EGFR (D1.3/ADT3-1)	Без изменений	Без изменений
ADT1-4-2/ADT3-2	96,75	98,7
ADT1-4-2/ADT3-5	36,85	70,5
ADT1-4-2/ADT3-6	95,55	99,1
ADT1-4-2/ADT3-7	97,4	99,19



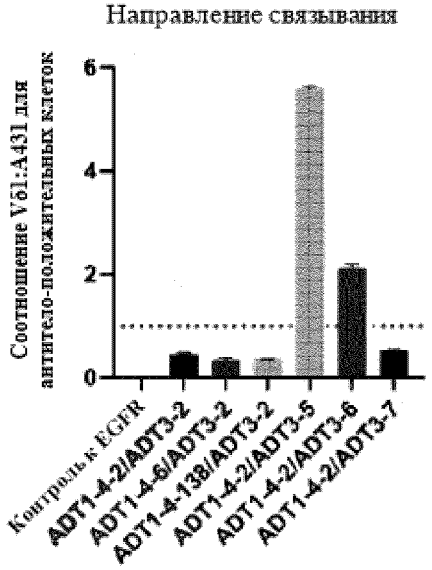
Антитело	% изменения дегрануляции (при насыщении)	
	A375 (низкий уровень EGFR)	A431 (высокий уровень EGFR)
Контроль к EGFR (D1.3/ADT3-1)	Без изменений	14,13
ADT1-4-2/ADT3-2	36,53	42,96
ADT1-4-2/ADT3-5	7,37	28,06
ADT1-4-2/ADT3-6	33,54	41,8
ADT1-4-2/ADT3-7	33,53	42,12

Фиг. 36, продолжение

(A)



(B)

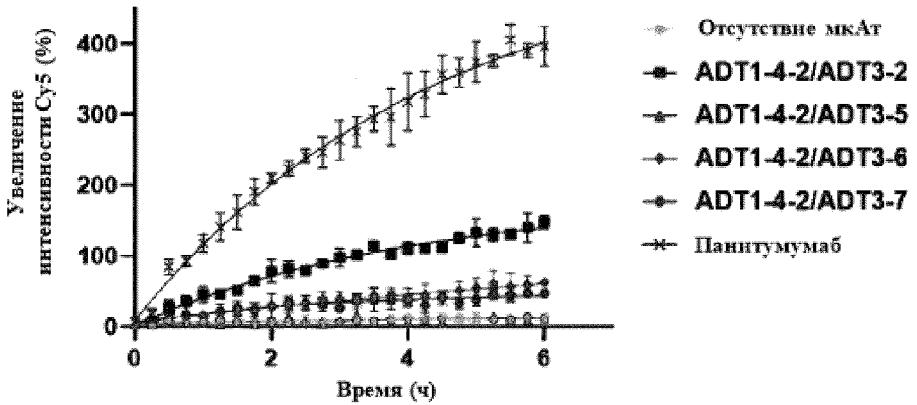


(C)

Антитело	Условное название антитела	Соотношение Vδ1:A431 для антитело-положительных клеток
Контроль к EGFR (D1.3/ADT3-1)	D1.3XFS1-67	Отсутствие связывание с Vδ1
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	0,46
ADT1-4-6/ADT3-2	ADT1-4-6XLEE	0,34
ADT1-4-138/ADT3-2	ADT1-4-138XLEE	0,36
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2xLEE1	5,61
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1 4 2xLEE2	2,13
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2XLEE3	0,53

Фиг. 37

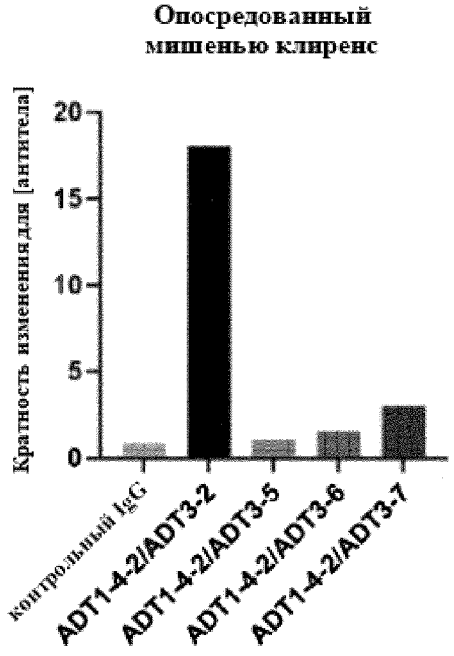
(A)



(B)

Антитело	Условное название антитела	% внутриклеточного увеличения сигнала Cy5 через 8,5 ч
Отсутствие мкАт	Н/П	13,1
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	147,8
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2xLEE1	11,6
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2xLEE2	63,7
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2XLEE3	50,8
Панитумумаб	Н/П	396,2

(C)

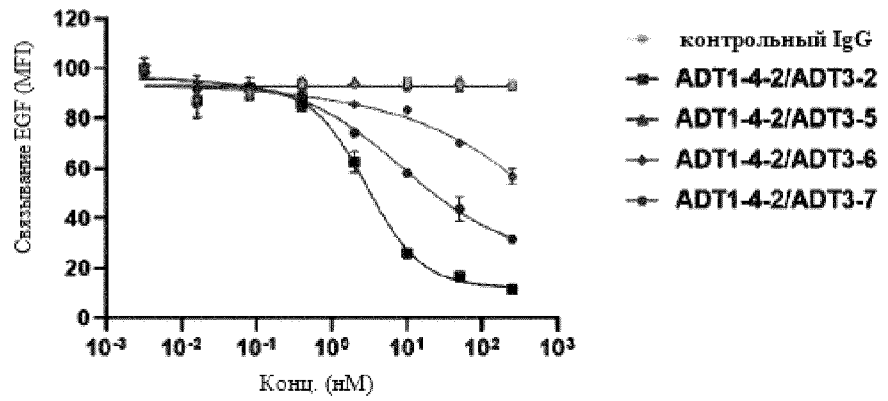


(D)

Антитело	Условное название антитела	Кратность снижения концентрации антител
контрольный IgG	Н/П	0,86
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	18,07
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2xLEE1	1,08
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2xLEE2	1,56
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2XLEE3	3,02

Фиг. 38

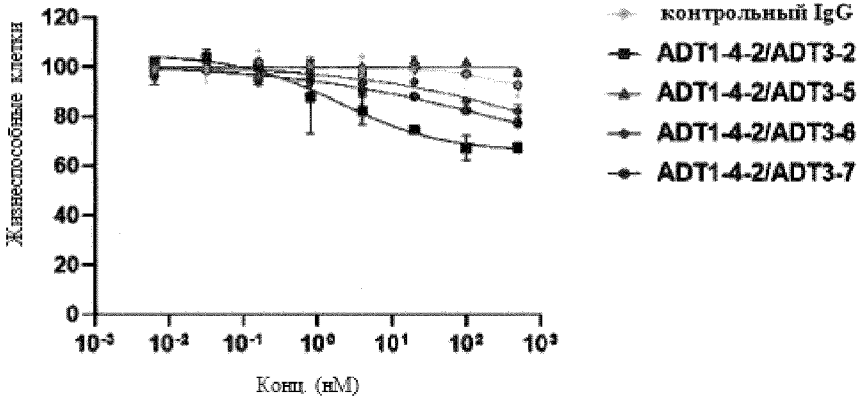
(A)



(B)

Антитело	Условное название антитела	EC50 (нМ)	% снижения связывания лиганда EGF при 250 нМ антитела
Контроль IgG (IgG к RSV)	Н/П	Н/П	Незначительное изменение.
ADT1-4 2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	2,915	88,33
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2XLEE1	Невозможно определить	Незначительное изменение.
ADT1-4 2/ADT3 6	ADT1-4 2xLEE2	Невозможно определить	43,12
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2XLEE3	8,657	68,24

(C)

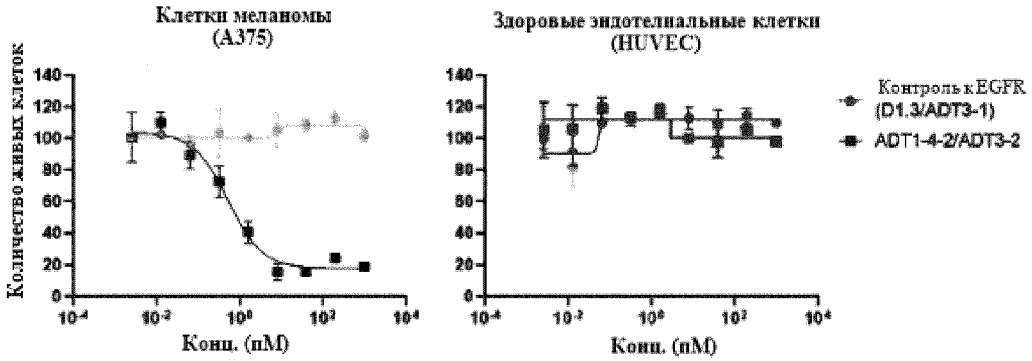


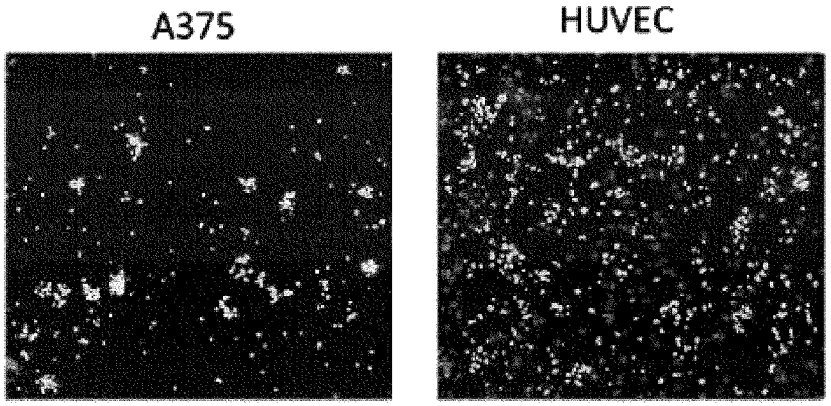
(D)

Антитело	Условное название антитела	EC50 (нМ)	% снижения при 500 нМ антитела
Контроль IgG (IgG к RSV)	Н/П	Н/П	Незначительное изменение.
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	2,038	32,6
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2xLEE1	Невозможно определить	Незначительное изменение.
ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2XLEE2	1654	17,9
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2xLEE3	234,4	22,4

Фиг. 39

(A)



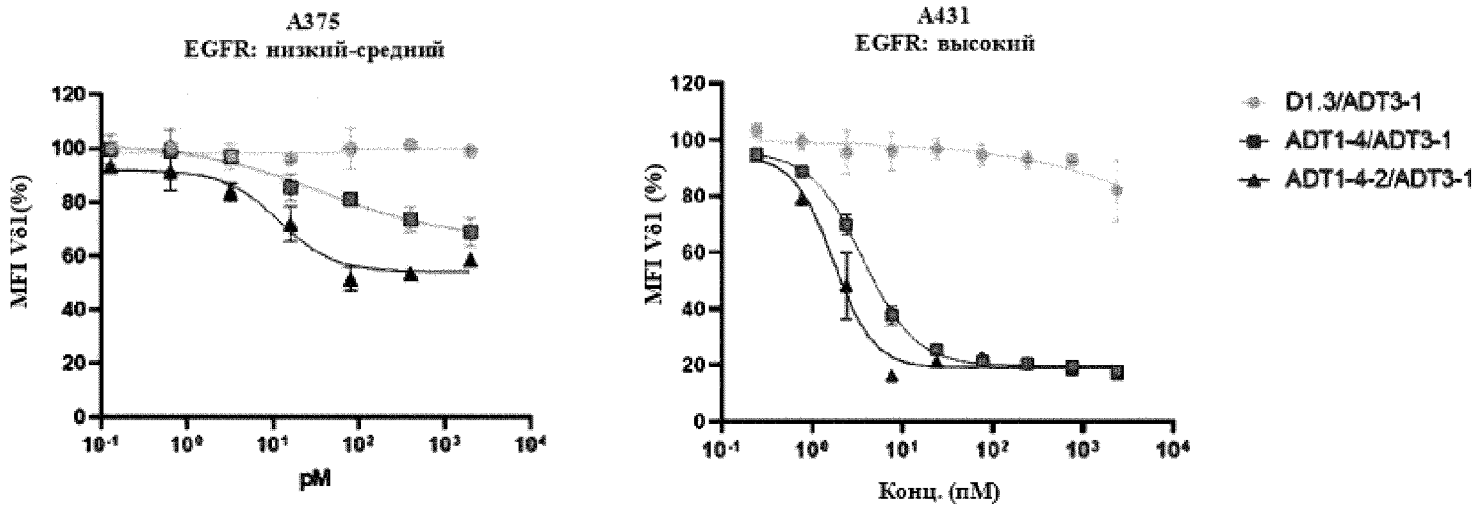


(C)

Антитело	EC50 (nM)	% уничтожения (при насыщении)
A375	0,5091	86,2
HUVEC	Н/П	Без изменений

Фиг. 40

(A)

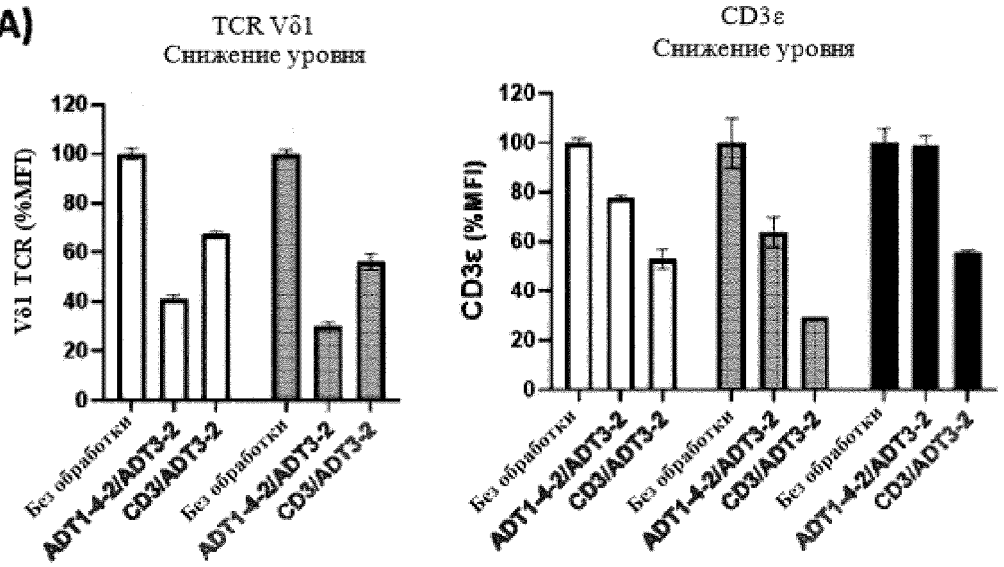


(B)

Антитело	Условное название антитела	A375		A431	
		EC95 (nM)	% изменения TCR (при насыщении)	EC95 (nM)	% изменения TCR (при насыщении)
D1.3/ADT3-1	D1.3xFS1-67	Н/П	Без изменений	Н/П	Без изменений
ADT1-4/ADT3-1	ADT1-4XFS1-67	5896	34,0	26,3	80,3
ADT1-4-2/ADT3-1	ADT1-4-2XFS1-67	100,8	46,0	7,9	81,1

Фиг. 41

(A)



Пояснения к Фиг. (A)

Штриховка гистограммы	Популяция клеток	$CD3^+Vδ1^+$ (%)	CD3+Vδ1- (%)
	Полученные из кожи, обогащенные Vδ1	65,0	24,9
	Полученные из крови, обогащенные Vδ1	72,8	12,4
	PBMC	0,08	29,9

(B)

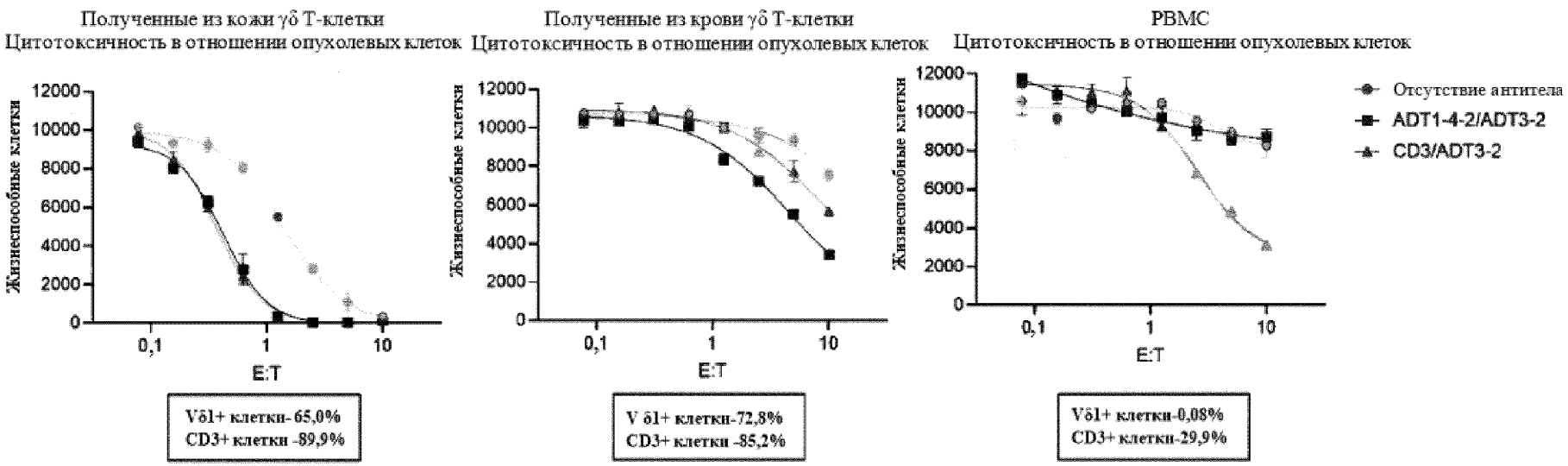
Антитело	Условное название антитела	Vδ1 TCR DR (%)	
		Полученные из кожи Vδ1 клетки	Полученные из крови Vδ1 клетки
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2XLEE	58,89	69,98
CD3/ADT3-2	CD3xLEE	32,83	43,82

(C)

Антитело	Условное название антитела	DR CD3ε (%)		
		Полученные из кожи Vδ1 клетки	Полученные из крови Vδ1 клетки	PBMC
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2XLEE	22,28	36,33	Без изменений
CD3/ADT3-2	CD3xLEE	47,17	70,41	44,33

Фиг. 42

(D)

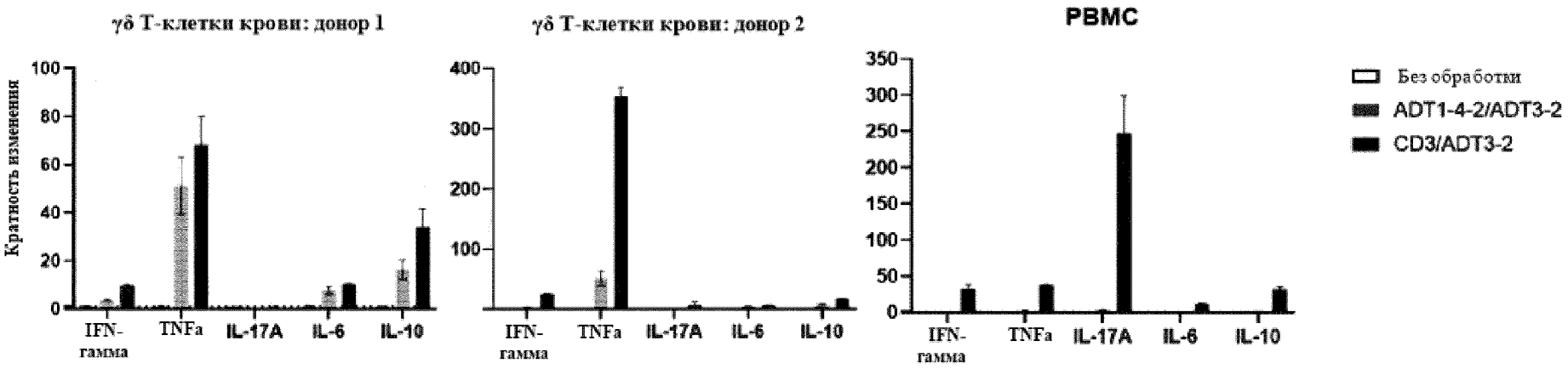


(E)

Антитело	Условное название антитела	Целевая субпопуляция	Оценка цитотоксичности в отношении опухоли		
			Полученные из кожи γδ Т-клетки	Полученные из крови γδ Т-клетки	PBMC
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	Vδ1+	++	++	-
CD3/ADT3-2	CD3xLEE	CD3+	++	+	++

Фиг. 42, продолжение

(F)



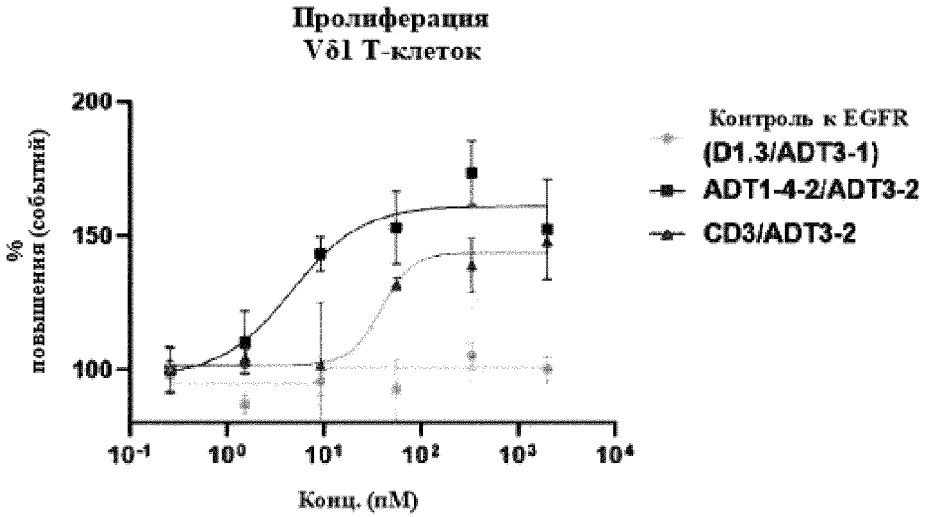
(G)

Антитело	Условное название антитела	TNFa (кратность увеличения)		
		Полученные из кожи Vδ1 клетки	Полученные из крови Vδ1 клетки	PBMC
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	51,2	52,0	2,0
CD3/ADT3-2	CD3xLEE	68,4	353,1	38,1

Антитело	Условное название антитела	IL-17A (кратность увеличения)		
		Полученные из кожи Vδ1 клетки	Полученные из крови Vδ1 клетки	PBMC
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	Отсутствие увеличения	Отсутствие увеличения	2,8
CD3/ADT3-2	CD3XLEE	Отсутствие увеличения	7	247,5

Фиг. 42, продолжение

(H)



(I)

Антитело	Условное название антитела	EC50 (nM)	% общего кол-ва Vδ1 при насыщении)
Контроль к EGFR (D1.3/ADT3-1)	-	Н/П	Без изменений
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	4,65	161,1
CD3/ADT3-2	CD3XLEE	38,98	143,7

Фиг. 42, продолжение