



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119320** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C07K 16/30** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2015 09085</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Бакак Маріна (CH),</b> <b>Хофер Томас (CH),</b> <b>Хоссе Ральф (CH),</b> <b>Йсгер Крістіане (CH),</b> <b>Кляйн Крістіан (CH),</b> <b>Мьоснер Еккехард (CH),</b> <b>Умана Пабло (CH),</b> <b>Вайнцірль Тіна (CH)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>24.02.2014</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>РОШ ГЛІКАРТ АГ,</b> Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren, Switzerland (CH)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.06.2019</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>13156686.1</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2012158818 A2, 22.11.2012 WO 9601126 A1, 18.01.1996 WO 2010136172 A1, 02.12.2010 HONEYCHURCH J. et al. Bispecific Ab therapy of B-cell lymphoma: target specificity of antibody derivatives appears critical in determining therapeutic outcome. Cancer immunology immunotherapy, 1997, Vol. 45, P. 171 – 173 RIEDLE S. et al. In vivo activation and expansion of T cells by a bi-specific antibody abolishes metastasis formation of human melanoma cells in SCID mice. International journal of cancer, 1998, Vol. 75, P. 908 – 918 TORISU-ITAKURA H. et al. Redirected lysis of human melanoma cells by a MCSP/CD3-bispecific BiTE antibody that engages patient-derived T cells. Journal of immunotherapy, 2011, Vol. 34, no. 8, P. 597 – 605
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>26.02.2013</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>EP</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>12.01.2016, Бюл.№ 1</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.06.2019, Бюл.№ 11</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/EP2014/053490, 24.02.2014</b>	

**(54) АКТИВУЮЧА Т-КЛІТИНИ БІСПЕЦИФІЧНА АНТИГЕНЗВ'ЯЗУВАЛЬНА МОЛЕКУЛА****(57) Реферат:**

Винахід стосується активуючої Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка містить перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, другий і третій антигензв'язувальні фрагменти, кожний з яких являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CEA, та

UA 119320 C2

Fc-домен, що складається з першої й другої субодиниць, які мають здатність до стабільної асоціації, де другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на C-кінці Fab важкого ланцюга з N-кінцем Fab важкого ланцюга першого антигензв'язувального фрагмента, і перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на C-кінці Fab важкого ланцюга з N-кінцем першої субодиниці Fc-домену, і в якій третій антигензв'язувальний фрагмент злитий на C-кінці Fab важкого ланцюга з N-кінцем другої субодиниці Fc-домену.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід в цілому відноситься до біспецифічних антигензв'язувальних молекул, призначених для активації Т-клітин. Крім того, даний винахід відноситься до полінуклеотидів, що кодують зазначені біспецифічні антигензв'язувальні молекули, і до векторів і клітин-хазяїв, що містять зазначені полінуклеотиди. Винахід відноситься також до способів одержання біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які запропоновані у винаході, й до способів застосування таких біспецифічних антигензв'язувальних молекул для лікування захворювання.

Передумови створення винаходу

В різних клінічних ситуаціях часто є необхідною вибіркова деструкція індивідуальної клітини або конкретного типу клітин. Наприклад, основною задачею при терапії раку є руйнування саме пухлинних клітин зі збереженням при цьому в інтактному й неушкодженному стані здорових клітин і тканин.

Перспективним підходом для досягнення цієї мети є індукція імунної відповіді проти пухлини, при якій імунні ефекторні клітини, такі як природні клітини-кілери (NK) або цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL), атакують і руйнують пухлинні клітини. CTL представляють собою найбільш ефективні ефекторні клітини імунної системи, однак вони не можуть активуватися ефекторним механізмом, опосередкованим Fc-доменом канонічних терапевтичних антитіл.

У цьому плані в останні роки збільшився інтерес до біспецифічних антитіл, призначених для зв'язування за допомогою одного "плеча" з поверхневим антигеном на клітині-мішені, а за допомогою другого "плеча" з активувальним інваріантним компонентом комплексу Т-клітинного рецептора (TCR). Одночасне зв'язування такого антитіла з обома його мішенями повинно приводити до часової взаємодії між клітиною-мішенню і Т-клітиною, викликаючи активацію будь-якої цитотоксичної Т-клітини і наступний лізис клітини-мішені. Таким чином, імунна відповідь переорієнтується до клітин-мішеней і не залежить від презентації пептидного антигену клітиною-мішенню або специфічності Т-клітини, що має місце при нормальній обмеженій ГКГС активації CTL. В цьому контексті вирішальне значення має те, що CTL активуються тільки тоді, коли клітина-мішень презентує їм біспецифічне антитіло, тобто має місце імітація імунологічного синапсу. Найбільш переважними є біспецифічні антитіла, для яких не потрібно попереднє кондиціонування або співстимуляція лімфоцитів для того, щоб викликати ефективний лізис клітин-мішеней.

Розроблено декілька форматів біспецифічних антитіл і вивчена можливість їх застосування для опосередкованої Т-клітинами імунотерапії. Серед них дуже гарно охарактеризовані так звані молекули BiTE (біспецифічний активатор Т-клітини) і вже встановлена їх певна перспективність у клінічних дослідженнях (див. огляд Nagorsen and Bäuerle, *Exp Cell Res* 317, 12011, сс. 255-1260). BiTE представляють собою тандемні молекули scFv, в яких дві молекули scFv злиті за допомогою гнучкого лінкера. Крім того, для активації (здійняння в процес) Т-клітин досліджували біспецифічні формати, включаючи димерні антитіла (діабоді) (Holliger та інш., *Prot Eng* 9, 1996, сс. 299-305) і їх похідні, такі як тандемні димерні антитіла (Kipriyanov та інш., *J Mol Biol* 293, 1999, сс. 41-66). В останні роки розроблені так звані молекули DART (переорієнтувальні антитіла з подвійною афінністю), основані на форматі димерних антитіл, але які відрізняються С-кінцевим дисульфідним містком, який призначений для додаткової стабілізації (Moore та інш., *Blood* 117, 2011, сс. 4542-4551). Так звані триомаби (трифункціональні антитіла), які представляють собою повні гібридні мишачі/щурячі IgG-молекули і які також в даний час проходять клінічні дослідження, представляють собою молекули більш великого формату (див. огляд Seimetz та інш., *Cancer Treat Rev* 36, 2010, сс. 458-467).

Продemonстровано, що різні розроблювані формати мають великий потенціал для імунотерапії, пов'язаний з Т-клітинною переорієнтацією й активацією. Однак задача створення придатних для цього біспецифічних антитіл ніяким чином не є тривіальною, а потребує рішення низки проблем, пов'язаних з вимогами ефективності, токсичності, застосовності й технологічності антитіл.

Невеликі конструкції, такі, наприклад, як молекули BiTE, хоча вони мають здатність ефективно перехресно зв'язувати ефекторні клітини і клітини мішені, мають дуже короткий час напівжиття у сироватці, що потребує їх введення пацієнтам шляхом безперервної інфузії. З іншого боку, IgG-подібні формати, хоча вони мають значні переваги з позицій тривалого часу напівжиття, мають такий недолік як токсичність, асоційована з нативними ефекторними функціями, які придатні молекулам IgG. Їх імуногенний потенціал являє собою іншу характеристику IgG-подібних біспецифічних антитіл, насамперед нелюдського формату, несприятливу з позицій їх успішного терапевтичного застосування. І, насамкінець, основною проблемою при звичайному підході до створення біспецифічних антитіл є одержання

біспецифічних конструкцій антитіл в достатній для клінічних досліджень кількості і які мають достатню чистоту, ця проблема пов'язана з помилковим спарюванням важких і легких ланцюгів антитіл з різними специфічностями при сумісній експресії, що знижує вихід правильно зібраної конструкції і призводить до одержання низки нефункціональних побічних продуктів, від яких

3 урахуванням труднощів і недоліків, притаманним доступним в даний час біспецифічним антитілам, призначеним для опосередкованої Т-клітинами імунотерапії, зберігається потреба у створенні нових покращених форматів зазначених молекул. У даному винаході запропоновані біспецифічні антигензв'язувальні молекули, створені для активації і переорієнтації Т-клітин, в яких об'єднані висока ефективність і технологічність з низькою токсичністю і переважними фармакокінетичними властивостями.

Коротке викладення суті винаходу

Першим об'єктом даного винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить

15 (I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, який містить щонайменше одну визначальну комплементарність ділянку (гіперваріабельну ділянку, CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;

20 (II) другий антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені.

В одному з варіантів здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 і SEQ ID NO: 33, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 31.

30 В одному з варіантів здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 7.

35 В конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з карциноембріональним антигеном (CEA, CEACAM5) і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 і SEQ ID NO: 26, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30.

40 В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з CEA і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 23, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 27.

45 В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP (CSPG4) і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 40, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 і SEQ ID NO: 50.

50 В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з асоційованим з меланою хондроїтинсульфат протеогліканом (MCSP, CSPG4) і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID

NO: 16, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, і SEQ ID NO: 20.

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 41, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 і SEQ ID NO: 51.

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 13, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 17.

В конкретному варіанті здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент являє собою одержану в результаті кросингверу молекулу Fab, в якій обмінені або варіабельні, або константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab. В ще більш переважному варіанті здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент являє собою одержану в результаті кросингверу молекулу Fab, в якій обмінені константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab.

В одному з варіантів здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент являє собою канонічну молекулу Fab.

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу не більше одного антигензв'язувального фрагмента, що має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, є присутнім в активувальній Т-клітині біспецифічній антигензв'язувальній молекулі (тобто активувальна Т-клітині біспецифічна антигензв'язувальна молекула забезпечує одновалентне зв'язування з CD3).

В іншому варіанті здійснення винаходу зазначена активувальна Т-клітині біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить третій антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена третя антигензв'язувальна молекула являє собою канонічну молекулу Fab. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена третя антигензв'язувальна молекула ідентична другому антигензв'язувальному фрагменту.

В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена активувальна Т-клітині біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить третій антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CEA, і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 і SEQ ID NO: 26, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 30.

В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена активувальна Т-клітині біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить третій антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CEA, і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 23, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 27.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена активувальна Т-клітині біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить третій антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 40, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 і SEQ ID NO: 50.

В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена активувальна Т-клітині біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить третій антигензв'язувальний фрагмент, який

являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 16, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 і SEQ ID NO: 20.

5 В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить третій антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 41, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 і SEQ ID NO: 51.

15 В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить третій антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17.

20 В деяких варіантах здійснення винаходу перший і другий антигензв'язувальні фрагменти активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули злиті один з іншим необов'язково через пептидний лінкер. В одному із зазначених варіантів здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента. В іншому зазначеному варіанті здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента. В варіантах здійснення винаходу, в яких або (I) другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента, або (II) перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента, додатково легкий ланцюг Fab першого антигензв'язувального фрагмента і легкий ланцюг Fab другого антигензв'язувального фрагмента можуть бути злиті один з іншим необов'язково через пептидний лінкер.

35 В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить (III) Fc-домен, що складається з першої й другої субодиниць, які мають здатність до стабільної асоціації.

40 В одному з варіантів здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. В іншому варіанті здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. В одному з варіантів здійснення винаходу перший і другий антигензв'язувальні фрагменти активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули кожний злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену.

45 В одному з варіантів здійснення винаходу третій антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. В конкретному варіанті здійснення винаходу другий і третій антигензв'язувальні фрагменти активувальної Т-клітини антигензв'язувальної молекули кожний злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, і перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу перший і третій антигензв'язувальні фрагменти активувальної Т-клітини антигензв'язувальної молекули кожний злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, а другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента. Компоненти активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули можна зливати безпосередньо або через прийнятні пептидні лінкери. В одному з варіантів здійснення винаходу перший і третій антигензв'язувальні фрагменти і Fc-домен утворюють частину молекули імуноглобуліну.

60 В конкретному варіанті здійснення винаходу молекула імуноглобуліну являє собою імуноглобулін класу IgG. В ще більш переважному варіанті здійснення винаходу імуноглобулін

являє собою імуноглобулін підкласу IgG<sub>1</sub>. В іншому варіанті здійснення винаходу імуноглобулін являє собою імуноглобулін підкласу IgG<sub>4</sub>.

В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG<sub>1</sub>. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG<sub>4</sub>. Ще в одному конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG<sub>4</sub>, який містить амінокислотну заміну S228P (нумерація за Кеботом). В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен є людським Fc-доменом.

В конкретних варіантах здійснення винаходу Fc-домен містить модифікацію, яка сприяє асоціації першої й другої субодиниць Fc-домену. В зазначеному конкретному варіанті здійснення винаходу амінокислотний залишок в CH3-домені першої субодиниці Fc-домену замінюють на амінокислотний залишок, що має більший об'єм бокового ланцюга, створюючи тим самим опуклість в CH3-домені першої субодиниці, яка може поміщатися в порожнину в CH3-домені другої субодиниці, а амінокислотний залишок в CH3-домені другої субодиниці Fc-домену замінюють на амінокислотний залишок, що має менший об'єм бокового ланцюга, створюючи тим самим порожнину в CH3-домені другої субодиниці, в яку може поміщатися опуклість в CH3-домені першої субодиниці.

В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен має знижену афінність зв'язування з Fc-рецептором і/або зниженою ефекторною функцією у порівнянні з нативним Fc-доменом IgG<sub>1</sub>. В деяких варіантах здійснення винаходу Fc-домен створюють так, щоб він мав знижену афінність зв'язування з Fc-рецептором і/або знижену ефекторну функцію у порівнянні з не створеним за допомогою інженерії Fc-доменом. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен містить одну або декілька амінокислотну(їх) заміну(н), яка(ї) знижує(ють) зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію. В одному з варіантів здійснення винаходу одна або декілька амінокислотна(їх) заміна(н) в Fc-домені, яка(ї) знижує зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію, знаходиться(яться) в одному або декількох положеннях, вибраних з групи, що містить L234, L235 і P329 (нумерація за Кеботом). В конкретних варіантах здійснення винаходу кожна субодиниця Fc-домену містить три амінокислотні заміни, які знижують зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію, де зазначені амінокислотні заміни представляють собою L234A, L235A і P329G. В одному із зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG<sub>1</sub>, зокрема Fc-домен людського IgG<sub>1</sub>. В інших варіантах здійснення винаходу кожна субодиниця Fc-домену містить дві амінокислотні заміни, які знижують зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію, де зазначені амінокислотні заміни представляють собою L235E і P329G. В одному із зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG<sub>4</sub>, зокрема, Fc-домен людського IgG<sub>4</sub>. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули являє собою Fc-домен IgG<sub>4</sub> і містить амінокислотні заміни L235E і S228P (SPLE).

В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою Fcγ-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою людський Fc-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою активувальний Fc-рецептор. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою людський FcγRIIa, FcγRI і/або FcγRIIIa. В одному з варіантів здійснення винаходу ефекторна функція являє собою антитіло-зумовлену клітинно-залежну цитотоксичність (ADCC).

Іншим об'єктом винаходу є виділений полінуклеотид, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході, або її фрагмент. Винахід відноситься також до поліпептидів, які кодуються полінуклеотидами, що запропоновані у винаході. Винахід відноситься також до експресійного вектора, що містить виділений полінуклеотид, запропонований у винаході, і клітини-хазяїна, що містить виділений полінуклеотид або експресійний вектор, запропонований у винаході. В деяких варіантах здійснення клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину, зокрема, клітину ссавця.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб одержання активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, який полягає у тому, що здійснюють стадії, на яких а) культивують клітину-хазяїна, запропоновану у винаході, в умовах, придатних для експресії активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, і б) виділяють активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу. Винахід відноситься також до активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, одержаної способом, запропонованим у винаході.

Винахід відноситься також до фармацевтичної композиції, що містить активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході, і фармацевтично прийнятний носій.

Під об'єм винаходу підпадають також способи застосування активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули і фармацевтичної композиції, які запропоновані у винаході. Одним з об'єктів винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула або фармацевтична композиція, запропонована у винаході, призначена для застосування як лікарського засобу. Одним з об'єктів винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула або фармацевтична композиція, запропонована у винаході, призначена для застосування при лікуванні захворювання в індивідуума, який цього потребує. В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак.

Запропоновано також застосування активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, для приготування лікарського засобу для лікування захворювання в індивідуума, який цього потребує; а також спосіб лікування захворювання в індивідуума, який полягає у тому, що вводять зазначеному індивідууму в терапевтично ефективній кількості композицію, яка містить активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході, у фармацевтично прийнятній формі. В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак. У будь-якому з перерахованих вище варіантів здійснення винаходу індивідуум переважно являє собою ссавця, насамперед людину.

У винаході також запропонований спосіб індукції лізису клітини-мішені, зокрема, пухлинної клітини, який полягає у тому, що приводять у контакт клітину-мішень з активувальною Т-клітини біспецифічною антигензв'язувальною молекулою, яка пропонується у винаході, в присутності Т-клітини, зокрема цитотоксичної Т-клітини.

Короткий опис креслень

На кресленнях показано:

на фіг. 1 - приклади конфігурацій активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул (TCB), які запропоновані у винаході. (А) Ілюстрація молекули "1+1 IgG Crossfab". (Б) Ілюстрація молекули "2+1 IgG Crossfab". (В) Ілюстрація молекули "2+1 IgG Crossfab" з альтернативним порядком розташування компонентів, що являють собою Crossfab і Fab ("інвертована"). (Г) Ілюстрація молекули "1+1 CrossMab". (Д) Ілюстрація молекули "2+1 IgG Crossfab, зв'язаний легкий ланцюг". (Е) Ілюстрація молекули "1+1 IgG Crossfab, зв'язаний легкий ланцюг". (Ж) Ілюстрація молекули "2+1 IgG Crossfab, інвертована, зв'язаний легкий ланцюг". (З) Ілюстрація молекули "1+1 IgG Crossfab, інвертована, зв'язаний легкий ланцюг". Чорна крапка: необов'язкова модифікація в Fc-домені, що сприяє гетеродимеризації;

на фіг. 2 - порівняльний аналіз первинної структури клонів антитіл до MCSP з дозрілою афінністю відносно батьківського клону з недозрілою афінністю (M4-3 ML2);

на фіг. 3 - схематичне зображення активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули до MCSP (TCB-молекула (антитіло) до MCSP) (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA, інвертована);

на фіг. 4 - результати, одержані за допомогою аналізу методом капілярного електрофорезу в присутності ДСН (KE-ДСН) TCB-молекули до MCSP (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA, інвертована, SEQ ID NO: 12, 53, 54 і 55). Електрофореграми представлені у вигляді результатів ДСН-ПААГ TCB-молекули до MCSP: А) невідновлювальні умови, Б) відновлювальні умови;

на фіг. 5 - схематичне зображення TCB-молекули до CEA (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA, інвертована);

на фіг. 6 - результати, одержані за допомогою KE-ДСН, TCB-молекули до CEA (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA, інвертована, SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58). Електрофореграми представлені у вигляді результатів ДСН-ПААГ TCB-молекули до CEA: А) невідновлювальні умови, Б) відновлювальні умови;

на фіг. 7 - результати аналізу зв'язування TCB-молекули до MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 і 55) з A375-клітинами (MCSP<sup>+</sup>) (А) і Jurkat (CD3<sup>+</sup>-клітини) (Б). "Неспрямована" TCB-молекула": біспецифічне антитіло, яке зв'язується з CD3, але не з другим антигеном (SEQ ID NO: 59, 60, 61 і 62);

на фіг. 8 - результати аналізу Т-клітинного цитолізу клітин-мішеней, індукованого TCB-антитілом до MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 і 55), одержані на клітинах ліній A375 (високий рівень MCSP) (А), MV-3 (середній рівень MCSP) (Б), HCT-116 (низький рівень MCSP) (В) і LS180 (MCSP-негативні) (Г) (Е:Т=10:1, як ефекторні клітини застосовували людські PBMC, тривалість



інкубації 24 год.). "Неспрямована" TCB-молекула": біспецифічне антитіло, яке зв'язується з CD3, але не з другим антигеном (SEQ ID NO: 59, 60, 61 і 62);

на фіг. 9 - результати аналізу підвищувальної регуляції CD25 і CD69 на людських CD8<sup>+</sup>-(А, Б) і CD4<sup>+</sup>-(В, Г)-Т-клітинах після опосередкованого Т-клітинами цитолізу клітин меланоми лінії MV3 (Е:Т=10:1, тривалість інкубації 24 год.), яка індукується TCB-антитілом до MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 і 55). "Неспрямована" TCB-молекула": біспецифічне антитіло, яке зв'язується з CD3, але не з другим антигеном (SEQ ID NO: 59, 60, 61 і 62);

на фіг. 10 - результати аналізу секреції IL-2 (А), IFN-γ (Б), TNFα (В), IL-4 (Г), IL-10 (Д) і гранзиму В (Е) людськими PBMC після опосередкованого Т-клітинами цитолізу клітин меланоми лінії MV3 (Е:Т=10:1, тривалість інкубації 24 год.), яка індукується TCB-антитілом до MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 і 55). "Неспрямована" TCB-молекула": біспецифічне антитіло, яке зв'язується з CD3, але не з другим антигеном (SEQ ID NO: 59, 60, 61 і 62);

на фіг. 11 - результати аналізу зв'язування TCB-молекули до CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58) з клітинами, що експресують CEA аденокарциноми легені лінії A549 (А) і з іморталізованими лініями, що експресують CD3 Т-лімфоцитів людини і мавп-циномолгус (Jurkat (Б) і HSC-F (В) відповідно);

на фіг. 12 - результати аналізу Т-клітинного цитолізу, індукованого TCB-молекулою до CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58), клітин лінії HPAFII (високий рівень CEA) (А, Д), ВхРС-3 (середній рівень CEA) (Б, Е), ASPC-1 (низький рівень CEA) (В, Ж) і НСТ-116 (CEA-негативні) (Г, З). Е:Т=10:1, як ефекторних клітин застосовували людські PBMC, тривалість інкубації 24 год. (А-Г) або 48 год. (Д-З). "Неспрямована" TCB-молекула": біспецифічне антитіло, яке зв'язується з CD3, але не з другим антигеном (SEQ ID NO: 59, 60, 61 і 62);

на фіг. 13 - результати аналізу проліферації людських CD8<sup>+</sup>- і CD4<sup>+</sup>-Т-клітин (А-Г) і підвищувальної регуляції CD25 на людських CD8<sup>+</sup>- і CD4-Т-клітинах (Д-З) через 5 днів після опосередкованого Т-клітинами цитолізу клітин лінії HPAFII (високий рівень CEA) (А, Д), ВхРС-3 (середній рівень CEA) (Б, Е), ASPC-1 (низький рівень CEA) (В, Ж) і НСТ-116 (CEA-негативні) (Г, З), індукованого TCB-молекулою до CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58).

"TCB DP47": біспецифічне антитіло, яке зв'язується з CD3, але не з другим антигеном (SEQ ID NO: 59, 60, 61 і 62);

на фіг. 14 - результати аналізу секреції IFN-γ (А), TNFα (Б), гранзиму В (В), IL-2 (Г), IL-6 (Д) і IL-10 (Е) після опосередкованого Т-клітинами цитолізу пухлинних клітин лінії MKN45 (Е:Т=10:1, тривалість інкубації 48 год.), індукованого молекулою TCB до CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58). "Неспрямована" TCB-молекула": біспецифічне антитіло, яке зв'язується з CD3, але не з другим антигеном (SEQ ID NO: 59, 60, 61 і 62);

на фіг. 15 - результати аналізу опосередкованого Т-клітинами цитолізу пухлинних клітин-мішеней LS180, які експресують CEA, індукованого TCB-молекулою до CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58) в присутності збільшуваних концентрацій CEA, що секретується (sCEA), при оцінюванні через 24 год. (А) або 48 год. (Б) після інкубації з TCB-молекулою до CEA і sCEA;

на фіг. 16 - результати аналізу опосередкованого Т-клітинами цитолізу клітин лінії A549 (аденокарцинома легені), що надекспресують людський CEA (A549-hCEA), одержані через 21 год. (А, Б) і 40 год. (В, Г) після інкубації з молекулою TCB до CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58) і людськими PBMC (А, В) або PBMC мавп-циномолгус (Б, Г) як ефекторних клітин;

на фіг. 17 - результати аналізу опосередкованого Т-клітинами цитолізу клітинних ліній, що експресують CEA людських колоректального раку, індукованого TCB-молекулою до CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58) при застосуванні в концентрації 0,8 нМ (А), 4 нМ (Б) і 20 нМ (В). (Г) - дані про кореляцію між рівнем експресії CEA і % специфічного лізису при застосуванні TCB-молекули до CEA в концентрації 20нМ, (Д) - дані про кореляцію між рівнем експресії CEA і величиною EC<sub>50</sub> TCB-молекули до CEA;

на фіг. 18 - результати оцінювання протипухлинної ефективності in vivo TCB-молекули до CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58) при застосуванні сумісної трансплантації клітин карциноми ободової кишки людини лінії LS174T-fluc2 з людськими PBMC (співвідношення Е:Т=5:1). Результати представлені у вигляді середнього значення і СКО (середня квадратична помилка), одержаних для 12 мишей, у яких вимірювали об'єм пухлин за допомогою кронциркуля (А і В) або за допомогою біолюмінесценції (інтегральний потік), Б і Г) в різних оброблювальних групах. (А, Б) - рання стадія лікування, що починається в день 1, (В, Г) відкладене лікування, що починається в день 7. Як негативного контролю застосовували TCB-молекулу до MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 і 55);

на фіг. 19 - результати оцінювання протипухлинної ефективності in vivo TCB-молекули до CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58) при застосуванні сумісної трансплантації клітин карциноми ободової кишки людини лінії LS174T-fluc2 з людськими PBMC (співвідношення Е:Т=1:1).

Результати представлені у вигляді середнього значення і СКО, одержаних для 10 мишей, у яких вимірювали об'єм пухлин за допомогою кронциркуля (А і В) або за допомогою біolumінесценції (інтегральний потік, Б і Г) в різних оброблювальних групах. Як негативного контролю застосовували TCB-молекулу до MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 і 55);

5 на фіг. 20 - результати оцінювання ефективності *in vivo* мишачизованої (що містить ділянки мишачого антитіла) TCB-молекули до CEA, одержані на ортотопічній моделі пухлини Rapa2-huCEA, створеної на імунокомпетентних трансгенних мишах лінії huCD3ε/huCEA;

на фіг. 21 - дані про термостабільність TCB-молекули до CEA. Аналіз на основі динамічного розсіювання світла, виміряні при зміні температури від 25 до 75 °C зі швидкістю 0,05 °C/хв.

10 Дублікат позначений сірим кольором;

на фіг. 22 - дані про термостабільність TCB-молекули до MCSP. Аналіз на основі динамічного розсіювання світла, виміряні при зміні температури від 25 до 75 °C зі швидкістю 0,05 °C/хв. Дублікат позначений сірим кольором;

15 на фіг. 23 - результати аналізу опосередкованого Т-клітинами цитолізу, індукованого TCB-антитілом до MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 і 55) і TCB-антитілом до MCSP "1+1 CrossMab", пухлинних клітин-мішеней: (А) A375 (високий рівень MCSP), (Б) MV-3 (середній рівень MCSP) і (В) НСТ-116 (низький рівень MCSP). (Г) LS180 (MCSP-негативна лінія пухлинних клітин) застосовували як негативного контролю. Цитоліз пухлинних клітин оцінювали через 24 год. (А-Г) і 48 год. (Д-З) після інкубації клітин-мішеней з антитілами і ефекторними клітинами (людські PBMC);

20 на фіг. 24 - результати аналізу підвищувальної регуляції CD25 і CD69 на людських CD8<sup>+</sup>- і CD4<sup>+</sup>-Т-клітинах після Т-клітинного цитолізу пухлинних клітин, що експресують MCSP (A375, А-Г і MV-3, Д-З), зумовленого TCB-антитілом до MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 і 55) і TCB-антитілом до MCSP "1+1 CrossMab";

25 на фіг. 25 - результати, одержані за допомогою KE-ДСН, для антитіла TCB DP47 GS ("2+1 Crossfab-IgG P329G LALA, інвертована" = "неспрямована" TCB-молекула", SEQ ID NO: 59, 60, 61 і 62), яка містить DP47 GS як незв'язувальне антитіло і гуманізоване CH2527 як антитіло до CD3. Електрофореграми представлені у вигляді результатів ДСН-ПААГ TCB-молекули DP47 GS: А) невідновлювальні умови, Б) відновлювальні умови.

30 Докладний опис винаходу

Визначення

Поняття, застосовні в даному описі, мають значення, загальноприйнятні в даній галузі, якщо нижче спеціально не зазначене інше.

35 В контексті даного опису поняття "антигензв'язувальний фрагмент" у найбільш широкому смислі відноситься до молекули, яка специфічно зв'язується з антигенною детермінантою. Прикладами антигензв'язувальних фрагментів є імуноглобуліни та їх похідні, наприклад, фрагменти.

Поняття "біспецифічна" означає, що антигензв'язувальна молекула має здатність специфічно зв'язуватися щонайменше з двома різними антигенними детермінантами. Як правило, біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить два антигензв'язувальних сайти, кожний з яких є специфічним у відношенні різних антигенних детермінант. В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула має здатність одночасно зв'язуватися з двома антигенними детермінантами, насамперед з двома антигенними детермінантами, які експресуються на двох різних клітинах.

45 В контексті даного опису поняття "валентність" означає наявність певної кількості антигензв'язувальних сайтів в антигензв'язувальній молекулі. Так, поняття "одновалентне зв'язування з антигеном" означає наявність одного (і не більше одного) специфічного у відношенні антигену антигензв'язувального сайти в антигензв'язувальній молекулі.

50 Поняття "антигензв'язувальний сайт" відноситься до сайту, тобто одного або декільком амінокислотним залишкам антигензв'язувальної молекули, які забезпечують взаємодію з антигеном. Наприклад, антигензв'язувальний сайт антитіла містить амінокислотні залишки з гіперваріабельних ділянок (що визначають комплементарність ділянок) (CDR). Нативна молекула імуноглобуліну має два антигензв'язувальних сайти, молекула Fab, як правило, має один антигензв'язувальний сайт.

55 В контексті даного опису поняття "антигензв'язувальний фрагмент" відноситься до поліпептидної молекули, яка специфічно зв'язується з антигенною детермінантою. В одному з варіантів здійснення винаходу антигензв'язувальний фрагмент має здатність спрямовувати субстанцію, до якої він приєднаний (наприклад, другий антигензв'язувальний фрагмент), до сайту-мішені, наприклад, до специфічного типу пухлинної клітини або строми пухлини, що несе антигенну детермінанту. В іншому варіанті здійснення винаходу антигензв'язувальний фрагмент

має здатність активувати передачу сигналів через його антиген-мішень, наприклад, антиген комплексу Т-клітинного рецептора. Антигензв'язувальні фрагменти містять антитіла і їх фрагменти, що додатково описано нижче. Переважні антигензв'язувальні фрагменти містять антигензв'язувальний домен антитіла, який містить варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла і варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла. В деяких варіантах здійснення винаходу антигензв'язувальні фрагменти можуть містити константні ділянки антитіла, що додатково описано нижче і відомо в даній ділянці. Придатні константні ділянки важких ланцюгів містять будь-які з п'яти ізотипів:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  або  $\mu$ . Придатні константні ділянки легких ланцюгів містять будь-які з двох ізотипів:  $\kappa$  і  $\lambda$ .

В контексті даного опису поняття "антигенна детермінанта" є синонімом понять "антиген" і "епітоп" і відноситься до сайту (наприклад, ділянки, що складається з суміжних амінокислот, або конформаційної конфігурації, що складається з різних областей несуміжних амінокислот) на поліпептидній макромолекулі, з кою зв'язується антигензв'язувальний фрагмент з утворенням комплексу антигензв'язувальний фрагмент-антиген. Придатні антигенні детермінанти можуть бути присутніми, наприклад, на поверхні пухлинних клітин, на поверхні інфікованих вірусом клітин, на поверхні інших хворих клітин, на поверхні імунних клітин, клітин, що знаходяться у вільному стані в сироватці крові і/або у позаклітинному матриксі (ECM). В контексті даного опису білки, що відносяться до антигенів (наприклад, MCSP, CEA, CD3), якщо не зазначене інше, можуть представляти собою будь-які нативні форми білків з будь-якого застосовного як джерела хребетної тварини, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди) і гризуни (наприклад, миші й щури). В конкретному варіанті здійснення винаходу антиген являє собою людський білок. В контексті даного опису при посиланні на конкретний білок мають на увазі "повнорозмірний", непроецесований білок, а також будь-яку форму білка, одержану в результаті процесингу в клітині. Під поняття підпадають також варіанти білка, що зустрічаються в природних умовах, наприклад, сплайсингові варіанти або алельні варіанти. Прикладами людських білків, придатних як антигени, є (але, не обмежуючись тільки ними): асоційований з меланомою хондроїтинсульфат-протеоглікан (MCSP), відомий також як хондроїтинсульфат-протеоглікан 4 (CSPG4, UniProt № Q6UVK1 (версія 70), NCBI RefSeq № NP\_001888.2); карциномембранальний антиген (CEA), відомий також як споріднений молекулі клітинної адгезії 5 карциномембранальний антиген (CEACAM5, UniProt № P06731 (версія 119), NCBI RefSeq № NP\_004354.2); і CD3, насамперед епсилон-субодиниця CD3 (див. UniProt № P07766 (версія 130), NCBI RefSeq № NP\_000724.1, в SEQ ID NO: 103 представлена людська послідовність; або UniProt № Q95L15 (версія 49), NCBI GenBank № BAB71849.1, в SEQ ID NO: 104 представлена послідовність мавп циномогус (яванський макак-краббід) [*Macaca fascicularis*]). В деяких варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, запропонована у винаході, зв'язується з епітопом CD3 або антигену клітини-мішені, який є консервативним для CD3 або антигену-мішені з різних видів. В деяких варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, запропонована у винаході, зв'язується з CD3 і CEACAM5, але не зв'язується з CEACAM1 або CEACAM6. Поняття "специфічно зв'язується" означає, що зв'язування є вибіркоvim у відношенні антигена і його можна відрізнити від небажаних або неспецифічних взаємодій. Здатність антигензв'язувального фрагмента зв'язуватися зі специфічною антигенною детермінантою, можна визначати за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA) або інших методик, відомих спеціалісту в даній галузі техніки, наприклад, за допомогою методики на основі поверхневого плазмонного резонансу (проводячи аналіз за допомогою пристрою BIAcore) (Liljeblad та інш., Glyco J 17, 2000, сс. 323-329), і традиційних аналізів зв'язування (Heeley, Endocr Res 28, 2002, сс. 217-229). В одному з варіантів здійснення винаходу рівень зв'язування антигензв'язувального фрагмента з неспорідненим білком складає менше ніж приблизно 10 % від рівня зв'язування антигензв'язувального фрагмента з антигеном, при вимірюванні, наприклад, за допомогою SPR. В деяких варіантах здійснення винаходу антигензв'язувальний фрагмент, який зв'язується з антигеном, або антигензв'язувальна молекула, яка містить антигензв'язувальний фрагмент, характеризується величиною константи дисоціації ( $K_D$ ), яка складає  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ або  $\leq 0,001$  нМ (наприклад,  $10^{-8}$  М або менше, наприклад, від  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, наприклад, від  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М).

Поняття "афінність" відноситься до сумарної сили всіх нековалентних взаємодій між індивідуальним сайтом зв'язування молекули (наприклад, рецептора) і її партнера зі зв'язування (наприклад, ліганду). Якщо не зазначене інше, то в контексті даного опису поняття "афінність зв'язування" відноситься до притаманній компонентам зв'язувальної пари (наприклад, антигензв'язувального фрагменту і антигену або рецептору і ліганду) афінності зв'язування, що відбиває взаємодію за типом 1:1. Афінність молекули X до її партнера Y можна, як правило, характеризувати за допомогою константи дисоціації ( $K_D$ ), яка являє собою відношення констант швидкості реакції дисоціації й асоціації ( $k_{off}$  і  $k_{on}$  відповідно). Так, еквівалентні афінності можуть відповідати різним константам швидкості, якщо співвідношення констант швидкості залишається

там самим. Афіністість можна оцінювати загальноприйнятими методами, відомими в даній галузі, включаючи представлені в даному описі методи. Конкретним методом вимірювання афіністості є метод поверхневого плазмонного резонансу (SPR).

Поняття "знижене зв'язування (знижена здатність до зв'язування)", наприклад, знижена здатність до зв'язування з Fc-рецептором, відноситься до зниження афіністості відносно відповідної взаємодії, вимірної, наприклад, за допомогою SPR. Для ясності слід пояснити, що поняття охоплює також зниження афіністості до нуля (або нижче межі виявлення аналітичного метода), тобто повну елімінацію взаємодії. І, навпаки, "підвищене зв'язування (підвищена здатність до зв'язування)" відноситься до підвищення афіністості зв'язування відносно відповідної взаємодії.

Поняття "Т-клітинна активація (активація Т-клітин)" в контексті даного опису відноситься до однієї або декільком клітинним відповідям Т-лімфоциту, зокрема, цитотоксичного Т-лімфоциту, вибраним з: проліферації, диференціації секреції цитокінів, вивільнення цитотоксичних ефektorних молекул, цитотоксичної активності і експресії маркерів активації. Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, мають здатність індукувати Т-клітинну активацію. Прийнятні аналізи оцінювання Т-клітинної активації, відомі в даній галузі, представлені в даному описі.

Поняття "антиген клітини-мішені" в контексті даного опису відноситься до антигенної детермінанти, яка є присутньою на поверхні клітини-мішені, наприклад, клітини в пухлині, такої як ракова клітина або клітина строми пухлини.

В контексті даного опису поняття "перший" і "другий" відносно антигензв'язувальних фрагментів тощо застосовують з метою зручності розрізнення, коли є присутнім більше одного типу кожного з фрагментів. Застосування цих понять не має на увазі їх конкретний порядок або орієнтацію в активувальній Т-клітині біспецифічній антигензв'язувальній молекулі, якщо спеціально не зазначено інше.

Поняття "молекула Fab" відноситься до білка, що складається з VH і CH1-домену важкого ланцюга ("важкий ланцюг Fab") і VL і CL-домену легкого ланцюга ("легкий ланцюг Fab") імуноглобуліну.

Під поняттям "злиті" мають на увазі, що компоненти (наприклад, молекула Fab і субодиниця Fc-домену) поєднані пептидними зв'язками, або безпосередньо, або за допомогою одного або декількох пептидних лінкерів.

В контексті даного опису поняття "одноланцюгова" відноситься до молекули, що містить амінокислотні мономери, зв'язані лінійно за допомогою пептидних зв'язків. В деяких варіантах здійснення винаходу антигензв'язувальний фрагмент являє собою одноланцюгову молекулу Fab, тобто молекулу Fab, в якій легкий ланцюг Fab і важкий ланцюг Fab поєднані за допомогою пептидного лінкера з утворенням одного пептидного ланцюга. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу С-кінець легкого ланцюга Fab поєднаний з N-кінцем важкого ланцюга Fab в одноланцюговій молекулі Fab.

Під одержаною в результаті кросинговеру молекулою Fab (яку позначають також як "Crossfab") мають на увазі молекулу Fab, в якій або варіабельні ділянки, або константні ділянки важкого і легкого ланцюга Fab обмінені одна на іншу, тобто одержана в результаті кросинговеру молекула Fab містить пептидний ланцюг, що складається з варіабельної ділянки легкого ланцюга і константної ділянки важкого ланцюга, і пептидний ланцюг, що складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга і константної ділянки легкого ланцюга. Для простоти розуміння, слід відзначити, що в одержаній в результаті кросинговеру молекулі Fab, в якій обмінені варіабельні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab, пептидний ланцюг, який містить константну область важкого ланцюга, позначають в контексті даного опису як "важкий ланцюг" одержаної в результаті кросинговеру молекули Fab. І, навпаки, в одержаній в результаті кросинговеру молекулі Fab, в якій обмінені константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab, пептидний ланцюг, який містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, позначають в контексті даного опису як "важкий ланцюг" одержаної в результаті кросинговеру молекули Fab.

На противагу до цього, під "канонічною" молекулою Fab мають на увазі молекулу Fab, яка має її природній формат, тобто яка містить важкий ланцюг, що складається з варіабельної і константної областей важкого ланцюга (VH-CH1), і легкий ланцюг, що складається з варіабельної і константної областей легкого ланцюга (VL-CL).

Поняття "молекула імуноглобуліну" відноситься до білка, що має структуру антитіла, яке зустрічається в природних умовах. Наприклад, імуноглобуліни класу IgG представляють собою гетеротетрамерні глікопротеїни з молекулярною масою приблизно 150000 Да, що складаються з двох легких ланцюгів і двох важких ланцюгів, зв'язаних дисульфідними містками. У напрямку від N-кінця до С-кінця кожний важкий ланцюг містить варіабельну ділянку (VH), яку називають також варіабельним важким доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, за яким розташовані три константних домени (CH1, CH2 і CH3), які називають також константною ділянкою важкого ланцюга. Аналогічно до цього, у напрямку від N-кінця до С-кінця кожна легкий

ланцюг містить варіабельну ділянку (VL), яку називають також варіабельним легким доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, за яким розташований константний домен легкого ланцюга (CL), який називають також константною ділянкою легкого ланцюга. Важкий ланцюг імуноглобуліну може відноситися до одного з п'яти типів, позначених як  $\alpha$  (IgA),  $\delta$  (IgD),  $\epsilon$  (IgE),  $\gamma$  (IgG) або  $\mu$  (IgM), деякі з яких додатково підрозділяють на підтипи, наприклад,  $\gamma_1$  (IgG<sub>1</sub>),  $\gamma_2$  (IgG<sub>2</sub>),  $\gamma_3$  (IgG<sub>3</sub>),  $\gamma_4$  (IgG<sub>4</sub>),  $\alpha_1$  (IgA<sub>1</sub>) і  $\alpha_2$  (IgA<sub>2</sub>). Легкий ланцюг імуноглобуліну може відноситися до одного з двох типів, позначених як каппа ( $\kappa$ ) і лямбда ( $\lambda$ ), на основі амінокислотної послідовності її константного домену. Імуноглобулін, як правило, складається з двох молекул Fab і Fc-домену, які поєднані через шарнірну область імуноглобуліну.

В контексті даного опису поняття "антитіло" застосовують у його найбільш широкому сенсі, і воно відноситься до різних структур антитіл, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) моноклональні антитіла, поліклональні антитіла і фрагменти антитіл, за умови, що вони мають потрібну антигензв'язувальну активність.

Поняття "фрагмент антитіла" відноситься до молекули, яка відрізняється від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, яка має здатність зв'язуватися з антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. Прикладами фрагментів антитіл є (але, не обмежуючись тільки ними) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, димерні антитіла, лінійні антитіла, одноланцюгові молекули антитіл (наприклад, scFv) і однокласні антитіла. Огляд деяких фрагментів антитіл див., наприклад, у Hudson та інш., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134. Огляд scFv-фрагментів див., наприклад, у Plückthun в: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, т. 113, під ред. Rosenberg і Moore, вид-во Springer-Verlag, New York, 1994, сс. 269-315; див. також WO 93/16185; і US №№ 5571894 і 5587458. Обговорення Fab- і F(ab')<sub>2</sub>-фрагментів, що містять залишки епітопу, що зв'язується з рецептором рятування, і які мають подовжений час напівжиття *in vivo*, див. в US № 5869046. Димерні антитіла (діабоді) представляють собою фрагменти антитіл з двома антигензв'язувальними сайтами, які можуть бути двохвалентними або біспецифічними (див., наприклад, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson та інш., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134; і Hollinger та інш., Proc Natl Acad Sci USA 90, 1993, сс. 6444-6448. Тримерні (триабоді) і тетрамерні (тетрабоді) антитіла описані також у Hudson та інш., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134. Однокласні антитіла представляють собою фрагменти антитіл, які містять весь або частину варіабельного домену важкого ланцюга або весь або частину варіабельного домену легкого ланцюга антитіла. В деяких варіантах здійснення винаходу однокласне антитіло являє собою людське однокласне антитіло (фірма Domantis, Inc., Waltham M.A.; див., наприклад, US № 6248516 B1). Фрагменти антитіл можна створювати за допомогою різних методик, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) протеолітичне розщеплення інтактного антитіла, а також одержувати із застосуванням рекомбінантних клітин-хазяїв (наприклад, E. coli або фага), як зазначено в даному описі.

Поняття "антигензв'язувальний домен" відноситься до частини антитіла, яка містить область, яка специфічно зв'язується і є комплементарною частині антигену або повному антигену. Антигензв'язувальний домен може представляти собою, наприклад, один або декілька варіабельних доменів антитіла (які називають також варіабельними областями антитіла). Переважно антигензв'язувальний домен містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) антитіла і варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) антитіла.

Поняття "варіабельна область" або "варіабельний домен" відноситься до домену важкого або легкого ланцюга антитіла, який приймає участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга і легкого ланцюга (VH і VL відповідно) нативного антитіла, як правило, мають схожі структури, при цьому кожний домен містить чотири консервативних каркасних ділянки (FR) і три гіперваріабельних ділянки (HVR) (див., наприклад, Kindt та інш., Kuby Immunology, 6-е вид., вид-во W.H. Freeman and Co., 2007, з. 91). Одного VH- або VL-домену може бути достатньо для забезпечення специфічності зв'язування антигену.

Поняття "гіперваріабельна ділянка" або "HVR" в контексті даного опису відноситься до кожної з ділянок варіабельного домену антитіла, послідовності яких є гіперваріабельними, і/або які утворюють структури у вигляді петель ("гіперваріабельні петлі"). Як правило, нативні чотирьохланцюгові антитіла містять шість HVR; три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). HVR, як правило, містять амінокислотні залишки з гіперваріабельних петель і/або з "визначальних комплементарних ділянок" (CDR), останні відрізняються найбільш вираженою варіабельністю послідовності і/або беруть участь у розпізнаванні антигенів. Крім CDR1, наявного в VH, CDR, як правило, містять амінокислотні залишки, які утворюють гіперваріабельні петлі. Поняття "гіперваріабельні ділянки" (HVR) відноситься також до "визначальних комплементарних ділянок" (CDR), і в контексті даного опису ці поняття застосовують взаємозаміно відносно положень варіабельної ділянки, які формують антигензв'язувальні

ділянки. Ця конкретна область описана у Kabat та інш., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 1983 і у Chothia та інш., J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917, причому ці визначення відносяться до перекривальних амінокислотних залишків або піднаборів амінокислотних залишків при їх порівнянні один з іншим. Однак в контексті даного опису мають на увазі можливість застосування будь-якого визначення CDR антитіла або його варіантів. Відповідні амінокислотні залишки, з яких складаються CDR, як вони визначені в кожній з процитованих вище посилань, представлені у порівнянні нижче в таблиці А. Точні номери залишків, які утворюють конкретний CDR, можуть варіюватися залежно від послідовності й розміру CDR. Спеціалісти в даній галузі техніки на основі даних при амінокислотну послідовність варіабельної ділянки антитіла легко можуть визначати, які залишки входять до конкретного CDR.

Таблиця

А. Визначення CDR<sup>1</sup>

	Кебот	Хотіа	AbM <sup>2</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	26-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	52-58	50-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	95-102	95-102
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	24-32
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	50-56
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-97

<sup>1</sup> Нумерація всіх залишків, які входять в CDR в таблиці А дана відповідно до номенклатури, запропонованої Кеботом із співавторами (див. нижче).

<sup>2</sup> Позначення "AbM" з великою буквою "b", застосовне в таблиці А, відноситься до CDR, як вони визначені програмою для моделювання антитіл "AbM" компанії Oxford Molecular Group.

Кебот із співавторами запропонували також систему нумерації (номенклатуру) послідовностей варіабельних ділянок, яку можна застосовувати для будь-якого антитіла. Спеціаліст в даній галузі стандартної підготовки може однозначно застосовувати цю систему "нумерації за Кеботом" до будь-якої послідовності варіабельної ділянки, не маючи ніяких експериментальних даних, крім відомостей про саму послідовність. В контексті даного опису поняття "нумерація за Кеботом" відноситься до системи нумерації, описаної у Kabat та інш., "Sequence of Proteins of Immunological Interest", вид-во U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983. Якщо не зазначене інше, то посилання на нумерацію положень конкретних амінокислотних залишків у варіабельній ділянці антитіла надані згідно з системою нумерації за Кеботом.

Нумерація поліпептидних послідовностей в "Переліку послідовностей" не являє собою нумерацію згідно з системою Кебота. Однак в компетенції звичайного спеціаліста в даній галузі техніки є переведення нумерації послідовностей в "Переліку послідовностей" в нумерацію за Кеботом.

"Каркасні ділянки" або "FR"-ділянки представляють собою ділянки варіабельних доменів, які відрізняються від залишків гіперваріабельних ділянок (HVR). FR варіабельного домену, як правило, представлені чотирма FR-доменами: FR1, FR2, FR3 і FR4. Таким чином, послідовності HVR і FR, як правило, розташовані в V<sub>H</sub> (або V<sub>L</sub>) в наступному порядку: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Поняття "клас" антитіла або імуноглобуліну відноситься до типу константного домену або константної ділянки, що входить у важкий ланцюг. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, а деякі з них можна додатково підрозділити на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> і IgA<sub>2</sub>. Константні домени важких ланцюгів, що відповідають різним класам імуноглобулінів, позначають як α, δ, ε, γ і μ відповідно.

В контексті даного опису поняття "Fc-домен" або "Fc-область" відноситься до С-кінцевої ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну, яка містить щонайменше частину константної ділянки. Поняття відноситься до нативної послідовності Fc-областей і варіантів Fc-областей. Хоча примезові послідовності Fc-ділянки у важкому ланцюзі IgG можуть трохи варіюватися, як правило, Fc-область важкого ланцюга людського IgG простягається від Cys226 або від Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак С-кінцевий лізин (Lys447) Fc-ділянки може або

бути присутнім, або відсутнім. Якщо спеціально не зазначене інше, то нумерація амінокислотних залишків в Fc-ділянці або константній ділянці відповідає системі EU-нумерації (яку називають також EU-індексом), описаній у Kabat та інш., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Поняття "субодиниця" Fc-домену в контексті даного опису відноситься до одного з двох поліпептидів, що утворюють димерний Fc-домен, тобто до поліпептиду, який містить C-кінцеві константні ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну, що мають здатність до стабільної самоасоціації. Наприклад, субодиниця Fc-домену IgG містить константний домен CH2 IgG і CH3 IgG.

"Модифікація, що посилює асоціацію першої й другої субодиниць Fc-домену" являє собою маніпуляцію з пептидним каркасом або пост-трансляційні модифікації субодиниць Fc-домену, які зменшують або перешкоджають асоціації поліпептиду, що містить субодиницю Fc-домену, з ідентичним поліпептидом з утворенням гомодимера. В контексті даного опису модифікація, що посилює асоціацію, охоплює насамперед різні модифікації, здійснювані з кожною з двох субодиниць Fc-домену, призначених для асоціації (наприклад, першої й другої субодиниць Fc-домену), при цьому, модифікації доповнюють один іншого таким чином, щоб посилювати асоціацію двох субодиниць Fc-домену. Наприклад, модифікація, що посилює асоціацію, може змінювати структуру або заряд однієї або обох субодиниць Fc-домену таким чином, щоб покращувати їх асоціацію стерично або електростатично відповідно. Так, (гетеро)димеризація має місце між поліпептидом, який містить першу субодиницю Fc-домену, і поліпептидом, який містить другу субодиницю Fc-домену, які можуть бути неідентичними, оскільки додаткові компоненти, злиті з кожною із субодиниць (наприклад, антигензв'язувальні фрагменти), не є однаковими. В деяких варіантах здійснення винаходу модифікація, що посилює асоціацію, являє собою амінокислотну мутацію в Fc-доміні, зокрема, амінокислотну заміну. В конкретному варіанті здійснення винаходу модифікація, що посилює асоціацію, являє собою індивідуальну амінокислотну мутацію, зокрема, амінокислотну заміну, в кожній з двох субодиниць Fc-домену.

Поняття "ефекторні функції", застосоване в даному описі, відноситься до видів біологічної активності, притаманних Fc-ділянці антитіла, які варіюються залежно від ізотипу антитіла. Прикладами ефекторних функцій антитіла є: здатність зв'язуватися з C1q і комплементзалежна цитотоксичність (CDC), здатність зв'язуватися з Fc-рецептором, антитіло-зумовлена клітинно-залежна цитотоксичність (ADCC), антитіло-зумовлений клітинно-залежний фагоцитоз (ADCP), секреція цитокінів, опосередковане імунним комплексом поглинання антигену антигенпрезентувальними клітинами, знижувальна регуляція рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора); і активація B-клітин.

В контексті даного опису мають на увазі, що поняття "конструювання, сконструйований, інженерія" містять будь-яку маніпуляцію з пептидним каркасом або пост-трансляційні модифікації наявного в природних умовах або рекомбінантного поліпептиду або його фрагмента. Інженерія охоплює модифікації амінокислотної послідовності, схеми глікозилювання або групи бічних ланцюгів індивідуальних амінокислот, а також комбінації зазначених підходів.

В контексті даного опису мають на увазі, що поняття "амінокислотна мутація" відноситься до амінокислотних замін, делецій, інсерцій і модифікацій. Можна застосовувати будь-яку комбінацію заміни, делеції, інсерції і модифікації для створення кінцевої конструкції за умови, що кінцева конструкція має необхідні характеристики, наприклад, знижену здатність зв'язуватися з Fc-рецептором або підвищеною асоціацією з іншим пептидом. Амінокислотна послідовність з делеціями й інсерціями охоплює аміно- і/або карбоксикінцеві делеції й інсерції амінокислот. Конкретними амінокислотними мутаціями є амінокислотні заміни. Для зміни, наприклад, характеристик зв'язування Fc-ділянки, найбільш переважними є неконсервативні амінокислотні заміни, тобто заміна однієї амінокислоти на іншу амінокислоту, що має інші структурні і/або хімічні властивості. Амінокислотні заміни містять заміну на амінокислоти, які не зустрічаються у природних умовах або на похідні двадцяти стандартних амінокислот, що зустрічаються в природних умовах (наприклад, на 4-гідроксипролін, 3-метилгістидин, орнітин, гомосерин, 5-гідроксилізін). Амінокислотні мутації можна створювати за допомогою генетичних або хімічних методів, добре відомих в даній галузі. Генетичні методи можуть містити сайтспрямований мутагенез, ПЦР, синтез генів тощо. Мають на увазі, що можна застосовувати також методи зміни бічної групи амінокислоти, які відрізняються від методів генної інженерії, такі як хімічна модифікація. Для позначення однієї й самої амінокислотної мутації можна застосовувати різні позначення. Наприклад, заміну проліну в положенні 329 Fc-домену на гліцин можна позначати як 329G, G329, G<sub>329</sub>, P329G або Pro329Gly.

В контексті даного опису поняття "поліпептид" відноситься до молекули, що складається з мономерів (амінокислот), лінійно зв'язаних амідними зв'язками (які позначають також як

пептидні зв'язки). Поняття "поліпептид" відноситься до будь-якого ланцюга, що складається з двох або більшої кількості амінокислот, і не має на увазі, що продукт має конкретну довжину. Так, пептиди, дипептиди, трипептиди, олігопептиди, "білок", "амінокислотний ланцюг" або будь-яке інше прийняте поняття, що відноситься до ланцюга, що складається з двох або більшої кількості амінокислот, всі підпадають під визначення "поліпептид", і поняття "поліпептид" можна застосовувати замість або взаємозаміною з будь-яким із зазначених понять. Мають на увазі також, що поняття "поліпептид" відноситься в продуктів, які несуть пост-експресійні модифікації поліпептиду, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) глікозилювання, ацетилювання, фосфорилювання, амідування, дериватизацію із застосуванням відомих захисних/блокувальних груп, протеолітичне розщеплення або модифікацію за допомогою амінокислот, які не зустрічаються в природних умовах. Поліпептид можна одержувати з наявного в природних умовах біологічного джерела або можна одержувати за допомогою технології рекомбінантної ДНК, і його не обов'язково транслювати зі створеної нуклеотидної послідовності. Його можна створювати будь-яким шляхом, включаючи хімічний синтез. Поліпептид, запропонований у винаході, може складатися приблизно з 3 або більше, 5 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 25 або більше, 50 або більше, 75 або більше, 100 або більше, 200 або більше, 500 або більше, 1000 або більше або 2000 або більше амінокислот. Поліпептиди можуть мати різну тримірну структуру, хоча вони обов'язково повинні мати зазначену структуру. Поліпептиди з визначеною тривимірною структурою позначають як поліпептиди, що мають укладання, а поліпептиди, які не мають визначеної тривимірної структури, але які можуть легше адаптуватися до більшої кількості різних конформацій, позначають як поліпептиди, не що мають укладання.

Під "виділеним" поліпептидом або його варіантом, або похідним мають на увазі поліпептид, який не знаходиться в його природному оточенні. При цьому не потрібна наявність будь-якого або конкретного рівня очищення. Наприклад, виділений поліпептид можна видаляти з його нативного або природного оточення. Одержані шляхом рекомбінації поліпептиди і білки, що експресуються в клітинах-хазяях, розглядають як виділені для цілей даного винаходу, якщо вони представляють собою нативні або рекомбінантні поліпептиди, які відокремлені, фракціоновані або частково або повністю очищені за допомогою будь-якого прийнятного метода.

"Процент (%) ідентичності амінокислотної послідовності" відносно поліпептидної референс-послідовності визначають як процент амінокислотних залишків в послідовності-кандидаті, які ідентичні амінокислотним залишків в поліпептидній референс-послідовності, після вирівнювання послідовностей і інтродукції при необхідності отворів для досягнення максимального процента ідентичності послідовностей, і при цьому будь-які консервативні заміни не враховують при оцінюванні ідентичності послідовностей. Порівняльний аналіз для визначення процента ідентичності амінокислотних послідовностей можна здійснювати різними шляхами, які знаходяться в компетенції спеціаліста в даній галузі техніки, наприклад, із застосуванням публічно доступних комп'ютерних програм, таких як програма BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Спеціалісти в даній галузі техніки можуть визначати відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині порівнюваних послідовностей. Однак для цілей даного винаходу величину % ідентичності амінокислотних послідовностей одержують із застосуванням призначеної для порівняння послідовностей комп'ютерної програми ALIGN-2. Призначена для порівняння послідовностей комп'ютерна програма ALIGN-2 розроблена фірмою Genentech, Inc., і вихідний код розміщений на зберігання разом з документацією для користувача в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, де він зареєстрований під реєстраційним номером U.S. Copyright Registration № TXU510087. Програма ALIGN-2 являє собою публічно доступну програму фірми Genentech, Inc., Південний Сан-Франциско, шт. Каліфорнія, або її можна компілювати з вихідного коду. Програму ALIGN-2 можна компілювати для застосування в операційній системі UNIX, включаючи цифрову версію UNIX V4.0D. В програмі ALIGN-2 всі параметри для порівняння послідовностей є заданими і не повинні змінюватися. В ситуаціях, коли ALIGN-2 застосовують для порівняння амінокислотних послідовностей, % ідентичності амінокислотних послідовностей даної амінокислотної послідовності А відносно або у порівнянні з даною амінокислотною послідовністю Б (яку іншими словами можна позначати як дана амінокислотна послідовність А, яка має або відрізняється певним % ідентичності амінокислотної послідовності відносно або у порівнянні з даною амінокислотною послідовністю Б), розраховують наступним чином:

$$100 \times \text{частка } X/Y,$$



де  $X$  означає кількість амінокислотних залишків, оцінених програмою порівняльного аналізу послідовностей ALIGN-2 як ідентичні збіги при порівняльному аналізі послідовностей А і Б за допомогою зазначеної програми, і де  $Y$  означає загальну кількість амінокислотних залишків в Б. Повинно бути очевидним, що, коли довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності Б, то % ідентичності амінокислотної послідовності А відносно амінокислотної послідовності Б не повинний бути рівним % ідентичності амінокислотної послідовності Б відносно амінокислотної послідовності А. Якщо спеціально не зазначене інше, то в контексті даного опису всі величини % ідентичності амінокислотних послідовностей одержують згідно з процедурою, описаною в останньому з попередніх параграфів, за допомогою комп'ютерної програми ALIGN-2.

Поняття "полінуклеотид" відноситься до виділеної молекули нуклеїнової кислоти або конструкції, наприклад, матричної РНК (мРНК), РНК вірусного походження або плазмідної ДНК (пДНК). Полінуклеотид може містити звичайний фосфодієфірний зв'язок або нетрадиційний зв'язок (наприклад, амідний зв'язок, такий, який є присутнім в пептидних нуклеїнових кислотах (ПНК)). Поняття "молекула нуклеїнової кислоти" відноситься до будь-якого одного або декількох сегментів нуклеїнової кислоти, наприклад, фрагментів ДНК або РНК, що присутні в полінуклеотиді.

Під "виділеною" молекулою нуклеїнової кислоти або полінуклеотидом мають на увазі молекулу нуклеїнової кислоти, тобто ДНК або РНК, яка відокремлена від її нативного оточення. Наприклад, рекомбінантний полінуклеотид, що кодує вхідний у вектор поліпептид, розглядають як виділений для цілей даного винаходу. Іншими прикладами виділеного полінуклеотиду є рекомбінантні полінуклеотиди, присутні в гетерологічних клітинах-хазяях, або очищенні (частково або повністю) полінуклеотиди, що знаходяться в розчині. Виділений полінуклеотид охоплює молекулу полінуклеотиду, що входить в клітини, які в нормі містять молекулу полінуклеотиду, але молекула полінуклеотиду є присутньою поза хромосомою або має локалізацію в хромосомі, що відрізняється від її локалізації в хромосомі в природних умовах. Виділені молекули РНК містять одержані *in vivo* або *in vitro* РНК-транскрипти, запропоновані в даному винаході, а також форми з позитивним і негативним ланцюгом і дволанцюгові форми. Виділені полінуклеотиди або нуклеїнові кислоти, запропоновані в даному винаході, містять також зазначені молекули, одержані за допомогою синтезу. Крім того, полінуклеотид або нуклеїнова кислота може представляти собою або може містити регуляторний елемент, такий як промотор, сайт зв'язування рибосом або термінатор транскрипції.

Під нуклеїною кислотою або полінуклеотидом, що мають нуклеотидну послідовність, яка наприклад, на 95 % "ідентична" нуклеотидній референс-послідовності, що пропонується в даному винаході, мають на увазі, що нуклеотидна послідовність полінуклеотиду ідентична референс-послідовності за винятком того, що полінуклеотидна послідовність може містити аж до 5 точкових мутацій на кожні 100 нуклеотидів нуклеотидної референс-послідовності. Іншими словами, для одержання полінуклеотиду, що має нуклеотидну послідовність, яка ідентична щонайменше на 95 % нуклеотидній референс-послідовності, аж до 5 % нуклеотидів в референс-послідовності можна виймати шляхом делеції або замінювати на інший нуклеотид, або аж до 5 % нуклеотидів від загальної кількості нуклеотидів в референс-послідовності можна вбудовувати в референс-послідовність. Ці зміни референс-послідовності можуть мати місце в положеннях на 5'- або 3'-кінці нуклеотидної референс-послідовності або в іншому положенні між цими кінцевими положеннями, і їх вбудовують або індивідуально між залишками в референс-послідовності, або їх вбудовують в референс-послідовність у вигляді однієї або декількох суміжних груп. На практиці питання про те, чи є ідентичною конкретна полінуклеотидна послідовність щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % нуклеотидній послідовності, що пропонується в даному винаході, можна вирішувати, як правило, із застосуванням відомих комп'ютерних програм, наприклад, зазначених вище для поліпептидів (наприклад, ALIGN-2).

Поняття "касета експресії" відноситься до полінуклеотиду, одержаного за допомогою рекомбінації або синтезу, який містить серії специфічних нуклеотидних елементів, які забезпечують транскрипцію конкретної нуклеїнової кислоти в клітині-мішені. Рекомбінантну касету експресії можна вбудовувати в плазмиду, хромосому, мітохондріальну ДНК, пластидну ДНК, вірус або фрагмент нуклеїнової кислоти. Як правило, рекомбінантна касета експресії, що являє собою частину експресійного вектора, охоплює серед інших послідовностей нуклеотидну послідовність, яка підлягає транскрипції і промотор. В деяких варіантах здійснення винаходу касета експресії, запропонована у винаході, містить полінуклеотидні послідовності, які кодують біспецифічні антигензв'язувальні молекули, запропоновані у винаході, або їх фрагменти.

Поняття "вектор" або "експресійний вектор" є синонімом поняття "експресійна конструкція" і відноситься до молекули ДНК, яку застосовують для інтродукції і забезпечення експресії конкретного гена, з якою він функціонально зв'язаний в клітині-мішені. Поняття охоплює вектор, що являє собою структуру нуклеїнової кислоти, здатну до самореплікування, а також вектор, вбудований в геном клітини-хазяїна, в яку він інтродукований. Експресійний вектор, що пропонується в даному винаході, містить касету експресії. Експресійні вектори дозволяють здійснювати транскрипцію стабільної мРНК у великих кількостях. Коли експресійний вектор знаходиться всередині клітини-мішені, то молекула рибонуклеїнової кислоти або білок, який кодується геном, продукується в результаті клітинного механізму транскрипції і/або трансляції. В одному з варіантів здійснення винаходу експресійний вектор, запропонований у винаході, містить касету експресії, яка охоплює полінуклеотидні послідовності, які кодують біспецифічні антигензв'язувальні молекули, запропоновані у винаході, або їх фрагменти.

В контексті даного опису поняття "клітина-хазяїн", "клітинна лінія-хазяїн" і "клітинна культура-хазяїн" застосовують взаємозаміно, і вони відносяться до клітин, в які інтродукована екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство зазначених клітин. До клітин-хазяїв відносяться "трансформанти" і "трансформовані клітини", які містять первинні трансформовані клітини, а також потомство, виведене з них, незалежно від кількості пересівань. Потомство може не бути суворо ідентичним батьківській клітині за складом нуклеїнових кислот, а може нести мутації. Під дане поняття підпадає мутантне потомство, яке має таку ж функцію або біологічну активність, що і відібрана шляхом скринінгу або селекції вихідна трансформована клітина. Клітина-хазяїн являє собою будь-який тип клітинної системи, яку можна застосовувати для створення біспецифічних антигензв'язувальних молекул, що пропонуються в даному винаході. Клітини-хазяї містять культивовані клітини, наприклад, культивовані клітини ссавців, такі як (але, не обмежуючись тільки ними) CHO-клітини, BHK-клітини, NS0-клітини, SP2/0-клітини, клітини мієломи лінії YO, клітини мишачої мієломи лінії P3 × 63, PER-клітини, PER.C6-клітини або клітини гібридами, клітини дріжджів, клітини комах і клітини рослин, але також клітини, що знаходяться в трансгенній тварині, трансгенній рослині або в культивованій рослинній або тваринній тканині.

"Активувальний Fc-рецептор" являє собою Fc-рецептор, який після взаємодії з Fc-доменом антитіла здійснює процес передачі сигналів, які стимулюють клітину, яка несе рецептор здійснювати ефекторні функції. Людські активувальні Fc-рецептори містять FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) і FcαRI (CD89).

Антитіло-зумовлена клітинно-залежна цитотоксичність (ADCC) являє собою імунний механізм, що призводить до лізису сенсibilізованих антитілом клітин-мішеней імунними ефекторними клітинами. Клітини-мішені представляють собою клітини, з якими антитіла або їх похідні, які містять Fc-область, специфічно зв'язуються, як правило, через область білка, яка є N-кінцевою відносно Fc-ділянки. В контексті даного опису поняття "знижена ADCC" відноситься або до зниження кількості лізованих в даний момент часу клітин-мішеней при даній концентрації антитіла в середовищі, що оточує клітини-мішені, шляхом зазначеного вище механізму ADCC, і/або до підвищення концентрації антитіла в середовищі, що оточує клітини-мішені, необхідному для досягнення лізису даної кількості клітин-мішеней в даний час за допомогою механізму ADCC. Зниження ADCC-активності визначають відносно ADCC, опосередкованої таким же антитілом, яке одержано за допомогою такого же типу клітин-хазяїв із застосуванням однакових стандартних методів одержання, очищення, приготування композицій і зберігання (які відомі спеціалістам в даній галузі техніки), але яке не піддавали інженерії. Наприклад, зниження ADCC, опосередкованої антитілом, яке містить в його Fc-домені амінокислотну заміну, яка знижує ADCC, визначають відносно ADCC, опосередкованої таким самим антитілом без зазначеної амінокислотної заміни в Fc-домені. Прийнятні аналізи оцінювання ADCC добре відомі в даній галузі техніки (див., наприклад, публікацію PCT WO 2006/082515 або заявку на патент PCT PCT/EP2012/055393).

Поняття "ефективні кількість" агента відноситься до кількості, необхідної для забезпечення фізіологічної зміни в клітині або тканині, в яку її вводять.

Поняття "терапевтично ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичної композиції, відноситься до кількості, ефективною при застосуванні в дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення потрібного терапевтичного або профілактичного результату. Терапевтично ефективна кількість агента, наприклад, елімінує, знижує, уповільнює, мінімізує або попереджує небажані явища захворювання.

"Індивідуум" або "суб'єкт" являє собою ссавця. Ссавці представляють собою (але, не обмежуючись тільки ними) свійських тварин (наприклад, корови, вівці, кішки, собаки і коні),

приматів (наприклад, люди і примати крім людини, такі як мавпи), кроликів і гризунів (наприклад, миші і щури). Переважно індивідуум або суб'єкт являє собою людину.

Поняття "фармацевтична композиція" відноситься до препарату, який знаходиться в такій формі, що він забезпечує біологічну активність діючої речовини, яка входить до його складу, яка повинна мати ефективність, і який не містить додаткових компонентів, які мають неприйнятну токсичність для індивідуума, якому слід вводити композицію.

"Фармацевтично прийнятний носій" відноситься до інгредієнта в фармацевтичній композиції, який відрізняється від діючої речовини, який є нетоксичним для індивідуума. Фармацевтично прийнятні носії містять (але, не обмежуючись тільки ними) буфер, ексципієнт, стабілізатор або консервант.

В контексті даного опису поняття "лікування" (і його граматичні варіації, такі як "лікувати" або "процес лікування") відноситься до клінічного втручання з метою зміни природного перебігу хвороби в індивідуума, який підлягає лікуванню, і його можна здійснювати або для профілактики або в процесі розвитку клінічної патології. Необхідними діями лікування є (але, не обмежуючись тільки ними) попереджують виникнення або рецидив хвороби, полегшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків хвороби, попередження метастазів, зниження швидкості розвитку хвороби, полегшення або тимчасове ослаблення хворобливого стану і ремісія або покращення прогнозу. В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, застосовують для задержки розвитку хвороби або уповільнення прогресування хвороби.

Поняття "листівка-вкладиш в упаковку" в контексті даного опису відноситься до інструкцій, які звичайно поміщають в упаковки терапевтичних продуктів, що надходять у продаж, які містять інформацію про показання, застосування, дозу, шляхи введення, комбінованої терапії, протипоказання і/або мерах обережності при застосуванні зазначених терапевтичних продуктів.

Докладний опис варіантів здійснення винаходу

Першим об'єктом даного винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить

(I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, і який містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;

(II) другий антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені.

В одному з варіантів здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 і SEQ ID NO: 33, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 31.

В одному з варіантів здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 7.

В конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з CEA і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 і SEQ ID NO: 26, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30.

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з CEA і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 23, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 27.

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 40, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 і SEQ ID NO: 50.

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 16, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, і SEQ ID NO: 20.

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 41, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 і SEQ ID NO: 51.

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 13, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 17.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить

(I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, і який містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;

(II) другий антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CEA, яка містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 і SEQ ID NO: 26, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 30.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить

(I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 7,

(II) другий антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CEA, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 23, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 27.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить

(I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, і який містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;

(II) другий антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, яка містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 16, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 і SEQ ID NO: 20.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить

(I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 7,

(II) другий антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 13, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 17.

В конкретному варіанті здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент являє собою одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab, в якій або варіабельні ділянки, або константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab обмінені.

В одному з варіантів здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент являє собою канонічну молекулу Fab.

В конкретному варіанті здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент являє собою одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab, в якій константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab обмінені, а другий антигензв'язувальний фрагмент являє собою канонічну молекулу Fab. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу перший і другий антигензв'язувальний фрагмент злиті один з іншим, необов'язково через пептидний лінкер.

В конкретних варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить також Fc-домен, що складається з першої й другої субодиниць, які мають здатність до стабільної асоціації.

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу не більше одного антигензв'язувального фрагмента, що має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, є присутнім в активувальній Т-клітині біспецифічній антигензв'язувальній молекулі (тобто активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула відрізняється одновалентним зв'язуванням з CD3).

Формати активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул

Компоненти активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули можна зливати один з іншим в різних конфігураціях. Приклади конфігурацій представлені на фіг. 1, 3 і 5.

В конкретних варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить Fc-домен, що складається з першої й другої субодиниць, які мають здатність до стабільної асоціації. В деяких варіантах здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену.

В одному із зазначених варіантів здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула практично складається з першого і другого антигензв'язувальних фрагментів, Fc-домену, що складається з першої й другої субодиниць, і необов'язково одного або декількох пептидних лінкерів, в якій перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента, а другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. Необов'язково легкий ланцюг Fab першого антигензв'язувального фрагмента і легкий ланцюг Fab другого антигензв'язувального фрагмента можуть додатково бути злиті один з іншим.

В іншому зазначеному варіанті здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула практично складається з першого і другого антигензв'язувального фрагмента, Fc-домену, що складається з першої й другої субодиниць, і не обов'язково одного або декількох пептидних лінкерів, в якій перший і другий антигензв'язувальні фрагменти кожний злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену.

В інших варіантах здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену.

В зазначеному конкретному варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула практично складається з першого і другого антигензв'язувальних фрагментів, Fc-домену, що складається з першої й другої субодиниць, і не обов'язково одного або декількох пептидних лінкерів, в якій другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента, а перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. Не обов'язково легкий ланцюг Fab першого антигензв'язувального фрагмента і легкий ланцюг Fab другого антигензв'язувального фрагмента можуть додатково бути злиті один з іншим.

Антигензв'язувальні фрагменти можуть бути злиті з Fc-доменом або один з іншим безпосередньо або через пептидний лінкер, який містить одну або декілька амінокислот, як правило, приблизно 2-20 амінокислот. Пептидні лінкери відомі в даній галузі техніки і представлені в даному описі. Прийнятні неімуногенні пептидні лінкери містять, наприклад, пептидні лінкери  $(G_4S)_n$ ,  $(SG_4)_n$ ,  $(G_4S)_n$  або  $G_4(SG_4)_n$ . "n" означає звичайно число від 1 до 10, як правило, від 2 до 4. Найбільш прийнятним пептидним лінкером для злиття легких ланцюгів Fab першого і другого антигензв'язувального фрагмента один з іншим є  $(G_4S)_2$ . Прикладом пептидного лінкера, придатного для поєднання важких ланцюгів Fab першого і другого антигензв'язувального фрагмента, є EPKSC(D)-(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 105 і 106). крім того, лінкери можуть містити шарнірну область імуноглобуліну (або її частину). Зокрема, коли антигензв'язувальний фрагмент злитий з N-кінцем субодиниці Fc-домену, то він може бути злитий через шарнірну область імуноглобуліну або її частину з застосуванням додаткового пептидного лінкера або без нього.

Активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, один антигензв'язувальний фрагмент якої має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені (наприклад, як продемонстровано на фіг. 1А, 1Г, 1Е або 1З), можна застосовувати, зокрема в випадках, в яких можна очікувати інтерналізацію антигену клітини-мішені після зв'язування антигензв'язувального фрагмента, що має високу афінність. В таких випадках наявність більше одного антигензв'язувального фрагмента, специфічного у відношенні антигену клітини-мішені, може підвищувати інтерналізацію антигену клітини-мішені, знижуючи тим самим його доступність.

Однак в багатьох інших випадках є доцільним одержувати активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка містить два або більшу кількість антигензв'язувальних фрагментів, специфічних у відношенні антигену клітини-мішені (наприклад, як продемонстровано на фіг. 1Б, 1В, 1Д або 1Ж), наприклад, для оптимізації спрямованого переносу до сайту-мішені або для забезпечення перехресного зшивання антигенів клітини-мішені.

Таким чином, в деяких варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, запропонована у винаході, додатково містить третій антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені. В одному з варіантів здійснення винаходу третій антигензв'язувальний фрагмент являє собою молекулу канонічного Fab. В одному з варіантів здійснення винаходу третій антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з тим же антигеном клітини-мішені, що і другий антигензв'язувальний фрагмент. В конкретному варіанті здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, а другий і третій антигензв'язувальні фрагменти мають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені. В конкретному варіанті



вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 і SEQ ID NO: 50.

В іншому варіанті здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з CD3 і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; а другий і третій антигензв'язувальні фрагменти мають здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, при цьому другий і третій антигензв'язувальні фрагменти містять щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 40, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 і SEQ ID NO: 50.

В одному з варіантів здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з CD3 і містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; а другий і третій антигензв'язувальні фрагменти мають здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, при цьому другий і третій антигензв'язувальні фрагменти містять щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 16, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 і SEQ ID NO: 20.

В одному з варіантів здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з CD3 і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 і SEQ ID NO: 33, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 31, а другий і третій антигензв'язувальні фрагменти мають здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, при цьому другий і третій антигензв'язувальні фрагменти містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 41, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 і SEQ ID NO: 51.

В одному з варіантів здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з CD3 і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 7, а другий і третій антигензв'язувальні фрагменти мають здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, при цьому другий і третій антигензв'язувальні фрагменти містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 13, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 17.

В одному з варіантів здійснення винаходу третій антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. В більше конкретному варіанті здійснення винаходу другий і третій антигензв'язувальний фрагмент кожний злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, а перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента. Необов'язково легкий ланцюг Fab першого антигензв'язувального фрагмента і легкий ланцюг Fab другого антигензв'язувального фрагмента можуть бути додатково злиті один з іншим.



Другий і третій антигензв'язувальний фрагмент можуть бути злиті з Fc-доменом безпосередньо або через пептидний лінкер. В конкретному варіанті здійснення винаходу другий і третій антигензв'язувальний фрагмент кожний злитий з Fc-доменом через шарнірну область імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу шарнірна область імуноглобуліну являє собою шарнірну область людського IgG<sub>1</sub>. В одному з варіантів здійснення винаходу другий і третій антигензв'язувальний фрагмент і Fc-домен представляють собою частину молекули імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу молекула імуноглобуліну являє собою імуноглобулін класу IgG. В ще більше конкретному варіанті здійснення винаходу імуноглобулін являє собою імуноглобулін підкласу IgG<sub>1</sub>. В іншому варіанті здійснення винаходу імуноглобулін являє собою імуноглобулін підкласу IgG<sub>4</sub>. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу імуноглобулін являє собою людський імуноглобулін. В інших варіантах здійснення винаходу імуноглобулін являє собою химерний імуноглобулін або гуманізований імуноглобулін. В одному з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула практично складається з молекули імуноглобуліну, яка має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені, і антигензв'язувального фрагмента, що має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, в якій антигензв'язувальний фрагмент являє собою молекулу Fab, насамперед одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab, злику з N-кінцем одного з важких ланцюгів імуноглобуліну, необов'язково через пептидний лінкер.

В конкретному варіанті здійснення винаходу перший і третій антигензв'язувальний фрагмент кожний злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, а другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула практично складається з першого, другого і третього антигензв'язувальних фрагментів, Fc-домену, що складається з першої й другої субодиниць, і необов'язково одного або декількох пептидних лінкерів, в якій другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента, і перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої субодиниці Fc-домену, і в якій третій антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем другої субодиниці Fc-домену. Необов'язково легкий ланцюг Fab першого антигензв'язувального фрагмента і легкий ланцюг Fab другого антигензв'язувального фрагмента можуть додатково бути злиті один з іншим.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить

(I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, яка містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 4, CDR 2 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 5, CDR 3 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 9, і CDR 3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 10, в якій перший антигензв'язувальний фрагмент являє собою одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab, в якій або варіабельні, або константні ділянки, насамперед константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab, обмінені;

(II) другий і третій антигензв'язувальні фрагменти, кожний з яких являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CEA, яка містить CDR 1 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 24, CDR 2 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 25, CDR 3 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 26, CDR 1 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 28, CDR 2 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 29, і CDR3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 30.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить

(I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 7, в якій перший антигензв'язувальний фрагмент являє собою одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab, в якій або варіабельні, або константні ділянки, насамперед константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab, обмінені;

(II) другий і третій антигензв'язувальні фрагменти, кожний з яких являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CEA, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 23, і  
 5 варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 27.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить

10 (I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, яка містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 4, CDR 2 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 5, CDR 3 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 9, і CDR 3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 10, в якій перший  
 15 антигензв'язувальний фрагмент являє собою одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab, в якій або варіабельні, або константні ділянки, насамперед константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab, обмінені;

(II) другий і третій антигензв'язувальні фрагменти, кожний з яких являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, яка містить CDR 1 важкого ланцюга, що має  
 20 SEQ ID NO: 14, CDR 2 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 15, CDR 3 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 16, CDR 1 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 18, CDR 2 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 19, і CDR3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 20.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить

25 (I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку  
 30 легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 7, в якій перший антигензв'язувальний фрагмент являє собою одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab, в якій або варіабельні, або константні ділянки, насамперед константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab, обмінені;

(II) другий і третій антигензв'язувальні фрагменти, кожний з яких являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з MCSP, яка варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 13, і варіабельну  
 35 ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 17.

Активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, зазначена у будь-якому з чотирьох наведених вище варіантів здійснення винаходу, може додатково містити (III) Fc-домен, що складається з першої й другої субодиниць, які мають здатність до стабільної асоціації, в якій другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з  
 45 N-кінцем важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента, і перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої субодиниці Fc-домену, і в якій третій антигензв'язувальний домен злитий на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем другої субодиниці Fc-домену.

В деяких активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекулах, які запропоновані у винаході, легкий ланцюг Fab першого антигензв'язувального фрагмента і  
 50 легкий ланцюг Fab другого антигензв'язувального фрагмента злиті один з іншим, необов'язково через пептидний лінкер. Залежно від конфігурації першого і другого антигензв'язувальних фрагментів легкий ланцюг Fab першого антигензв'язувального фрагмента може бути злита на її С-кінці з N-кінцем легкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента, або легкий ланцюг Fab другого антигензв'язувального фрагмента може бути злита на її С-кінці з N-кінцем  
 55 легкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента. Злиття легких ланцюгів Fab першого і другого антигензв'язувальних фрагментів додатково зменшує помилкове спарювання невідповідних важких і легких ланцюгів Fab, а також знижує кількість плазмід, необхідних для експресії деяких активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які  
 60 запропоновані у винаході.



свою чергу поєднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з субодиноцею Fc-домену ( $VH_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$ ). В інших варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить поліпептид, в якому важкий ланцюг Fab другого антигензв'язувального фрагмента поєднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з варіабельною ділянкою важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента, який в свою чергу поєднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною ділянкою легкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента (тобто перший антигензв'язувальний фрагмент містить одержаний в результаті кросинговеру важкий ланцюг Fab, в якому константна ділянка важкого ланцюга замінена на константну область легкого ланцюга), який в свою чергу поєднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з субодиноцею Fc-домену ( $VH_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CL_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$ ).

В деяких із зазначених варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить поліпептид одержаної в результаті кросинговеру легкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента, в якому варіабельна ділянка важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента поєднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною ділянкою легкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента ( $VH_{(1)}-CL_{(1)}$ ), і поліпептид легкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента ( $VL_{(2)}-CL_{(2)}$ ). В інших зазначених варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить поліпептид одержаної в результаті кросинговеру легкого ланцюга Fab, в якій варіабельна ділянка легкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента поєднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною ділянкою важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента ( $VL_{(1)}-CH1_{(1)}$ ), і поліпептид легкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента ( $VL_{(2)}-CL_{(2)}$ ). В наступних зазначених варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула додатково містить поліпептид, в якому варіабельна ділянка легкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента поєднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною ділянкою важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента, який в свою чергу поєднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з поліпептидом легкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента ( $VL_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CL_{(2)}$ ), поліпептид, в якому варіабельна ділянка важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента поєднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною ділянкою легкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента, який в свою чергу поєднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з поліпептидом легкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента ( $VH_{(1)}-CL_{(1)}-VL_{(2)}-CL_{(2)}$ ), поліпептид, в якому поліпептид легкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента поєднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з варіабельною ділянкою легкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента, який в свою чергу поєднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною ділянкою важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента ( $VL_{(2)}-CL_{(2)}-VL_{(1)}-CH1_{(1)}$ ), або поліпептид, в якому поліпептид легкого ланцюга Fab другого антигензв'язувального фрагмента поєднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з варіабельною ділянкою важкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента, який в свою чергу поєднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною ділянкою легкого ланцюга Fab першого антигензв'язувального фрагмента ( $VL_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(1)}-CL_{(1)}$ ).

Активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула згідно з зазначеними варіантами здійснення винаходу може містити також (I) поліпептид субодиноці Fc-домену ( $CH2-CH3(-CH4)$ ) або (II) поліпептид, в якому важкий ланцюг Fab третього антигензв'язувального фрагмента поєднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з субодиноцею Fc-домену ( $VH_{(3)}-CH1_{(3)}-CH2-CH3(-CH4)$ ), і поліпептид легкого ланцюга Fab третього антигензв'язувального фрагмента ( $VL_{(3)}-CL_{(3)}$ ). В деяких варіантах здійснення винаходу поліпептиди ковалентно зв'язані, наприклад, за допомогою дисульфідного зв'язку.

Згідно з будь-яким зазначеним вище варіантам здійснення винаходу компоненти активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули (наприклад, антигензв'язувальний фрагмент, Fc-домен) можуть бути злиті безпосередньо або через різні лінкери, зокрема, пептидні лінкери, які містять одну або декілька амінокислот, як правило, приблизно 2-20 амінокислот, які представлені в даному описі або відомі в даній галузі техніки. Прийнятні неімуногенні пептидні лінкери містять, наприклад, пептидні лінкери  $(G_4S)_n$ ,  $(SG_4)_n$ ,  $(G_4S)_n$  або  $G_4(SG_4)_n$ , в яких n звичайно означає число від 1 до 10, як правило, від 2 до 4.

Fc-домен

Fc-домен активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули складається з пари поліпептидних ланцюгів, що містять домени важкого ланцюга молекули імуноглобуліну. Наприклад, Fc-домен молекули імуноглобуліну G (IgG) являє собою димер, кожна з субодиниць якого містить константні домени CH2 і CH3 важкого ланцюга IgG. Две субодиниці Fc-домену мають здатність до стабільної асоціації один з іншим. В одному з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, запропонована у винаході, містить не більше одного Fc-домену.

В одному з варіантів здійснення Fc-домен активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули являє собою Fc-домен IgG. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG<sub>1</sub>. В іншому варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG<sub>4</sub>. В більше конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG<sub>4</sub>, який містить амінокислотну заміну в положенні S228 (нумерація за Кеботом), зокрема, амінокислотну заміну S228P. Эта амінокислотна заміна знижує обмін *in vivo* в Fab-плече антитіл у вигляді IgG<sub>4</sub> (див. Stubenrauch та інш., Drug Metabolism and Disposition 38, 2010, сс. 84-91). В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен є людським. Наведена як приклад послідовність Fc-ділянки людського IgG<sub>1</sub> представлена в SEQ ID NO: 107.

Модифікації Fc-домену, що посилюють гетеродимеризацію

Активувальні Т-клітини біспецифічні антигензв'язувальні молекули, запропоновані у винаході, містять різні антигензв'язувальні фрагменти, злиті з однією або з іншою з двох субодиниць Fc-домену, при цьому дві субодиниці Fc-домену, як правило, містяться в двох неідентичних поліпептидних ланцюгах. Рекombінантна сумісна експресія цих поліпептидів і наступна димеризація приводить до декількох можливих комбінацій двох поліпептидів. Для підвищення виходу й чистоти активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул при їх одержанні методами рекомбінації є доцільним інтродукувати в Fc-домен активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули модифікацію, яка посилює асоціацію необхідних поліпептидів.

Таким чином, в конкретних варіантах здійснення винаходу Fc-домен активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, містить модифікацію, яка посилює асоціацію першої й другої субодиниць Fc-домену. Сайт найбільш сильного білок-білкового взаємодії двох субодиниць Fc-домену людського IgG знаходиться в CH3-домени Fc-домену. Таким чином, в одному з варіантів здійснення винаходу зазначена модифікація знаходиться в CH3-домени Fc-домену.

В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена модифікація являє собою так звану модифікацію типу "knob-in-hole" (типу "виступ-западина"), яка охоплює модифікацію, що призводить до утворення "виступу" в одній з двох субодиниць Fc-домену і до утворення "западини" в іншій одній з двох субодиниць Fc-домену.

Технологія "knob-into-hole" описана, наприклад, в US № 5731168; US № 7695936; у Ridgway та інш., Prot Eng 9, 1996, сс. 617-621 і Carter, J Immunol Meth 248, 2001, сс. 7-15. В цілому, метод охоплює інтродукцію опуклості ("виступ") на поверхні розділення першого поліпептиду і відповідної порожнини ("западина") в поверхні розділення другого поліпептиду, в результаті опуклість може поміщатися в порожнину, посилюючи тим самим утворення гетеродимера і перешкоджаючи утворенню гомодимера. Опуклості конструюють шляхом заміни амінокислот з невеликими бічними ланцюгами на поверхні розділення першого поліпептиду на амінокислоти з більше крупними бічними ланцюгами (наприклад, на тирозин або триптофан). Компенсувальні порожнини ідентичного або схожого з випуклостями розміру конструюють в поверхні розділення другого поліпептиду шляхом заміни амінокислот з крупними бічними ланцюгами на амінокислоти з менш крупними бічними ланцюгами (наприклад, аланін або треонін).

Таким чином, в конкретному варіанті здійснення винаходу в CH3-домени першої субодиниці Fc-домену активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули амінокислотний залишок замінений амінокислотним залишком, який має більший об'єм бокового ланцюга, що приводить до утворення опуклості в CH3-домени першої субодиниці, яка може поміщатися в порожнину в CH3-домени другої субодиниці, і в CH3-домени другої субодиниці Fc-домену амінокислотний залишок замінений амінокислотним залишком, який має менший об'єм бокового ланцюга, що приводить до утворення порожнини в CH3-домени другої субодиниці, в яку може поміщатися опуклість в CH3-домени першої субодиниці.

Опуклість і порожнину можна створювати шляхом зміни нуклеїнових кислот, що кодують поліпептиди, наприклад, за допомогою сайтспрямованого мутагенезу або шляхом пептидного синтезу.

В конкретному варіанті здійснення винаходу в СН3-домені першої субодиниці Fc-домену залишок треоніну в положенні 366 замінений залишком триптофану (T366W), і в СН3-домені другої субодиниці Fc-домену залишок тирозину в положенні 407 замінений залишком валіну (Y407V). В одному з варіантів здійснення винаходу у другій суб'єдиніці Fc-домену додатково залишок треоніну в положенні 366 замінений залишком серину (T366S) і залишок лейцину в положенні 368 замінений залишком аланіну (L368A).

В наступному варіанті здійснення винаходу в першій суб'єдиніці Fc-домену додатково залишок серину в положенні 354 замінений залишком цистеїну (S354C) і у другій субодиниці Fc-домену додатково залишок тирозину в положенні 349 замінений залишком цистеїну (Y349C). Інтродукція цих двох залишків цистеїну приводить до утворення дисульфідного містка між двома субодиницями Fc-домену, що додатково стабілізує димер (Carter, J Immunol Methods 248, 2001, сс. 7-15).

В конкретному варіанті здійснення винаходу антигензв'язувальний фрагмент, який має здатність зв'язуватися з CD3, злитий (необов'язково через антигензв'язувальний фрагмент, який має здатність зв'язуватися з антигеном клітини-мішені) з першою субодиницею Fc-домену (яка містить модифікацію, яка приводить до утворення "виступа"). Якщо не вдаватись у будь-яку теорію, злиття антигензв'язувального фрагмента, який має здатність зв'язуватися з CD3, з що містить "виступ" субодиницею Fc-домену повинно (додатково) мінімізувати утворення антигензв'язувальних молекул, що містять два антигензв'язувальних фрагменти, які мають здатність зв'язуватися з CD3 (стеричне "зіткнення" двох поліпептидів, що містять "виступ").

В альтернативному варіанті здійснення винаходу модифікація, що посилює асоціацію першої й другої субодиниці Fc-домену, являє собою модифікацію, що опосередковує визначувані електростатичною дією впливи, наприклад, описані в публікації PCT WO 2009/089004. В цілому, зазначений метод охоплює заміну одного або декількох амінокислотних залишків на поверхні розділення двох субодиниць Fc-домену на зарядженні амінокислотні залишки, в результаті чого утворення гомодимера стає електростатично не вигідним, а гетеродимеризація стає електростатично вигідною.

Модифікації Fc-домену, що приводять до зниження зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторної функції

Fc-домен надає активувальній Т-клітині біспецифічній антигензв'язувальній молекулі переважні фармакокінетичні властивості, включаючи тривалий час напівжиття в сироватці, що забезпечує гарне накопичення в тканині-мішені й переважне співвідношення розподілу в тканині-крові. Однак в той самий час він може приводити до небажаної спрямованості активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули до клітин, які експресують Fc-рецептори, а не до переважних клітин, що несуть антиген. крім того, сумісна активація шляхів передачі сигналів Fc-рецептора може приводити до вивільнення цитокінів, що в поєднанні з активувальними Т-клітини властивостями і тривалим часом напівжиття антигензв'язувальної молекули, приводить до надлишкової активації цитокінових рецепторів і значних побічних дій при системному введенні. Активація (що несуть Fc-рецептор) імунних клітин, відмінних від Т-клітин, може навіть знижувати ефективність активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули з причини можливої деструкції Т-клітин, наприклад, НК-клітинами.

Таким чином, згідно з конкретним варіантам здійснення винаходу Fc-домен активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, має знижену афінність зв'язування з Fc-рецептором і/або зниженою ефекторною функцією у порівнянні з нативним Fc-доменом IgG<sub>1</sub>. В одному із зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен (або активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить зазначений Fc-домен) характеризується афінністю зв'язування, яка складає менше ніж 50 %, переважно менше ніж 20 %, більше переважно менше ніж 10 % і найбільш переважно менше ніж 5 % від афінності зв'язування з Fc-рецептором нативного Fc-домену IgG<sub>1</sub> (або активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, що містить зазначений нативний Fc-домен IgG<sub>1</sub>), і/або ефекторною функцією, яка складає менше ніж 50 %, переважно менше ніж 20 %, більше переважно менше ніж 10 % і найбільш переважно менше ніж 5 % від ефекторної функції нативного Fc-домену IgG<sub>1</sub> (або активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, що містить зазначений нативний Fc-домен IgG<sub>1</sub>). В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен (або активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить зазначений Fc-домен) практично не зв'язується з Fc-рецептором і/або не індукує ефекторну функцію. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою Fcγ-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою людський Fc-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-рецептор

являє собою активувальний Fc-рецептор. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою активувальний людський Fc $\gamma$ -рецептор, більше конкретно людський Fc $\gamma$ R11a, Fc $\gamma$ RI або Fc $\gamma$ R11a, найбільш переважно людський Fc $\gamma$ R11a. В одному з варіантів здійснення винаходу ефекторна функція являє собою одну або декілька функцій, вибраних з групи, що містить CDC, ADCC, ADCP і секрецію цитокінів. В конкретному варіанті здійснення винаходу ефекторна функція являє собою ADCC. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен характеризується практично такою ж самою афінністю зв'язування з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), що і нативний Fc-домен IgG<sub>1</sub>. Практично таке ж зв'язування з FcRn досягається, коли Fc-домен (або активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить зазначений Fc-домен), характеризується афінністю зв'язування, яка складає більше ніж приблизно 70 %, переважно більше ніж приблизно 80 %, більше переважно більше ніж приблизно 90 %, від афінності зв'язування нативного Fc-домену IgG<sub>1</sub> (або активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, який містить нативний Fc-домен IgG<sub>1</sub>) з FcRn.

Згідно з деякими варіантами здійснення винаходу Fc-домен конструюють так, щоб він мав знижену афінність зв'язування з Fc-рецептором і/або знижену ефекторну функцію у порівнянні з Fc-доменом, який не піддавали інженерії. В конкретних варіантах здійснення винаходу Fc-домен активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули містить одну або декілька амінокислотних мутацій, які знижують афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію. Як правило, одна або декілька однакових амінокислотних мутацій є присутніми в кожній з двох субодиниць Fc-домену. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені амінокислотні мутації знижують афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором щонайменше в 2 рази, щонайменше в 5 раз або щонайменше в 10 раз. Згідно з варіантам здійснення винаходу, в яких має місце більше однієї амінокислотної мутації, які знижують афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором, комбінація зазначених амінокислотних мутацій може знижувати афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором щонайменше в 10 разів, щонайменше в 20 разів або щонайменше в 50 разів. В одному з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить сконструйований Fc-домен, характеризується афінністю зв'язування, яка складає менше ніж 20 %, зокрема, менше ніж 10 %, більше переважно менше ніж 5 % від афінності зв'язування з Fc-рецептором, характерної для активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, що містить Fc-домен, який не піддавали інженерії. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою Fc $\gamma$ -рецептор. В деяких варіантах здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою людський Fc-рецептор. В деяких варіантах здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою активувальний Fc-рецептор. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою активувальний людський Fc-рецептор, більше конкретно людський Fc $\gamma$ R11a, Fc $\gamma$ RI або Fc $\gamma$ R11a, найбільш переважно людський Fc $\gamma$ R11a. Переважно уменшається зв'язування з кожним з цих рецепторів. Згідно з деякими варіантами здійснення винаходу знижується також афінність зв'язування з компонентом системи комплементу, зокрема, афінність зв'язування з C1q. Згідно з одному з варіантів здійснення винаходу не знижується афінність зв'язування з неонатальним Fc-рецептором (FcRn). Практично таке ж саме зв'язування з FcRn, тобто зберігання афінності зв'язування Fc-домену з зазначеним рецептором, досягається, коли Fc-домен (або активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить зазначений Fc-домен) характеризується афінністю зв'язування з FcRn, яка складає більше ніж приблизно 70 % від афінності зв'язування з FcRn форми Fc-домену, яку не піддавали інженерії (або активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, що містить форму Fc-домену, яку не піддавали інженерії). Fc-домен або біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, які містять зазначений Fc-домен, можуть характеризуватися афінністю, яка складає більше ніж приблизно 80 % і навіть більше ніж приблизно 90 % від зазначеної вище афінності. В деяких варіантах здійснення винаходу Fc-домен активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули створюють так, щоб він мав знижену ефекторну функцію у порівнянні з Fc-доменом, який не піддавали інженерії. Знижена ефекторна функція може представляти собою (але, не обмежуючись тільки ними) знижену одну або декілька з наступних функцій: знижена комплемент-залежна цитотоксичність (CDC), знижена антитіло-зумовлена клітинно-залежна цитотоксичність (ADCC), понижений антитіло-зумовлений клітинно-залежний фагоцитоз (ADCP), знижена секреція цитокінів, знижене опосередковане імунним комплексом поглинання антигену антигенпрезентувальними клітинами, знижене зв'язування з NK-клітинами, знижене зв'язування з макрофагами, знижене зв'язування з моноцитами, знижене зв'язування з поліморфоядерними клітинами, знижена безпосередня передача сигналу, що індукуює апоптоз,

знижене перехресне зшивання зв'язаних з мішенню антитіл, знижене дозрівання дендритних клітин або знижене Т-клітинне примірування. В одному з варіантів здійснення винаходу знижена ефекторна функція являє собою одну або декілька функцій, вибраних з групи, що містить знижену CDC, знижену ADCC, знижений ADCP і знижену секрецію цитокінів. В конкретному

5 варіанті здійснення винаходу знижена ефекторна функція являє собою знижену ADCC. В одному з варіантів здійснення винаходу знижена ADCC складає менше 20 % від ADCC, яка індукується не підданим інженерії Fc-доменом (або активувальною Т-клітини біспецифічною антигензв'язувальною молекулою, що містить не підданий інженерії Fc-домен).

В одному з варіантів здійснення винаходу амінокислотна мутація, яка знижує афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію, являє собою амінокислотну заміну. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні, вибраному з E233, L234, L235, N297, P331 і P329. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні, вибраному з L234, L235 і P329. В деяких варіантах здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотні заміни L234A і L235A. В одному із зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG<sub>1</sub>, зокрема, Fc-домен людського IgG<sub>1</sub>. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні P329. В більше конкретному варіанті здійснення винаходу амінокислотна заміна являє собою P329A або P329G, насамперед P329G. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні P329 і додаткову амінокислотну заміну в положенні, вибраному з E233, L234, L235, N297 і P331. В більше конкретному варіанті здійснення винаходу додаткова амінокислотна заміна являє собою E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D або P331S. В конкретних варіантах здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотні заміни в положеннях P329, L234 і L235. В більше конкретних варіантах здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотні мутації L234A, L235A і P329G ("P329G LALA"). В одному із зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG<sub>1</sub>, зокрема Fc-домен людського IgG<sub>1</sub>. Комбінація амінокислотних замін "P329G LALA" практично повністю елімінує зв'язування з Fcγ-рецептором (а також комплементом) Fc-домену людського IgG<sub>1</sub>, що описано в заявці на патент PCT PCT/EP2012/055393, яка повністю включена в даний опис як посилання. В PCT/EP2012/055393 описані також методи одержання зазначених мутантних Fc-доменів, методи вивчення їх властивостей, таких як зв'язування з Fc-рецептором або ефекторні функції.

Антитіла підкласу IgG<sub>4</sub> мають зниженою афінністю до зв'язування з Fc-рецепторами і зниженими ефекторними функціями у порівнянні з антитілами підкласу IgG<sub>1</sub>. Таким чином, в деяких варіантах здійснення винаходу Fc-домен активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які запропоновані у винаході, являє собою Fc-домен IgG<sub>4</sub>, зокрема Fc-домен людського IgG<sub>4</sub>. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен IgG<sub>4</sub> містить амінокислотні заміни в положенні S228, конкретно амінокислотну заміну S228P. Для додаткового зниження афінності зв'язування з Fc-рецептором і/або його ефекторною функції в одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен IgG<sub>4</sub> містить амінокислотну заміну в положенні L235, зокрема, амінокислотну заміну L235E. В іншому варіанті здійснення винаходу Fc-домен IgG<sub>4</sub> містить амінокислотну заміну в положенні P329, зокрема, амінокислотну заміну P329G. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен IgG<sub>4</sub> містить амінокислотні заміни в положеннях S228, L235 і P329, зокрема, амінокислотні заміни S228P, L235E і P329G. Зазначені мутанти Fc-домену IgG<sub>4</sub> і їх особливості зв'язування з Fcγ-рецептором описані в заявці на патент PCT PCT/EP2012/055393, яка повністю включена в даний опис як посилання.

В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен, що характеризується зниженою афінністю зв'язування з Fc-рецептором і/або зниженою ефекторною функцією у порівнянні з нативним Fc-доменом IgG<sub>1</sub>, являє собою Fc-домен людського IgG<sub>1</sub>, який містить амінокислотні заміни L234A, L235A і необов'язково P329G, або Fc-домен людського IgG<sub>4</sub>, який містить амінокислотні заміни S228P, L235E і необов'язково P329G.

В деяких варіантах здійснення винаходу елімінували N-глікозилювання Fc-домену. В одному із зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотну мутацію в положенні N297, зокрема, амінокислотну заміну аспарагіну на аланін (N297A) або аспарагінову кислоту (N297D).

Окрім Fc-доменів, описаних вище і в заявці на патент PCT PCT/EP2012/055393, Fc-домени зі зниженою здатністю зв'язуватися з Fc-рецептором і/або ефекторною функцією містять також Fc-домени з заміною одного або декількох залишків 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 в Fc-домени (US № 637056). До зазначених мутантів Fc відносяться мутанти Fc з замінами в двох або більшій кількості з амінокислотних положень 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так званий мутант Fc-домену "DANA" з заміною залишків 265 і 297 на аланін (US № 7332581).



Мутантні Fc-домени можна одержувати шляхом амінокислотної делеції, заміни, інсерції або модифікації з застосуванням генетичних або хімічних методів, добре відомих в даній галузі. Генетичні методи можуть містити сайтспрямований мутагенез кодувальної ДНК послідовності, ПЦР, синтез генів тощо. Правильність нуклеотидних замін можна підтверджувати, наприклад, секвенуванням.

Зв'язування з Fc-рецепторами можна легко визначати, наприклад, за допомогою ELISA або поверхневого плазмонного резонансу (SPR) з застосуванням стандартного обладнання, такого як пристрій BIAcore (фірма GE Healthcare), й із застосуванням таких Fc-рецепторів, які можна одержувати методом рекомбінантної експресії. Прийнятний зазначений аналіз зв'язування представлений в даному описі. Альтернативно до цього, афінність зв'язування Fc-доменів або активувальних клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, що містять Fc-домен, з Fc-рецепторами можна оцінювати з застосуванням клітинних ліній, для яких відомо, що вони експресують конкретні Fc-рецептори, такі як людські NK-клітини, що експресують FcγIIIa-рецептор.

Ефекторну функцію Fc-домену або активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, що містить Fc-домен, можна оцінювати методами, відомими в даній ділянці. Прийнятний аналіз для оцінювання ADCC представлений в даному описі. Інші приклади аналізів *in vitro*, призначених для оцінювання ADCC-активності молекули, яка представляє інтерес описані в US № 5500362; у Hellstrom та інш., Proc Natl Acad Sci USA 83, 1986, сс. 7059-7063 і Hellstrom та інш., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1985, сс. 1499-1502; US № 5821337; у Bruggemann та інш., J Exp Med 166, 1987, сс. 1351-1361. Альтернативно до цього, можна застосовувати методи, основані на нерадіоактивному аналізі (див., наприклад, ACT1™ - нерадіоактивний аналіз цитотоксичності за допомогою проточної цитометрії (фірма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, шт. Калифорнія); і CytoTox 96® - нерадіоактивний аналіз цитотоксичності (фірма Promega, Медисон, шт. Вісконсин)). Прийнятними ефекторними клітинами для таких аналізів є моноклеарні клітини периферійної крові (PBMC) і природні клітини-кілери (NK). В альтернативному або додатковому варіанті ADCC-активність молекули, яка представляє інтерес можна оцінювати *in vivo*, наприклад, із застосуванням створених на тваринах моделей, описаних у Clynes та інш., Proc Natl Acad Sci USA 95, 1998, сс. 652-656.

В деяких варіантах здійснення винаходу змінюють зв'язування Fc-домену з компонентом системи комплементу, зокрема з C1q. Таким чином, в деяких варіантах здійснення винаходу, в яких Fc-домен конструюють так, щоб він мав змінену ефекторну функцію, зазначена змінена ефекторна функція охоплює змінену CDC. Можна здійснювати аналізи зв'язування C1q для вирішення питання про те, чи може активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула зв'язуватися з C1q і, як наслідок, чи має вона CDC-активність (див., наприклад, аналізи зв'язування з C1q і C3c за допомогою ELISA, описані в WO 2006/029879 і WO 2005/100402). Для оцінювання активації комплементу можна здійснювати аналіз CDC (див., наприклад, Gazzano-Santoro та інш., J Immunol Methods 202, 1996, з. 163; Cragg та інш., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 і Cragg і Glennie, Blood 103, 2004, сс. 2738-2743).

#### Антигензв'язувальні фрагменти

Антигензв'язувальна молекула, запропонована у винаході, є біспецифічною, тобто вона містить щонайменше два антигензв'язувальних фрагменти, що мають здатність специфічно зв'язуватися з двома різними антигенними детермінантами. Згідно з винаходом антигензв'язувальні фрагменти представляють собою молекули Fab (тобто антигензв'язувальні домени, що складаються з важкого і легкого ланцюга, кожна з яких містить варіабельну і константну ділянку). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені молекули Fab є людськими. В іншому варіанті здійснення винаходу зазначені молекули Fab є гуманізованими. В наступному варіанті здійснення винаходу зазначені молекули Fab містять константні ділянки людського важкого і легкого ланцюга.

Щонайменше один з антигензв'язувальних фрагментів являє собою одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab. Зазначена модифікація перешкоджає помилковому спарюванню важких і легких ланцюгів з різних молекул Fab, підвищуючи тим самим вихід і чистоту активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, при рекомбінантному одержанні. В конкретній одержаній в результаті кросинговеру молекулі Fab, яку можна застосовувати для створення активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, обмінені константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab. В іншій одержаній в результаті кросинговеру молекулі Fab, яку можна застосовувати для створення активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, обмінені варіабельні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab.

В конкретному варіанті здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула має здатність одночасно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені, зокрема, антигеном пухлинної клітини, і з CD3. В одному з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула має здатність до перехресного зшивання Т-клітини і клітини-мішені в результаті одночасного зв'язування з антигеном клітини-мішені і з CD3. В ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначене одночасне зв'язування приводить до лізису клітини-мішені, зокрема, пухлинної клітини. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначене одночасне зв'язування приводить до активації Т-клітини. В інших варіантах здійснення винаходу зазначене одночасне зв'язування приводить до клітинної відповіді Т-лімфоциту, насамперед цитотоксичного Т-лімфоциту, вибраного з групи, що містить: проліферацію, диференціювання, секрецію цитокінів, вивільнення цитотоксичних ефекторних молекул, цитотоксичну активність і експресію маркерів активації. В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язування активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули з CD3 без одночасного зв'язування з антигеном клітини-мішені не приводить до Т-клітинної активації.

В одному з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула має здатність переорієнтовувати цитотоксичну активність Т-клітини до клітини-мішені. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена переорієнтація не залежить від опосередкованої ГКГС презентації пептидного антигену клітиною-мішенню і/або від специфічності Т-клітини.

Зокрема, згідно з будь-яким з варіантів здійснення винаходу Т-клітина, запропонована у винаході, являє собою цитотоксичну Т-клітину. В деяких варіантах здійснення винаходу Т-клітина являє собою  $CD4^{+}$  або  $CD8^{+}$ -Т-клітину, насамперед  $CD8^{+}$ -Т-клітину.

CD3-зв'язувальний фрагмент

Активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, запропонована у винаході, містить щонайменше один антигензв'язувальний фрагмент, який має здатність зв'язуватися з CD3 (який позначають також в контексті даного опису як "зв'язувальний антиген CD3 фрагмент" або "перший антигензв'язувальний фрагмент"). В конкретному варіанті здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить не більше одного антигензв'язувального фрагмента, що має здатність специфічно зв'язуватися з CD3. В одному з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула характеризується одновалентним зв'язуванням з CD3. Зв'язувальна антиген CD3 молекула являє собою одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab, тобто молекулу Fab, в якій або варіабельні, або константні ділянки важкого і легкого ланцюгів Fab обмінені. У варіантах здійснення винаходу, в яких більше одного антигензв'язувального фрагмента, що має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені, містяться в активувальній Т-клітині біспецифічній антигензв'язувальній молекулі, антигензв'язувальний фрагмент, що має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, переважно являє собою одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab, а антигензв'язувальні фрагменти, що мають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені, представляють собою канонічні молекули Fab.

В конкретному варіанті здійснення винаходу CD3 являє собою людський CD3 (SEQ ID NO: 103) або CD3 мавп циномолгус (SEQ ID NO: 104), найбільш переважно людський CD3. В конкретному варіанті здійснення винаходу зв'язувальний антиген CD3 фрагмент має перехресну реактивність до (тобто специфічно зв'язується з...) з CD3 людини і мавп циномолгус. В деяких варіантах здійснення винаходу перший антигензв'язувальний фрагмент має здатність специфічно зв'язуватися з епсилон-субодиницею CD3.

Зв'язувальний антиген CD3 фрагмент містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10.

В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язувальний антиген CD3 фрагмент містить CDR1 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 4, CDR2 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 5, CDR3 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 6, CDR1 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 8, CDR2 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 9, і CDR3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 10.

В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язувальний антиген CD3 фрагмент містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 і SEQ ID NO: 33, і послідовність варіабельної ділянки легкого

ланцюга, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 31.

В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язувальний антиген CD3 фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 і SEQ ID NO: 33, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи: SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 31.

В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язувальний антиген CD3 фрагмент містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 3, і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 7.

В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язувальний антиген CD3 фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.

В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язувальний антиген CD3 фрагмент послідовної варіабельної ділянки важкого ланцюга SEQ ID NO: 3 і послідовної варіабельної ділянки легкого ланцюга SEQ ID NO: 7.

Фрагмент, зв'язувальний антиген клітини-мішені

Активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, запропонована у винаході, містить щонайменше один антигензв'язувальний фрагмент, що має здатність зв'язуватися з антигеном клітини-мішені (позначений також у контексті даного опису як "фрагмент, зв'язувальний антиген клітини-мішені, або "другий", або "третій" антигензв'язувальний фрагмент). В деяких варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить два антигензв'язувальних фрагмента, які мають здатність зв'язуватися з антигеном клітини-мішені. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу кожний з цих антигензв'язувальних фрагментів специфічно зв'язується з однією і тією ж самою антигенною детермінантою. В ще більше конкретному варіанті здійснення винаходу всі зазначені антигензв'язувальні фрагменти є ідентичними. В одному з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить молекулу імуноглобуліну, яка має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені. В одному з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить не більше двох антигензв'язувальних фрагментів, які мають здатність зв'язуватися з антигеном клітини-мішені.

Фрагмент, зв'язувальний антиген клітини-мішені, як правило, являє собою молекулу Fab, насамперед канонічну молекулу Fab, яка зв'язується з конкретною антигенною детермінантою і має здатність спрямовувати активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу до сайту-мішені, наприклад, до конкретному типу пухлинної клітини, яка несе антигенну детермінанту.

В деяких варіантах здійснення винаходу фрагмент, зв'язувальний антиген клітини-мішені, специфічно зв'язується з антигеном клітинної поверхні. В конкретному варіанті здійснення винаходу фрагмент, зв'язувальний антиген клітини-мішені, специфічно зв'язується з мембрано-проксимальною ділянкою антигену клітинної поверхні. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу зазначений антиген клітинної поверхні являє собою карциномембранальний антиген (CEA) і мембрано-проксимальна ділянка являє собою В3-домен CEA (залишки 208-286 SEQ ID NO: 119). В іншому конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу антиген клітинної поверхні являє собою асоційований з меланою хондроїтинсульфат-протеоглікан (MCSP) і мембрано-проксимальна ділянка являє собою D3-домен MCSP (SEQ ID NO: 118).

В деяких варіантах здійснення винаходу фрагмент, зв'язувальний антиген клітини-мішені, спрямований проти антигену, асоційованого з патологічним станом, такого як антиген, що презентується пухлинною клітиною або інфікованою вірусом клітиною. Прийнятними антигенами є антигени клітинної поверхні, наприклад (але, не обмежуючись тільки ними), рецептори клітинної поверхні. В конкретних варіантах здійснення винаходу антиген являє собою людський антиген. В конкретному варіанті здійснення винаходу антиген клітини-мішені вибирають з групи, що містить асоційований з меланою хондроїтинсульфат-протеоглікан (MCSP) і карциномембранальний антиген (CEA, CEACAM5).

В конкретних варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить по меншій мере один антигензв'язувальний фрагмент, специфічний у відношенні асоційованого з меланою хондроїтинсульфат-протеоглікану (MCSP). В одному з варіантів здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у

відношенні MCSP, містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 40, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 і SEQ ID NO: 50.

В одному з варіантів здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні MCSP, містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 16, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 і SEQ ID NO: 20.

В одному з варіантів здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні MCSP, містить CDR1 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 14, CDR2 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 15, CDR3 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 16, CDR1 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 18, CDR2 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 19, і CDR3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 20.

В іншому варіанті здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні MCSP, містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 41, і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 і SEQ ID NO: 51.

В наступному варіанті здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні MCSP, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 41, і містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 і SEQ ID NO: 51.

В наступному варіанті здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні MCSP, містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 13, і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 17, або їх варіанти, які зберігають функціональність.

В одному з варіантів здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні MCSP, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17.

В одному з варіантів здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні MCSP, містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга SEQ ID NO: 13 і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга SEQ ID NO: 17.

В одному з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 12, поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 53, поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 54, і поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 55.

В конкретних варіантах здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить щонайменше один антигензв'язувальний фрагмент, специфічний у відношенні карциноємбріонального антигену (CEA). В одному з варіантів здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні CEA, містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 і SEQ ID NO: 26, і щонайменше одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 30.

В одному з варіантів здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні CEA, містить CDR1 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 24, CDR2 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 25, CDR3 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 26, CDR1 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 28, CDR2 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 29, і CDR3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 30.

В іншому варіанті здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні CEA, містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 23, і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 27, або її варіанти, які зберігають функціональність.

В одному з варіантів здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні CEA, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27.

В одному з варіантів здійснення антигензв'язувальний фрагмент, який є специфічним у відношенні CEA, містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга SEQ ID NO: 23 і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга SEQ ID NO: 27.

В одному з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 22, поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 56, поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 57, і поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 58.

#### Полінуклеотиди

Винахід відноситься також до виділених полінуклеотидів, які кодують активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, представлені в даному описі, або її фрагмент. В деяких варіантах здійснення винаходу зазначений фрагмент являє собою антигензв'язувальний фрагмент.

Полінуклеотиди, запропоновані у винаході, містять полінуклеотиди, які щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % є ідентичними послідовностям, представленим в SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 і 98, включаючи їх функціональні фрагменти або варіанти.

Полінуклеотиди, що кодують що активують Т-клітини біспецифічні антигензв'язувальні молекули, запропоновані у винаході, можна експресувати у вигляді індивідуального полінуклеотиду, який кодує повну активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, або у вигляді декількох (наприклад, двох або більшої кількості) сумісно експресованих полінуклеотидів. Поліпептиди, які кодуються сумісно експресованими полінуклеотидами, можна поєднувати, наприклад, через дисульфідні зв'язки або іншими шляхами з утворенням функціонально активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули. Наприклад, що являє собою легкий ланцюг частину антигензв'язувального фрагмента може кодуватися полінуклеотидом, який відрізняється від полінуклеотиду, що кодує частину активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, що являє собою важкий ланцюг антигензв'язувального фрагмента, субодиницю Fc-домену і необов'язково (частину) іншого антигензв'язувального фрагмента. При сумісній експресії поліпептиди важкого ланцюга повинні зв'язуватися з поліпептидами легкого ланцюга з утворенням антигензв'язувального фрагмента. В іншому прикладі частина активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка містить одну з двох субодиниць Fc-домену і необов'язково (частину) одного або декількох антигензв'язувальних фрагментів, може кодуватися полінуклеотидом, що відрізняється від полінуклеотиду, який кодує частину активувальної Т-клітини антигензв'язувальної молекули, яка містить другу з двох субодиниць Fc-домену і необов'язково (частину) антигензв'язувального фрагмента. При сумісній експресії субодиниці Fc-домену повинні зв'язуватися з утворенням Fc-домену.

В деяких варіантах здійснення винаходу виділений полінуклеотид кодує повну представлену в даному описі активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході. В інших варіантах здійснення винаходу виділений полінуклеотид кодує поліпептиди, що містяться в представлений в даному описі активувальній Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекулі, яка пропонується у винаході.

Іншим варіантом здійснення даного винаходу є виділений полінуклеотид, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході, або її фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, яка кодує послідовність варіабельної ділянки, представлену в SEQ ID NO: 3, 7, 13, 17, 23, 27, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 41, 43, 46, 47 або 51. Іншим варіантом здійснення даного винаходу є виділений полінуклеотид, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу або її фрагмент, де

полінуклеотид містить послідовність, яка кодує поліпептидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 22, 56, 57, 58, 12, 53, 54 і 55. Іншим варіантом здійснення даного винаходу є виділений полінуклеотид, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу або її фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, яка щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична нуклеотидній послідовності, представлений в SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 або 98. Іншим варіантом здійснення даного винаходу є виділений полінуклеотид, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу або її фрагмент, де полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NOs 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 або 98. Іншим варіантом здійснення даного винаходу є виділений полінуклеотид, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу або її фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, яка кодує послідовність варіабельної ділянки, яка щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, 7, 13, 17, 23, 27, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 41, 43, 46, 47 або 51. Іншим варіантом здійснення даного винаходу є виділений полінуклеотид, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу або її фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, яка кодує поліпептидну послідовність, яка щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 22, 56, 57, 58, 12, 53, 54 або 55. Винахід відноситься до виділеного полінуклеотиду, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу або її фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, яка кодує послідовність варіабельної ділянки SEQ ID NO: 3, 7, 13, 17, 23, 27, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 41, 43, 46, 47 або 51 з консервативними амінокислотними замінами. Винахід відноситься також до виділеного полінуклеотиду, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу або її фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, яка кодує поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 22, 56, 57, 58, 12, 53, 54 або 55 з консервативними амінокислотними замінами.

В деяких варіантах здійснення винаходу полінуклеотид або нуклеїнова кислота являє собою ДНК. В інших варіантах здійснення винаходу полінуклеотид, що пропонується в даному винаході, являє собою РНК, наприклад, в формі матричної РНК (мРНК). РНК, яка пропонується в даному винаході, може бути одноланцюговою або дволанцюговою.

#### Методи рекомбінації

Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, можна одержувати, наприклад, шляхом твердофазного пептидного синтезу (наприклад, твердофазний синтез Меррифільда) або методом рекомбінації. Для рекомбінантного одержання один або декілька полінуклеотидів, що кодують активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу (фрагмент), наприклад, описану вище, виділяють і вбудовують в один або декілька векторів для додаткового клонування і/або експресії в клітині-хазяїні. Зазначений полінуклеотид можна легко виділяти і секвенувати за допомогою загальноприйнятих процедур. Одним з варіантів здійснення винаходу є вектор, переважно експресійний вектор, який містить один або декілька полінуклеотидів, які запропоновані у винаході. Методи, добре відомі спеціалістам в даній галузі техніки, можна застосовувати для конструювання експресійних векторів, що містять кодувальну послідовність активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули (фрагмента) наряду з прийнятними сигналами, які контролюють транскрипцію/трансляцію. Ці методи містять технології рекомбінантної ДНК *in vitro*, методи синтезу і рекомбінації/генетичної рекомбінації *in vivo* (див., наприклад, методи, описані у Maniatis та інш., Maniatis та інш., Molecular Cloning A Laboratory Manual, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; і Ausubel та інш., Current Protocols in Molecular Biology, вид-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989). Експресійний вектор може представляти собою частину плазміди, вірусу або може представляти собою фрагмент нуклеїнової кислоти. Експресійний вектор охоплює касету експресії, в якій полінуклеотид, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу (фрагмент) (тобто кодувальну область), клонують із забезпеченням функціонального зв'язку з промотором і/або іншими елементами, що контролюють транскрипцію або трансляцію. В контексті даного опису "кодувальна ділянка" являє собою частину нуклеїнової кислоти, яка складається з кодонів, що трансклюються в амінокислоти. Хоча "стоп-кодон" (TAG, TGA або TAA) не трансклюється в амінокислоту, він, у випадку його наявності, може розглядатися як частина кодувальної ділянки, однак будь-які фланкувальні послідовності, наприклад, промотори, сайти зв'язування рибосом, термінатори

транскрипції, інтрони, 5'- і 3'-нетрансльовані ділянки тощо, не є частиною кодувальної ділянки. Дві або більша кількість кодувальних ділянок можуть бути присутніми в індивідуальній полінуклеотидній конструкції, наприклад, індивідуальному векторі, або в окремих полінуклеотидних конструкціях, наприклад, окремих (різних) векторах. крім того, будь-який вектор може містити одну кодувальну ділянку або може містити дві або більшу кількість кодувальних ділянок, наприклад, вектор, що пропонується в даному винаході, може кодувати один або декілька поліпептидів, які пост- або котрансляційно розділюються на кінцеві білки за допомогою протеолітичного розщеплення. Крім того, вектор, полінуклеотид або нуклеїнова кислота, що пропонується/запропонована у винаході, може кодувати гетерологічні кодувальні ділянки, або злиті, або не злиті з полінуклеотидом, який кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу (фрагмент), запропоновану у винаході, або її варіант або похідне. Гетерологічні кодувальні ділянки містять (але, не обмежуючись тільки ними) спеціалізовані елементи або мотиви, такі як секреторний сигнальний пептид або гетерологічний функціональний домен. Функціональний зв'язок має місце, коли кодувальна ділянка генного продукту, наприклад поліпептиду, асоційована з однією або декількома регуляторними послідовностями таким чином, щоб експресія генного продукту знаходилась під впливом або контролем регуляторної(их) послідовності(ей). Два ДНК-фрагменти (таких як кодувальна ділянка поліпептиду й асоційований з нею промотор) є "функціонально зв'язаними", якщо індукція промоторної функції приводить до транскрипції мРНК, що кодує потрібний генний продукт, і якщо природа зв'язки між двома ДНК-фрагментами не має впливу на здатність регулювальних експресію послідовностей спрямовувати експресію генного продукту, або не має впливу на здатність ДНК-матриці до транскрипції. Таким чином, промоторна ділянка повинна бути функціонально зв'язана з нуклеїновою кислотою, яка кодує поліпептид, якщо промотор має здатність здійснювати транскрипцію нуклеїнової кислоти. Промотор може представляти собою специфічний для клітини промотор, який забезпечує значну транскрипцію ДНК тільки в попередньо відібраних клітинах. Інші контролювальні транскрипцію елементи, окрім промотору, наприклад, енхансери, оператори, репресори і сигнали термінації транскрипції, можна функціонально зв'язувати з полінуклеотидом для забезпечення специфічної для клітини транскрипції. Прийнятні промотори і інші контролювальні транскрипцію ділянки представлені в даному описі. Спеціалістам в даній галузі техніки відомо широка різноманітність контролювальних транскрипцію ділянок. Вони містять (але, не обмежуючись тільки ними) контролювальні транскрипцію ділянки, які функціонують в клітинах хребетних тварин, такі як (але, не обмежуючись тільки ними) сегменти промоторів і енхансерів з цитомегаловірусів (наприклад, негайно-ранній промотор у поєднанні з інтроном-А), мавпячого вірусу 40 (наприклад, ранній промотор) і ретровірусів (таких як вірус саркоми Рауса). Інші контролювальні транскрипцію ділянки містять ділянки, виведенні з генів хребетних тварин, таких як ген актину, білка теплового шоку, бичачого гормону роста і кролячого  $\beta$ -глобіну, а також інші послідовності, які можуть контролювати експресію генів в еукаріотичних клітинах. Додаткові прийнятні контролювальні транскрипцію ділянки містять тканиноспецифічні промотори і енхансери, а також індукцйбельні промотори (наприклад, промотори, що індукуються тетрациклінами). Аналогічно до цього, звичайним спеціалістам в даній галузі техніки відомо широка різноманітність контролювальних трансляцію елементів. Вони містять (але, не обмежуючись тільки ними) сайти зв'язування рибосом, кодони ініціації трансляції і термінувальні кодони і елементи, виведенні з вірусних систем (зокрема внутрішній сайт зв'язування (посадки) рибосом або IRES, який позначають також як CITE-послідовність). Касета експресії може містити також інші характерні структури, такі як сайт ініціації реплікації і/або інтегровані в хромосому елементи, такі як довгі кінцеві повтори (LTR) ретровірусів, або інвертовані кінцеві повтори (ITR) аденоасоційованого вірусу (AAV).

Кодувальні ділянки полінуклеотиду і нуклеїнової кислоти, запропоновані в даному винаході, можуть бути асоційовані з додатковими кодувальними областями, які кодують секреторні або сигнальні пептиди, які спрямовують секрецію поліпептиду, який кодується полінуклеотидом, що пропонується в даному винаході. Наприклад, якщо потрібною є секреція активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, то ДНК, що кодує сигнальну послідовність, можна поміщати проти ходу транскрипції відносно нуклеїнової кислоти, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході, або її фрагмент. Згідно з гіпотезою, що стосується сигналів, білки, які секретуються клітинами ссавців, мають сигнальний пептид або секреторну лідерну послідовність, який/яка відщеплюється від зрілого білка після ініціації експорту зростаючого білкового ланцюга через шершавий ендоплазматичний ретикулум. Звичайним спеціалістам в даній галузі техніки повинно бути очевидно, що поліпептиди, секретируються клітинами хребетних тварин, як

правило, мають сигнальний пептид, злитий з N-кінцем поліпептиду, який відщеплюється від трансльованого поліпептиду з утворенням секретувальної або "зрілої" форми поліпептиду. В деяких варіантах здійснення винаходу застосовують нативний сигнальний пептид, наприклад, сигнальний пептид важкого ланцюга або легкого ланцюга імуноглобуліну або функціональне похідне зазначеної послідовності, яке зберігає здатність забезпечувати секрецію поліпептиду, функціонально зв'язаного з ним. Альтернативно до цього, можна застосовувати гетерологічний сигнальний пептид ссавців або його функціональне похідне. Наприклад, лідерну послідовність дикого типу можна замінити на лідерну послідовність людського тканинного активатора плазміногену (ТРА) або мишачої  $\beta$ -глюкуронідази. Приклади амінокислотних і полінуклеотидних послідовностей секреторних сигнальних пептидів представлені в SEQ ID NO: 108-116.

ДНК, що кодує коротку білкову послідовність, яку можна застосовувати для полегшення подальшого очищення (наприклад, гістидинову мітку), або призначену для мічення активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, можна включати всередину або на кінці полінуклеотиду, що кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу (фрагмент).

Додатковим варіантом здійснення винаходу є клітина-хазяїн, яка містить один або декілька полінуклеотидів, які запропоновані у винаході. Деякими варіантами здійснення винаходу є клітина-хазяїн, яка містить один або декілька векторів, які запропоновані у винаході. Полінуклеотиди і вектори можуть мати будь-які особливості, індивідуально або у поєднанні, зазначені в даному описі відносно полінуклеотидів і векторів відповідно. В одному з таких варіантів здійснення винаходу клітина-хазяїн містить (наприклад, трансформовану або трансфектовану) вектором, що містить полінуклеотид, який кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході (або її частину). В контексті даного опису поняття "клітина-хазяїн" відноситься до будь-якого типу клітинної системи, яку можна конструювати для одержання активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які запропоновані у винаході, або їх фрагментів. Клітини-хазяї, придатні для реплікації і для підтримання експресії активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, добре відомі в даній галузі техніки. Такі клітини можна трансфектувати або трансдукувати відповідним чином конкретним експресійним вектором і можна вирощувати більшу кількість клітин, що містять вектор з метою внесення в ферментери для великомасштабних процесів одержання активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули в достатніх для клінічних застосувань кількостях. Прийнятними клітинами-хазяями є прокаріотичні мікроорганізми, такі як *E. coli*, або різні еукаріотичні клітини, такі як клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини комах або т.п. Наприклад, поліпептиди можна одержувати в бактеріях, зокрема, коли відсутня потреба в глікозилюванні. Після експресії поліпептид можна виділяти з пасти бактеріальних клітин в розчинну фракцію і можна додатково очищувати. Окрім прокаріот, як хазяї для клонування або експресії векторів, які кодують поліпептид, можна застосовувати еукаріотичні мікроорганізми, такі як нитчасті гриби або дріжджі, включаючи штами грибів і дріжджів, шляхи глікозилювання яких були "гуманізовані", що дозволяє одержувати поліпептид з частково або повністю людською схемою глікозилювання (див. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 і Li та інш., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215). Клітини-хазяї, які можна застосовувати для експресії (глікозилюваних) поліпептидів, одержують також з багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних тварин). Прикладами клітин безхребетних є клітини комах, а також можна застосовувати клітини рослин. Були виявлені багаточисленні бакуловірусні штами й відповідні придатні для них як хазяї клітини комах, насамперед для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*. Як хазяїв можна застосовувати також культури рослинних клітин (див., наприклад, US №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (опис технології PLANTIBODIES™ для одержання антитіл в трансгенних рослинах). Як хазяї можна застосовувати також клітини хребетних тварин. Наприклад, можна застосовувати клітинні лінії ссавців, які адаптовані до росту в суспензії. Іншими прикладами прийнятних ліній клітин-хазяїв є лінія клітин нирки мавп CV1, трансформована за допомогою SV40 (COS-7); лінія клітин нирки ембріона людини (293 або клітини лінії 293, субклоновані з метою вирощування в суспензійній культурі, Graham та інш., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, з. 59); клітини нирки дитинча хом'яка (BHK); клітини Сертолі миші (TM4-клітини, описані, наприклад, у Mather, *Biol. Reprod.*, 23, 1980, сс. 243-251); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мартини (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирки собаки (MDCK); клітини печінки бичачого щура (BRL 3A); клітини легкого людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, описані, наприклад, у Mather та інш., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383, 1982, сс. 44-68); клітини MRC 5 і клітини FS4. Іншими цінними лініями клітин-хазяїв



ссавців є клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), включаючи dhfr<sup>-</sup>-CHO-клітини (Urlaub та інш., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, з. 4216); і клітинні лінії мієломи, такі як Y0, NS0 і Sp2/0. Огляд конкретних ліній клітин-хазяїв ссавців, які можна застосовувати для виробництва білка, див., наприклад, у Yazaki і Wu, в: *Methods in Molecular Biology* під ред. B.K.C. Lo, вид-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268. Клітини-хазяї містять культивовані клітини, наприклад, культивовані клітини ссавців, клітини дріжджів, клітини комах, клітини бактерій і клітини рослин (але не обмежуючись тільки ними), а також клітини, що знаходяться в організмі трансгенної тварини, трансгенної рослини або вирощуваної рослинної або тваринної тканини. В одному з варіантів здійснення винаходу клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину, переважно клітину ссавця, таку як клітина яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітина нирки людського ембріона (HEK) або лимфоїдна клітина (наприклад, клітина Y0, NS0, Sp20).

В даній галузі відомі стандартні технології для експресії чужорідних генів в цих системах. Клітини, що експресують поліпептид, який містить або важкий, або легкий ланцюг антигензв'язувального домену, такого як антитіло, можна конструювати таким чином, щоб в них відбувалась експресія інших ланцюгів антитіла, наприклад, таким чином, щоб експресований продукт являв собою антитіло, яке має як важкий, так і легкий ланцюг.

Одним з варіантів здійснення винаходу є спосіб одержання активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, який полягає у тому, що культивують клітину-хазяїна, яка містить полінуклеотид, який кодує активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, представлену в даному описі, в умовах, придатних для експресії активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, і необов'язково виділяють активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу з клітини-хазяїна (або культурального середовища клітини-хазяїна).

Компоненти активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули генетично зливають один з іншим. Активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу можна створювати так, щоб її компоненти зливати один з іншим безпосередньо або непрямо через лінкерну послідовність. Склад і довжину лінкера можна визначати за допомогою методів, добре відомих в даній галузі, і можна оцінювати ефективність. Приклади лінкерних послідовностей, розташованих між різними компонентами активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, представлені в наведених в даному описі послідовностях. Можна містити також додаткові послідовності для вбудовування сайту розщеплення, якщо потрібно розділення індивідуальних компонентів злиття, наприклад, послідовність, розпізнавану ендопептидазою.

В деяких варіантах здійснення винаходу один або декілька антигензв'язувальних фрагментів активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул містить(ять) щонайменше одну варіабельну ділянку антитіла, яка має здатність зв'язуватися з антигенною детермінантою. Варіабельні ділянки можуть утворювати частину антитіл, які зустрічаються в природних умовах або не зустрічаються в природних умовах або їх фрагментів або можуть бути виведені з них. Методи одержання поліклональних антитіл і моноклональних антитіл добре відомі в даній галузі техніки (див., наприклад, Harlow і Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Антитіла, які не зустрічаються в природних умовах можна створювати за допомогою твердофазного пептидного синтезу, можна одержувати за допомогою методів рекомбінації (наприклад, описаних в US № 4186567) або можна одержувати, наприклад, шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек, що містять варіабельні ділянки важких ланцюгів і варіабельні ділянки легких ланцюгів (див., наприклад, US № 5969108 на ім'я McCafferty).

Будь-які види антитіл, фрагментів антитіл, антигензв'язувальних доменів або варіабельних ділянок тваринного походження можна застосовувати в активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекулах, які запропоновані у винаході. Прикладами антитіл, фрагментів антитіл, антигензв'язувальних доменів або варіабельних ділянок, які можна застосовувати згідно з даним винаходом, є (але, не обмежуючись тільки ними) конструкції, одержані з організму мишей, приматів або людини. Якщо активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула призначена для застосування на людині, то можна застосовувати химерну форму антитіла, в якій константні ділянки антитіла одержують з людського антитіла. Гуманізовану або повністю людську форму антитіла можна одержувати також за допомогою методів, добре відомих в даній галузі (див., наприклад, US № 5565332 на ім'я Winter). Для здійснення гуманізації можна застосовувати різні методи, такі як (але, не обмежуючись тільки ними) (а) трансплантація нелюдських (наприклад, з антитіла-донора) CDR в людський (наприклад, антитіло-реципієнт) каркасна ділянка і константні ділянки, що зберігають або що не зберігають, які мають вирішальне значення залишки каркасної ділянки

(наприклад, залишки, важливі для зберігання гарної антигензв'язувальної афінності або функцій антитіла), (б) трансплантація тільки нелюдських визначальних специфічність ділянок (SDR або a-CDR; залишки мають вирішальне значення для взаємодії антитіло-антиген) в людські каркасні і константні ділянки, або (в) трансплантація повних нелюдських варіабельних доменів, але їх "маскування" нагадуваним людський сегментом шляхом заміни поверхневих залишків. Огляд гуманізованих антитіл і методів їх одержання див., наприклад, у Almagro і Fransson, *Front Biosci* 13, 12008, сс. 1619-1633, і вони описані також, наприклад, у Riechmann та інш., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen та інш., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; US №№ 5821337, 7527791, 6982321 і 7087409; Jones та інш., *Nature* 321, 1986, сс. 522-525; Morrison та інш., *Proc Natl Acad Sci* 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison і Oi, *Adv Immunol* 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeyen та інш., *Science* 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, *Molec Immun* 31(3), 1994, сс. 169-217; Kashmiri та інш., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34) (опис трансплантації SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 1991, сс. 489-498 (опис "повторного покриття"); Dall'Acqua та інш., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (опис "перестановки FR") і Osbourn та інш., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68, і Klimka та інш., *Br J Cancer* 83, 2000, сс. 252-260 (опис підходу на основі "цілеспрямованої селекції" для перестановки FR). Людські антитіла і людські варіабельні ділянки можна одержувати за допомогою різних методик, відомих в даній ділянці. Людські антитіла описані в цілому, у van Dijk і van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 2001, сс. 368-374 і Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 2008, сс. 450-459. Людські варіабельні ділянки можуть утворювати частину людських моноклональних антитіл або можуть бути одержані з них за допомогою методу гібридом (див., наприклад, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, вид-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63). Людські антитіла і людські варіабельні ділянки можна одержувати також шляхом введення імуногена трансгенній тварині, яка модифікована таким чином, що може продукувати інтактні людські антитіла або інтактні антитіла з людськими варіабельними областями у відповідь на контрольне зараження антигеном (див., наприклад, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 2005, сс. 1117-1125). Людські антитіла і людські варіабельні ділянки можна створювати також шляхом виділення послідовностей варіабельних ділянок Fv-клону, відібраних з людських фагових дисплейних бібліотек (див., наприклад, Hoogenboom та інш. в: *Methods in Molecular Biology*, під ред. O'Brien та інш., вид-во Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37); і McCafferty та інш., *Nature* 348, 552-554; Clackson та інш., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628). Фаг, як правило, експонує фрагменти антитіл або у вигляді одноланцюгових Fv- (scFv)-фрагментів, або у вигляді Fab-фрагментів.

В деяких варіантах здійснення винаходу антигензв'язувальні фрагменти, придатні для застосування згідно з даним винаходом, створюють так, щоб вони мали підвищену афінність зв'язування, наприклад, за допомогою методів, описаних в публікації заявки на патент США № 2004/0132066, повний зміст якої включений в даний опис як посилання. Здатність активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, зв'язуватися зі специфічною антигенною детермінантою можна оцінювати кількісно або за допомогою твердофазного ферментного аналізу (ELISA), або іншими методиками, відомими спеціалісту в даній галузі техніки, наприклад, за допомогою метода резонансу поверхневого плазмону (проводячи аналіз із застосуванням системи BIACORE T100) (Liljeblad та інш., *Glyco J* 17, 2000, сс. 323-329), і традиційних аналізів зв'язування (Heeley, *Endocr Res* 28, 2002, сс. 217-229). Аналізи в умовах конкуренції можна застосовувати для ідентифікації антитіла, фрагмента антитіла, антигензв'язувального домену або варіабельного домену, що конкурує з референс-антитілом за зв'язування з конкретним антигеном, наприклад, антитіла, яке конкурує з антитілом V9 за зв'язування з CD3. В деяких варіантах здійснення винаходу зазначене конкурувальне антитіло зв'язується з тим же епітопом (наприклад, лінійним або конформаційним епітопом), з яким зв'язується референс-антитіло. Докладні наведені як приклади методи картування епітопу, з яким зв'язується антитіло, представлені у Morris, "Epitope Mapping Protocols", в: *Methods in Molecular Biology*, вид-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996. При здійсненні наведеного як прикладу аналізу в умовах конкуренції іммобілізований антиген (наприклад, CD3) інкубують в розчині, що містить перше мічене антитіло, яке зв'язується з антигеном (наприклад, антитіло V9), і вторим неміченим антитілом, яке підлягає тестуванню у відношенні його здатності конкурувати з першим антитілом за зв'язування з антигеном. Друге антитіло може бути присутнім в супернатанті гібридами. Як контроль іммобілізований антиген інкубують в розчині, що містить перше мічене антитіло, але яке не містить друге немічене антитіло. Після інкубації в умовах, які забезпечують зв'язування першого антитіла з антигеном, надлишок незв'язаного антитіла видаляють і оцінюють кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим антигеном. Якщо кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим антигеном, суттєво знижено в тестувальному зразку у порівнянні з контрольним зразком, то це свідчить про те, що друге антитіло конкурує з

першим антитілом за зв'язування з антигеном (див. Harlow і Lane. Antibodies: A Laboratory Manual, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, гл. 14, 1988).

Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, одержані за допомогою представлених в даному описі методів, можна очищувати з застосуванням відомих в даній ділянці методик, таких як рідинна хроматографія високого розділення, іонообмінна хроматографія, гель-електрофорез, афінна хроматографія, гель-фільтрація й т. п. Фактичні умови, застосовні для очищення конкретного білка, залежать, зокрема, від таких факторів, як чистий заряд, гідрофобність, гідрофільність тощо, і вони повинні бути очевидними спеціалісту в даній галузі техніки. Для очищення антитіла за допомогою афінної хроматографії можна застосовувати ліганд, рецептор або антиген, з яким зв'язується активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула. Наприклад, для очищення за допомогою афінної хроматографії активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які запропоновані у винаході, можна застосовувати матрикс з білком А або білком G. Наприклад, послідовне застосування афінної хроматографії на білку А або G і гель-фільтрації можна застосовувати для виділення активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули практично згідно з методом, описаному в розділі "Приклади". Чистоту активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули можна визначати за допомогою будь-якого з широкої різноманітності добре відомих аналітичних методів, включаючи гель-електрофорез, рідинну хроматографію високого тиску тощо. Наприклад, установлено, що злиті білки, які містять важкі ланцюги, які експресували згідно з описаними в розділі "Приклади" методами, є інтактними і правильно зібраними, що продемонстровано за допомогою ДСН-ПААГ у відновлювальних умовах (див., наприклад, фіг. 4). Розділяли три полоси, відповідні приблизно Mr 25000, Mr 50000 і Mr 75000, які відповідали передбаченим молекулярним масам легкого ланцюга, важкого ланцюга і злитому білку важкий ланцюг/легкий ланцюг активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули.

#### Аналізи

Активувальні Т-клітини біспецифічні антигензв'язувальні молекули, представлені в даному описі, можна ідентифікувати, піддавати скринінгу або характеризувати їх фізичні/хімічні властивості і/або види біологічної активності за допомогою різних аналізів, відомих в даній ділянці

#### Аналізи афінності

Афінність активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули до Fc-рецептору або антигену-мішені можна визначати за допомогою методів, викладених в розділі "Приклади", за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR), застосовуючи стандартну інструментальну базу, наприклад, пристрій BIAcore (фірма GE Healthcare), і рецептори або білки-мішені, які можна одержувати за допомогою рекомбінантної експресії. Альтернативно до цього, зв'язування активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул з різними рецепторами або антигенами-мішенями можна оцінювати з застосуванням клітинних ліній, які експресують конкретний рецептор або антиген-мішень, наприклад, за допомогою проточної цитометрії (FACS). Конкретний ілюстративний і наведений як приклад варіант вимірювання афінності зв'язування описаний нижче в розділі "Приклади".

Згідно з одному з варіантів здійснення винаходу величину  $K_D$  вимірювали методом поверхневого плазмонного резонансу за допомогою пристрою BIACORE® T100 (фірма GE Healthcare) при 25 °C.

Для аналізу взаємодії між Fc-ділянкою і Fc-рецепторами мічений за допомогою His рекомбінантний Fc-рецептор "захоплювали" за допомогою антитіла до Penta-His (фірма Qiagen), іммобілізованого на CM5-чипах, і біспецифічні конструкції застосовували як аналізовані субстанції. В цілому, метод полягав у наступному: біосенсорні чипи з карбоксиметильованого декстрану (CM5, фірма GE Healthcare) активували за допомогою гідрохлориду N-етил-N'-(3-диметиламінопропил)карбодіміду (EDC) і N-гідроксисукциніміду (NHS) згідно з інструкціями постачальника. Антитіло до Penta-His розводили 10 мМ ацетатом натрію, pH 5,0 до концентрації 40 мкг/мл перед ін'єкцією зі швидкістю потоку 5 мкл/хв для досягнення приблизно 6500 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після ін'єкції ліганду ін'єкували 1 М етаноламін для блокади непрореагованих груп. Потім здійснювали "захоплення" Fc-рецептора протягом 60 с в концентрації 4 або 10 нМ. Для кінетичних вимірювань ін'єкували чотириразові серійні розведення біспецифічної конструкції (діапазон від 500 до 4000 нМ) в буфері HBS-EP+ (фірма GE Healthcare, 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЕДТК, 0,05 % сурфактанту P20, pH 7,4) при 25 °C зі швидкістю потоку 30 мкл/хв протягом 120 с.

Для визначення афінності до антигену-мішені біспецифічні конструкції "захоплювали" за допомогою специфічного у відношенні людського Fab антитіла (фірма GE Healthcare), яке іммобілізували на поверхні активованого сенсорного CM5-чипу згідно з методом, описаним для антитіла до Penta-His. Кінцева кількість зшитого білка складала приблизно 12000 RU.

Здійснювали "захоплення" біспецифічних конструкцій протягом 90 з в концентрації 300 nM. Антигени-мішені пропускали через проточні комірки протягом 180 з в діапазоні концентрацій від 250 до 1000 nM зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Моніторинг дисоціації здійснювали протягом 180 з.

Різницю всіх показників заломлення коректували шляхом віднімання відповіді, одержаної в проточній референс-комірці. Відповідь на стаціонарній стадії застосовували для визначення константи дисоціації ( $K_D$ ) за допомогою апроксимації нелінійної кривої ізотерми зв'язування Ленгмюра. Швидкість реакції асоціації ( $k_{on}$ ) і реакції дисоціації ( $k_{off}$ ) розраховували із застосуванням простої моделі зв'язування Ленгмюра 1:1 (програма BIACORE® T100 Evaluation Software, версія 1.1.1) шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації і дисоціації. Константу рівноваги реакції дисоціації ( $K_D$ ) розраховували як співвідношення  $k_{off}/k_{on}$  (див., наприклад, Chen та інш., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881).

#### Аналізи активності

Біологічну активність активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які запропоновані у винаході, можна визначати за допомогою різних аналізів, описаних в розділі "Приклади". Види біологічної активності можуть містити, наприклад, індукцію проліферації Т-клітин, індукцію передачі сигналу в Т-клітинах, індукцію експресії маркерів активації в Т-клітинах, індукцію секреції цитокінів Т-клітинами, індукцію лізису клітин-мішеней, таких як пухлинні клітини, й індукцію регресу пухлини і/або підвищення виживаності.

#### Композиції, препаративні форми і шляхи введення

Наступним об'єктом винаходу є фармацевтичні композиції, які містять будь-яку з активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, представлених в даному описі, наприклад, призначені для застосування у будь-якому із зазначених нижче терапевтичних способів. В одному з варіантів здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-яку з активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, представлених в даному описі, й фармацевтично прийнятний носій. В іншому варіанті здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-яку з активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, представлених в даному описі, і щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, зазначений нижче.

Крім того, представлений спосіб одержання активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, в формі, придатної для введення *in vivo*, який полягає у тому, що (а) одержують активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході, і (б) поєднують в препаративній формі активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу щонайменше з одним фармацевтично прийнятним носієм, де приготовлений препарат активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули придатний для застосування *in vivo*.

Фармацевтичні композиції, запропоновані в даному винаході, містять в терапевтично ефективній кількості одну або декілька активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, яка(і) розчинена(і) або диспергирована(і) у фармацевтично прийнятному носії. Поняття "фармацевтично або фармакологічно прийнятний" відноситься до молекулярних субстанцій та композицій, які, в цілому, є нетоксичними для реципієнтів у застосовних дозах і концентраціях, тобто не викликають шкідливі, алергічні або інші небажані реакції при введенні при необхідності тварині, такій, наприклад, як людина. Готування фармацевтичної композиції, яка містить щонайменше одну активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу і необов'язково додаткову діючу речовину, повинно бути очевидно спеціалістам в даній галузі техніки в світлі даного опису, наприклад, з довідника Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е вид., вид-во Mack Printing Company, 1990, включеного в даний опис як посилання. Крім того, очевидно, що препарати, призначені для введення тварині (наприклад, людині), повинні задовольняти вимоги стандартів стерильності, пірогенності й загальної безпеки й чистоти, розроблених відділом біологічних стандартів FDA (Управління з контролю за харчовими продуктами й лікарськими засобами) або відповідним уповноваженим органом інших країн. Переважними композиціями є ліофілізовані препаративні форми або водні розчини. В контексті даного опису "фармацевтично прийнятний носій" охоплює будь-які й всі розчинники, буфери, дисперсійні середовища, покриття, поверхнево-активні речовини, антиоксиданти, консерванти (наприклад, антибактеріальні агенти, протигрибкові агенти), агенти для надання ізотонічності, агенти, що уповільнюють абсорбцію, солі, білки, лікарські засоби,

стабілізатори лікарських засобів, полімери, гелі, зв'язувальні речовини, ексципієнти, розпушувачі, замащувачі, підсолоджувальні речовини, коригенти, барвники і подібні матеріали і їх комбінації, які повинні бути відомими звичайному спеціалісту в даній галузі техніки (див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е вид., вид-во Mack Printing Company, 1990, сс. 1289-1329, включений в даний опис як посилання). В терапевтичних або фармацевтичних композиціях можна застосовувати будь-який загальноприйнятний носій, якщо тільки він є сумісним з діючою речовиною.

Композиція може містити різні типи носіїв залежно від того, чи вводять її в твердій, рідкій або аерозольній формі, і від того, чи повинна вона бути стерильною, як в випадку використання таких шляхів введення, як ін'єкція. Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані в даному винаході (і будь-який додатковий терапевтичний засіб), можна вводити внутрішньовенно, внутрішньошкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньочеревно, всередину ушкодження, всередину черепа, всередину суглоба, всередину передміхурової залози, всередину селезінки, внутрішньоренально, внутрішньоплеврально, внутрішньотрахеально, внутрішньоназально, всередину склоподібного тіла, внутрішньовагінально, внутрішньоректально, всередину пухлини, внутрішньом'язово, внутрішньочеревно, підшкірно, підкон'юнктивально, інтравезикулярно, в слизову оболонку, інтраперикардіально, всередину пуповини, інтраокулярно, перорально, топікально, місцево, шляхом інгаляції (наприклад, аерозольної інгаляції), ін'єкції, інфузії, безперервної інфузії, локалізованої перфузії, що омиває безпосередньо клітини-мішені, через катетер, за допомогою лаважу, у вигляді кремів, в ліпідних композиціях (наприклад, ліпосомах), або за допомогою будь-якого іншого методу або будь-якої комбінації вищезазначених шляхів, відомих звичайному спеціалісту в даній галузі техніки (див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е вид., вид-во Mack Printing Company, 1990, включений в даний опис як посилання). Для введення молекул поліпептидів, таких як біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, найбільш часто застосовують парентеральне введення, зокрема, внутрішньовенну ін'єкцію.

Парентеральні композиції містять композиції, створені для введення шляхом ін'єкції, наприклад, підшкірної, внутрішньошкірної, всередину ушкодження, внутрішньовенної, внутрішньоартеріальної, внутрішньом'язової, підоболонкової або внутрішньочеревної ін'єкції. Для ін'єкції біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, можна вводити в препаративні форми у вигляді водних розчинів, переважно в фізіологічно сумісних буферах, таких як розчин Хенкса, розчин Рінгера або фізіологічний соляний буфер. Розчин може містити призначені для одержання препаративної форми агенти, такі як суспендувальні, стабілізувальні і/або диспергувальні агенти. Альтернативно до цього, біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини можуть знаходитися в порошкоподібній формі, призначеній для відновлення перед застосуванням прийнятним наповнювачем, наприклад, стерильною водою, не що містить пірогенів. Стерильні розчини для ін'єкцій готують шляхом введення активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які запропоновані у винаході, в необхідній кількості у відповідний розчинник при необхідності в поєднанні з різними іншими інгредієнтами, наведеними нижче. Стерильність можна легко забезпечити, наприклад, шляхом фільтрації через стерильні фільтрувальні мембрани. Як правило, дисперсії одержують шляхом введення різних стерилізованих діючих речовин в стерильний наповнювач, який містить основне дисперсійне середовище і/або інші інгредієнти. У випадку стерильних порошків для одержання стерильних розчинів для ін'єкцій, суспензій або емульсій переважними методами одержання є вакуумне сушіння або сушіння виморожуванням, які дозволяють одержувати порошок діючої речовини в поєднанні з будь-яким додатковим необхідним інгредієнтом з попередньо стерилізованою фільтрацією рідкого середовища. При необхідності рідке середовище перед здійсненням ін'єкції повинна бути відповідним чином забуференою і рідкому розріджувачу спочатку надають ізотонічність за допомогою достатньої кількості соляного розчину або глюкози. Композиція повинні бути стабільною в умовах приготування і зберігання і захищена від забруднювальної дії мікроорганізмів, таких як бактерії та гриби. Прийнято підтримувати забруднені ендотоксинами на мінімальному безпечному рівні, наприклад, менше 0,5 нг/мг білка. Придатні фармацевтично прийнятні носії містять (але, не обмежуючись тільки ними): буфери, такі як фосфатний, цитратний і буфери на основі інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензіламонійхлорид; гексаметонійхлорид; бензалконійхлорид; бензетонійхлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол, резорцінол; циклогексанол; 3-пентанол і мета-крезол); низькомолекулярні (які містять менше приблизно 10 залишків)

поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди й інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатувальні агенти, такі як ЕДТК; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворювальні протиіони, такі як натрій; комплекси з металами (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ). Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити сполуки, які підвищують в'язкість суспензії, такі як натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, сорбіт, декстран або т.п. Необов'язково суспензія може містити також стабілізатори або агенти, які підвищують розчинність сполук, дозволяє одержувати висококонцентровані розчини. Крім того, суспензії діючих речовин можна одержувати у вигляді відповідних олійних призначених для ін'єкції суспензій. Прийнятні ліпофільні розчинники або наповнювачі містять жирні нелеткі олії, такі як кунжутна олія, або синтетичні ефіри жирних кислот, такі як етилолеати або тригліцериди, або ліпосоми.

Діючі речовини можна заклають в мікрокапсули, наприклад, одержані за допомогою методів коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад в гідроксипропілметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули і полі(метилметакрилатні) мікрокапсули відповідно, в колоїдні системи введення лікарського засобу (наприклад, в ліпосоми, альбуминові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи описані в Remington's Pharmaceutical Sciences, під ред. A. Osol, 1980. Можна готувати препарати з уповільненим вивільненням. Прийнятними прикладами препаратів з уповільненим вивільненням є напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять поліпептид, такі матриці представляють собою вироби певної форми, наприклад, плівки або мікрокапсули. В конкретному варіанті здійснення винаходу для досягнення пролонгованої абсорбції композиції для ін'єкцій можна застосовувати в композиції агенти, що уповільнюють абсорбцію, такі, наприклад, як моностеарат алюмінію, желатин або їх комбінації.

Окрім описаних вище композицій, біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини можна готувати також у вигляді препарату в формі депо. Зазначені препаративні форми тривалої дії можна застосовувати шляхом імплантації (наприклад, підшкірної або внутрішньом'язової) або внутрішньом'язової ін'єкції. Так, наприклад, біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини можна містити в препаративні форми в поєднанні з прийнятними полімерними або гідрофобними матеріалами (наприклад, у вигляді емульсії в прийнятній олії) або іонообмінними смолами, або у вигляді помірно розчинних похідних, наприклад, помірно розчинної солі.

Фармацевтичні композиції, які містять біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, можна готувати за допомогою стандартних процесів змішування, розчинення, емульгування, капсулювання, захоплення або ліофілізації. Фармацевтичні композиції можна містити в препаративні форми за допомогою стандартного методу із застосуванням одного або декількох фізіологічно прийнятних носіїв, розріджувачів, ексципієнтів або допоміжних речовин, які полегшують обробку білків, з одержанням препаратів, які можна застосовувати в фармацевтичних цілях. Відповідна форма залежить від вибраного шляху введення.

Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини можна містити в композиції у вигляді вільної кислоти або вільної основи, в нейтральній формі або в формі солі. Фармацевтично прийнятні солі представляють собою солі, які практично зберігають біологічну активність вільної кислоти або вільної основи. Вони містять кислотно-адитивні солі, наприклад, солі, утворені з вільними аміногрупами білкової композиції, або утворені з неорганічними кислотами, такими, наприклад, як соляна або фосфорна кислота, або такими органічними кислотами, як оцтова, щавлева, винна або мигдальна кислота. Солі, утворені з вільною карбоксильною групою, можна одержувати також з неорганічних основаних, таких, наприклад, як гідроксиди натрію, калію, амонію, кальцію або заліза; або таких органічних основаних як ізопропіламін, триметиламін, гістидин або прокаїн. Фармацевтичні солі мають тенденцію до більш високої розчинності у водних і інших протонних розчинниках у порівнянні з відповідними формами у вигляді вільних основ.

Способи і композиції для терапевтичного застосування

Будь-яку з активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, представлених в даному описі, можна застосовувати в терапевтичних методах. Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, можна застосовувати як імунотерапевтичні агенти, наприклад, при лікуванні різних видів раку.

Для застосування в терапевтичних методах біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, можна містити в состав препаративних форм,

дозувати і вводити згідно з належною клінічною практикою. Фактори, які розглядають в цьому контексті, містять конкретне порушення, яке підлягає лікуванню, конкретного ссавця, яке підлягає лікуванню, клінічний стан індивідуального пацієнта, причину захворювання, область введення агента, метод введення, схему введення і інші фактори, відомі медикам, що практикують.

Одним з об'єктів винаходу є біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, призначені для застосування як лікарського засобу. Наступними об'єктами винаходу є біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, призначені для застосування при лікуванні захворювання. Неякими варіантами здійснення винаходу є біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, запропоновані у винаході, призначені для застосування в способі лікування. Одним з варіантів здійснення винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, представлена в даному описі, призначена для застосування при лікуванні захворювання в індивідумі, який цього потребує. Неякими варіантами здійснення винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, призначена для застосування в способі лікування індивідуму, який має захворювання, який полягає в тому, що вводять індивідуму в терапевтично ефективній кількості активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу. В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою проліферативне порушення. В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак. В деяких варіантах здійснення винаходу спосіб полягає також в тому, що вводять індивідуму в терапевтично ефективній кількості щонайменше одно додатковий терапевтичний засіб, наприклад, протираковий засіб, якщо захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою рак. Додатковими варіантами здійснення винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, представлена в даному описі, призначена для застосування з метою індукції лізису клітини-мішені, зокрема пухлинної клітини. Неякими варіантами здійснення винаходу є активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, призначена для застосування в способі індукції лізису клітини-мішені, зокрема пухлинної клітини, в індивідумі, який полягає в тому, що вводять індивідуму в ефективній кількості активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу для індукції лізису клітини-мішені. "Індивідум" в контексті будь-якого з зазначених вище варіантів здійснення винаходу являє собою ссавця, переважно людини.

Наступним об'єктом винаходу є застосування активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, для вироблення або приготування лікарського засобу, який призначений для лікування захворювання в індивідумі, який цього потребує. В одному з варіантів здійснення винаходу лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування захворювання, який полягає в тому, що вводять індивідуму, який має захворювання, в терапевтично ефективній кількості лікарський засіб. В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою проліферативне порушення. В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак. В одному із зазначених варіантів здійснення винаходу спосіб полягає також в тому, що вводять індивідуму в терапевтично ефективній кількості щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, протираковий засіб, якщо захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою рак. В іншому варіанті здійснення винаходу лікарський засіб призначений для індукції лізису клітини-мішені, зокрема пухлинної клітини. В наступному варіанті здійснення винаходу лікарський засіб призначений для застосування в способі індукції лізису клітини-мішені, зокрема пухлинної клітини, в індивідумі, який полягає в тому, що вводять індивідуму в ефективній кількості лікарський засіб для індукції лізису клітини-мішені. "Індивідум" в контексті будь-якого з зазначених вище варіантів здійснення винаходу являє собою ссавця, переважно людину.

Наступним об'єктом винаходу є спосіб лікування захворювання в індивідумі. В одному з варіантів здійснення винаходу спосіб полягає в тому, що вводять індивідуму, що має зазначене захворювання, в терапевтично ефективній кількості активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначеному індивідуму вводять композицію, яка містить активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході, у фармацевтично прийнятній формі. В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою проліферативне порушення. В переважному варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак. В деяких варіантах здійснення винаходу спосіб полягає також в тому, що вводять індивідуму в терапевтично ефективній кількості

щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, протираковий засіб, якщо захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою рак. "Індивідуум" в контексті будь-якого з зазначених вище варіантів здійснення винаходу може представляти собою ссавця, переважно людини.

Наступним об'єктом винаходу є спосіб індукції лізису клітини-мішені, зокрема, пухлинної клітини. В одному з варіантів здійснення винаходу спосіб полягає в тому, що приводять у контакт клітину-мішень з активувальною Т-клітини біспецифічною антигензв'язувальною молекулою, яка пропонується у винаході, в присутності Т-клітини, зокрема, цитотоксичної Т-клітини. Іншим об'єктом винаходу є спосіб індукції лізису клітини-мішені, зокрема, пухлинної клітини. В одному із зазначених варіантів здійснення винаходу спосіб полягає в тому, що вводять індивідууму в ефективній кількості активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу для індукції лізису клітини-мішені. В одному з варіантів здійснення винаходу "індивідуум" являє собою людини.

В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою проліферативне порушення, переважно рак. Прикладами раку є (але, не обмежуючись тільки ними) рак сечового міхура, рак головного мозку, рак голови і шиї, рак підшлункової залози, рак легені, рак молочної залози, рак яєчника, рак матки, рак шийки матки, рак ендометрію, рак стравоходу, рак ободової кишки, колоректальний рак, ректальний рак, рак шлунку, рак передміхурової залози, рак крові, рак шкіри, плоскоклітинну карцинома, рак кістки й рак нирки. Інші порушення клітинної проліферації, які можна лікувати із застосуванням активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, що пропонується в даному винаході, містять (але, не обмежуючись тільки ними) неоплазми, локалізовані в: животі, кістці, молочній залозі, травній системі, печінці, підшлунковій залозі, очеревині, ендокринних залозах (надниркова, парашитоподібна, гіпофіз, яєчка, яєчник, тимус, щитоподібна), ока, голові й шиї, нервовій системі (центральної і периферійній), лімфатичній системі, тазовій області, шкірі, м'якій тканині, селезінці, грудному відділі і сечостатевої системі. Також під об'єм винаходу підпадають передракові стани або ушкодження і метастази раку. В деяких варіантах здійснення винаходу рак вибирають з групи, що містить нирковоклітинний рак, рак шкіри, рак легені, колоректальний рак, рак молочної залози, рак головного мозку, рак голови і шиї. Спеціалісту в даній галузі техніки повинно бути очевидним, що у багатьох випадках активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула не може забезпечити зцілення, а може тільки мати частковий сприятливий вплив. В деяких варіантах здійснення винаходу фізіологічні зміни, що характеризуються деякою сприятливою дією, розглядають також як терапевтично цінні. Таким чином, в деяких варіантах здійснення винаходу кількість активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка забезпечує фізіологічну зміну, розглядають як "ефективну кількість" або "терапевтично ефективну кількість". Суб'єкт, пацієнт або індивідуум, який потребує лікування, являє собою, як правило, ссавця, більше конкретно людини.

В деяких варіантах здійснення винаходу активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході, вводять в ефективній кількості в клітину. В інших варіантах здійснення винаходу активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході, вводять в терапевтично ефективній кількості індивідууму для лікування хвороби.

Для попередження або лікування захворювання відповідна доза активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході (при її застосуванні індивідуально або в поєднанні з одним або декількома іншими додатковими терапевтичними засобами), повинна залежати від типу захворювання, який підлягає лікуванню, шляхи введення, ваги тіла пацієнта, типу активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, важкості й перебігу захворювання, від того, чи вводять активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу в превентивних або терапевтичних цілях, попередніх або здійснюваних одночасно терапевтичних утручань, історії хвороби пацієнта і відповіді на активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу і приписання доктора, що лікує. Спеціаліст-практик, відповідальний за введення, у будь-якому випадку, повинний визначати концентрацію діючої(их) речовин в композиції і відповідну(и) дозу(и) для індивідуального пацієнта. Різні схеми введення доз містять (але, не обмежуючись тільки ними) однократне введення або декілька введення в різні моменти часу, болюсне введення і пульсуювальну інфузію.

Активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу можна вводити пацієнту у вигляді однієї обробки або серій обробок. Залежно від типу і важкості захворювання можлива початкова доза активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули для введення пацієнту, наприклад, з застосуванням одного або декількох індивідуальних введення



або за допомогою безперервної інфузії, може складати приблизно від 1 до 15 мг/кг (наприклад, 0,1-10 мг/кг). Типова добова доза може складати від приблизно 1 до 100 мг/кг або більше залежно від зазначених вище факторів. Для повторних введень протягом декількох днів або більш тривалого періоду залежно від стану лікування, як правило, лікування повинно тривати до досягнення потрібного пригнічення наявних симптомів захворювання. Як приклад, доза активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули може складати від приблизно 0,005 до приблизно 10 мг/кг. В іншому прикладі (але, не обмежуючись тільки зазначеним) доза на одне введення може складати від приблизно 1, приблизно 5, приблизно 10, приблизно 50, приблизно 100, приблизно 200, приблизно 350, приблизно 500 мкг/кг ваги тіла, приблизно 1, приблизно 5, приблизно 10, приблизно 50, приблизно 100, приблизно 200, приблизно 350, приблизно 500 до приблизно 1000 мг/кг ваги тіла або більше, і знаходиться у будь-якому зазначеному діапазоні. Як прикладів (але, не обмежуючись тільки ними) зазначеного діапазону значень, можна вводити від приблизно 5 до приблизно 100 мг/кг ваги тіла, від приблизно 5 мкг/кг ваги тіла до приблизно 500 мг/кг ваги тіла тощо з урахуванням зазначених вище рівнів доз. Так, пацієнту можна вводити одну або декілька доз, що складають приблизно 0,5, 2,0, 5,0 або 10 мг/кг (або будь-яку їх комбінацію). Зазначені дози можна вводити з перервами, наприклад, кожного тижня або кожні три тижні (наприклад, таким чином, щоб пацієнт отримував від приблизно двох до приблизно двадцяти або, наприклад, приблизно шість доз активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули). Можна вводити початкову більш високу ударну дозу, після якої застосовувати одну або декілька більш низьких доз. Однак можна застосовувати інші схеми введення доз. Успіх такої терапії легко оцінювати за допомогою стандартних методик і аналізів.

Що активують Т-клітини біспецифічні антигензв'язувальні молекули, запропоновані у винаході, як правило, слід застосовувати в кількості, ефективній для досягнення поставленої мети. При застосуванні для лікування або попередження хворобливого стану активувальні Т-клітини біспецифічні антигензв'язувальні молекули, запропоновані у винаході, або їх фармацевтичні композиції, вводять або застосовують в терапевтично ефективній кількості. Визначення терапевтично ефективного кількості знаходиться в компетенції спеціалістів в даній галузі, насамперед на тлі представленого докладного опису винаходу.

Для системного введення терапевтично ефективну дозу можна спочатку визначати за допомогою аналізів *in vitro*, наприклад, аналізів з застосуванням клітинних культур. Потім дозу можна містити в форму для вивчення на тваринних моделях для досягнення концентрації в кровотоку, що знаходиться в діапазоні, який охоплює значення  $IC_{50}$ , визначене на клітинній культурі. Зазначену інформацію можна застосовувати для більш точного визначення доз, які можна застосовувати на людях.

Начальні дози можна оцінювати також, виходячи з даних, одержаних *in vivo*, наприклад, на тваринних моделях, застосовуючи методики, добре відомі в даній галузі. Звичайний спеціаліст в даній ділянці легко може оптимізувати застосування на людях на основі даних, одержаних на тварин.

Рівень доз і інтервал можна регулювати індивідуально для одержання рівнів в плазмі активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які є достатніми для підтримання терапевтичної дії. Звичайні дози, призначені для введення пацієнту шляхом ін'єкції, складають від приблизно 0,1 до 50 мг/кг/день, як правило, від приблизно 0,5 до 1 мг/кг/день. Для досягнення терапевтично ефективних рівнів в плазмі можна вводити декілька доз кожного дня. Рівні в плазмі можна оцінювати, наприклад, за допомогою ЖХВР.

В випадках місцевого застосування або вибіркового поглинання ефективна місцева концентрація активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул може не відповідати концентрації в плазмі. Спеціаліст в даній галузі може оптимізувати терапевтично ефективні місцеві дози без надмірних експериментів.

Застосування в терапевтично ефективній дозі активувальних Т-клітини біспецифічних антигензв'язувальних молекул, представлених в даному описі, повинно, як правило, забезпечити терапевтичну користь, не викликаючи суттєвої токсичності. Токсичність і терапевтичну ефективність активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули можна визначати за допомогою стандартних фармацевтичних процедур на культурах клітин або експериментальних тварин. Аналізи на клітинних культурах або опити на тварин можна застосовувати для визначення значень  $LD_{50}$  (доза, смертельна для 50 % популяції) і  $ED_{50}$  (доза, терапевтично ефективна для 50 % популяції). Співвідношення доз, що характеризують токсичні і терапевтичні дії, позначають як терапевтичний індекс, який можна виражати у вигляді співвідношення  $LD_{50}/ED_{50}$ . Що активують Т-клітини біспецифічні антигензв'язувальні молекули, що мають високі терапевтичні індекси, є переважними. В одному

з варіантів здійснення винаходу активувальна Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, що пропонується в даному винаході, характеризується високим терапевтичним індексом. Дані, одержані в аналізах з застосуванням клітинних культур і в опитах на тварин, можна застосовувати для визначення діапазону доз, які можна застосовувати на людях. Доза знаходиться переважно в діапазоні концентрацій в кровотоку, які містять ED<sub>50</sub>, що мають невисоку токсичність або не мають токсичності. Доза може варіюватися залежно від різних факторів, наприклад, від застосовної лікарської форми, застосовного шляхи введення, стану індивідуума і т.п. Точну препаративну форму, путь введення і дозу може вибирати індивідуально лікар залежно від стану пацієнта (див., наприклад, Fingl та інш. в: The Pharmacological Basis of Therapeutics, гл. 1, 1975, з. 1, публікація повністю включена в даний опис як посилання).

Лікарю пацієнтів, яким вводять що активують Т-клітини біспецифічні антигензв'язувальні молекули, запропоновані у винаході, повинні бути очевидним, як і коли закінчувати, переривати або регулювати введення з причин токсичності, дисфункції органів і т. п. І, навпаки, лікарю повинні бути очевидні, як регулювати лікування в бік застосування більш високих доз, якщо клінічна відповідь є неадекватною (усуваючи токсичність). Величина дози для введення при лікуванні відповідного порушення повинна варіюватися залежно від важкості стану, який підлягає лікуванню, шляхи введення і т. п. Важкість стану можна, наприклад, оцінювати серед іншого за допомогою стандартних прогностичних методів оцінювання. Крім того, доза і передбачувана частота введення дози повинні також варіюватися залежно від віку, ваги тіла і відповіді індивідуального пацієнта.

Інші засоби і варіанти лікування

Що активують Т-клітини біспецифічні антигензв'язувальні молекули, запропоновані у винаході, при лікуванні можна вводити в поєднанні з одним або декількома іншими засобами. Наприклад, активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході, можна вводити сумісно щонайменше з одним додатковим терапевтичним засобом. Поняття "терапевтичний засіб" охоплює будь-який засіб, який вводять для лікування симптому або захворювання в індивідуума, який потребує такого лікування. Зазначений додатковий терапевтичний засіб може представляти собою будь-яку діючу речовину, яку можна застосовувати при конкретному показанні, що підлягає лікуванню, переважно з додатковими видами активності, які не мають негативної дії один на одного. В деяких варіантах здійснення винаходу додатковий терапевтичний засіб являє собою імуномодулятор, цитостатичний засіб, інгібітор клітинної адгезії, цитотоксичний засіб, активатор клітинного апоптозу або засіб, що підвищує чутливість клітин до індукторів апоптозу. В конкретному варіанті здійснення винаходу додатковий терапевтичний засіб являє собою протираковий засіб, наприклад, агент, що руйнує мікротрубочки, антиметаболіт, інгібітор топоізомерази, інтеркалятор ДНК, алкилувальний агент, засіб гормональної терапії, інгібітор кінази, антагоніст рецептора, активатор апоптозу пухлинних клітин або антиангіогенний засіб.

Зазначені інші засоби можуть бути присутніми в комбінації в кількостях, ефективних для зазначених цілей. Ефективна кількість зазначених інших засобів залежить від кількості застосовної активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, типу порушення або лікування, і інших зазначених вище факторів. Що активують Т-клітини біспецифічні антигензв'язувальні молекули, як правило, застосовують в таких же дозах і з застосуванням зазначених в даному описі шляхів введення, або в дозах, що складають приблизно від 1 до 99 % від зазначених в даному описі доз, або в будь-якій дозі й із застосуванням будь-якого шляхи введення, які згідно з емпіричними/клінічними даними розглядають як прийнятні.

Зазначені вище комбіновані терапії передбачають сумісне введення (коли два або більшу кількість терапевтичних засобів містять в одну і ту же або в окремі композиції) і роздільне введення, в цьому випадку введення активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка пропонується у винаході, можна здійснювати до, одночасно і/або після введення додаткового терапевтичного засобу і/або ад'юванту. Активувальні Т-клітини біспецифічні антигензв'язувальні молекули, запропоновані у винаході, можна застосовувати також в поєднанні з променевою терапією.

Вироби

Іншим об'єктом винаходу є виріб, який містить продукти, застосовні для лікування, попередження і/або діагностування зазначених вище порушень. Виріб являє собою контейнер і етикетку або листівку-вкладиш в упаковку, які розміщені на контейнері або додаються до нього. Прийнятними контейнерами є, наприклад банки, пляшечки, шприци, пакети для внутрішньовенного (IV) розчину тощо. Контейнери можна виробляти з різних матеріалів, таких

як скло або пласмася. Контейнер містить композицію, яка сама по себе або в поєднанні з іншою композицією є ефективною для лікування, попередження і/або діагностування стану, і може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може представляти собою пакет для внутрішньовенного розчину або пляшечку, постачену пробкою, яку можна проколуювати за допомогою голки для підшкірних ін'єкцій). Щонайменше одна діюча речовина в композиції являє собою активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході. На етикетці або листівці-вкладиші в упаковку зазначено, що композицію застосовують для лікування вибраного стану. Крім того, виріб може містити (а) перший контейнер з наявною в ньому композицією, де композиція містить активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, запропоновану у винаході; і (б) другий контейнер з наявною в ньому композицією, де композиція містить додатковий цитотоксичний або інше терапевтичний засіб. Згідно з цим варіантом здійснення винаходу виріб може містити листівку-вкладиш в упаковку, яка містить інформацію про те, що композиції можна застосовувати для лікування конкретного стану. В альтернативному або додатковому варіанті виріб може додатково містити другий (або третій) контейнер з фармацевтично прийнятним буфером, таким як бактеріостатична вода для ін'єкцій (БСВИ), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрози. Крім того, він може містити інші матеріали, необхідні з комерційної точки зору і з точки зору споживача, зокрема, інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки й шприци.

#### Приклади

Нижче представлені приклади способів і композицій, які запропоновані у винаході. Як повинно бути очевидно, можна втілювати на практиці різні інші варіанти здійснення винаходу в цілому з урахуванням представленого вище опису винаходу.

#### Загальні методи

##### Методи рекомбінантної ДНК

Для маніпуляцій з ДНК застосовували стандартні методи, описані у Sambrook J та ін., Molecular cloning: A laboratory manual; вид-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенти для молекулярної біології застосовували згідно з інструкціями виробників. Загальну інформацію, що стосується нуклеотидних послідовностей легких і важких ланцюгів людських імуноглобулінів, див у: Kabat E.A та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-во NIH, публікація N 91-3242, 1991.

##### Секвеновані ДНК

Послідовності ДНК визначали шляхом секвенування двох ланцюгів.

##### Синтез генів

Потрібні сегменти генів або створювали за допомогою ПЦР з застосуванням відповідних матриць, або синтезували на фірмі Geneart AG (Регенсбург, Німеччина) з синтетичних олігонуклеотидів і ПЦР-продуктів за допомогою автоматичного синтезу генів. В тих випадках, коли точна генна послідовність не була доступна, створювали олігонуклеотидні праймери на основі послідовностей найближчих гомологів і гени виділяли за допомогою ВІД-ПЦР з РНК, одержаної з відповідної тканини. Сегменти генів, фланковані одиничними сайтами, розпізнаваними рестрикційними ендонуклеазами, клонували в стандартних клонувальних/секвенувальних векторах. Плазмідну ДНК очищали з трансформованих бактерій і визначали концентрацію за допомогою УФ-спектроскопії. Послідовність ДНК субклонуваних фрагментів генів підтверджували ДНК-секвенуванням. Створювали сегменти генів з потрібними сайтами рестрикції, що дозволяють субклонувати їх у відповідних експресійних векторах. Все конструкції створювали з 5'-кінцевої послідовністю ДНК, що кодує лідерний пептид, який спрямовує секрецію білків в еукаріотичних клітинах. В SEQ ID NO: 108-116 представлені приклади лідерних пептидів і що кодують їх полінуклеотидних послідовностей.

##### Виділення первинних людських пан-Т-клітин з PBMC

Мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) одержували шляхом центрифугування в градієнті щільності Histopaque зі збагачених лімфоцитами препаратів (лейкоцитарні плівки), одержаних з місцевих банків крові або з свіжої крові здорових донорів. В цілому, метод полягав у наступному: кров розводили стерильним ЗФР і обережно нашаровували на градієнт Histopaque (фірма Sigma, H8889). Після центрифугування протягом 30 хв при 450 × g при кімнатній температурі (відключений гальмівний пристрій), частину плазми, що знаходиться над інтерфазою, що містить PBMC, відкидали. PBMC переносили в нові 50-мілілітрові фальконівські пробірки і пробірки заповнювали ЗФР до повного об'єму 50 мл. Суміш центрифугували при кімнатній температурі протягом 10 хв при 400 × g (включений гальмівний пристрій). Супернатант відкидали і дебрис PBMC відмивали двічі стерильним ЗФР (стадії центрифугування при 4 °C протягом 10 хв при 350 × g). Здійснювали автоматичний підрахунок одержаної популяції PBMC.

(пристрій ViCell) і зберігали в середовищі RPMI1640, що містить 10 % FCS і 1 % L-аланін-L-глутаміну (фірма Biochrom, K0302) при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> в інкубаторі аж до початку аналізу.

Для одержання фракції, збагаченої Т-клітинами з PBMC, застосовували набір для виділення пан-Т-клітин (Pan T Cell Isolation Kit II) (фірма Miltenyi Biotec, № 130-091-156) згідно з інструкціями виробника. В цілому, метод полягав у наступному: клітинний дебрис розводили, застосовуючи 40 мкл холодного буфера на 10 мільйонів клітин (ЗФР з 0,5 % БСА, 2 мМ ЕДТК, простерилізований фільтрацією), й інкубували, застосовуючи 10 мкл коктейлю біотин-антитіло на 10 мільйонів клітин, протягом 10 хв при 4 °C. Додавали 30 мкл холодного буфера і 20 мкл магнітних гранул з антитілом до біотину на 10 мільйонів клітин і суміш інкубували протягом ще 15 хв при 4 °C. Клітини промивали, додаючи буфер в об'ємі, що дорівнює 10-20 об'ємам які були в наявності, і потім здійснювали стадії центрифугування при 300 × g протягом 10 хв. Аж до 100 мільйонів клітин ресуспендували в 500 мкл буфера. Магнітну сепарацію немічених людських пан-Т-клітин здійснювали за допомогою LS-колонок (фірма Miltenyi Biotec, № 130-042-401) згідно з інструкціями виробника. Здійснювали автоматичний підрахунок одержаної популяції Т-клітин (пристрій ViCell) і зберігали їх в середовищі AIM-V при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> в інкубаторі аж до початку аналізу (не більше 24 год.).

Виділення первинних людських наївних (нестимульованих) Т-клітин з PBMC

Мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) одержували шляхом центрифугування в градієнті щільності Histopaque зі збагачених лімфоцитами препаратів (лейкоцитарні плівки), одержаних з місцевих банків крові або з свіжої крові здорових донорів. Для одержання фракції, збагаченої Т-клітинами з PBMC, застосовували набір для виділення наївних CD8<sup>+</sup>-Т-клітин (Naive CD8<sup>+</sup>T cell isolation Kit) фірми Miltenyi Biotec (№ 130-093-244), згідно з інструкціями виробника, але, пропускаючи останню стадію виділення CD8<sup>+</sup>-Т-клітин (див. також опис виділення первинних людських пан-Т-клітин).

Виділення мишачих пан-Т-клітин із спленоцитів

Виділяли селезінки з мишей C57BL/6, переносили їх у С-пробірку GentleMACS (фірма Miltenyi Biotec, № 130-093-237), яка містить MACS-буфер (ЗФР + 0,5 % БСА + 2 мМ ЕДТК), і розщепляли за допомогою пристрою для дисоціації тканин GentleMACS з одержанням суспензії одиничних клітин згідно з інструкціями виробника. Клітинну суспензію пропускали через фільтр для попереднього розділення для видалення недисоційованих частинок тканини. Після центрифугування при 400 × g протягом 4 хв при 4 °C додавали буфер для лізису АСК для лізування еритроцитів (інкубація протягом 5 хв при кімнатній температурі). Залишкові клітини двічі промивали MACS-буфером, підраховували і застосовували для виділення мишачих пан-Т-клітин. Негативну (магнітну) селекцію здійснювали, застосовуючи набір для виділення пан-Т-клітин фірми Miltenyi Biotec (№ 130-090-861) згідно з інструкціями виробника. Здійснювали автоматичний підрахунок одержаної популяції Т-клітин (пристрій ViCell) і одразу застосовували для додаткових аналізів.

Виділення первинних PBMC мавп циномолгус з гепаринізованої крові

Мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) одержували шляхом центрифугування в градієнті щільності з свіжої крові здорових мавп циномолгус наступним чином: гепаринізовану кров розводили у співвідношенні 1:3 стерильним ЗФР і середовище Lymphoprep (фірма Axiolab, № 1114545) розводили до 90 % стерильним ЗФР. Два об'єми розведеної крові нашаровували на один об'єм розведеного градієнта щільності й фракцію PBMC розділяли шляхом центрифугування протягом 30 хв при 520 × g без гальмування при кімнатній температурі. Полосу, що відповідає PBMC, переносили у свіжу 50-мілілітрову фальконівську пробірку і промивали стерильним ЗФР шляхом центрифугування протягом 10 хв при 400 × g при 4 °C. Здійснювали одну стадію низькошвидкісного центрифугування для видалення тромбоцитів (15 хв при 150 × g, 4 °C) і здійснювали автоматичний підрахунок одержаної популяції PBMC (пристрій ViCell) і одразу застосовували для додаткових аналізів.

Клітини-мішені

Для оцінювання біспецифічних антигензв'язувальних молекул, мішенню яких є MCSP, застосовували наступні лінії пухлинних клітин: людська клітинна лінія меланому WM266-4 (ATCC № CRL-1676), виведена з метастатичного сайту злоякісної меланоми і яка відрізняється високим рівнем експресії людського MCSP; людська клітинна лінія меланому MV-3 (люб'язно надана Медичним центром Неймегенського університету Радбоду (Radboud University Nijmegen Medical Centre)), що експресує середні рівні людського MCSP; людська клітинна лінія злоякісної меланоми (первинна пухлина) A375 (ECACC № 88113005), що експресує високі рівні MCSP; людська клітинна лінія карциноми ободової кишки HCT-116 (ATCC № CCL-247), яка не експресує MCSP; і клітинна лінія аденокарциноми ободової кишки людини європейської (кавказоїдної) раси LS180 (ECACC № 87021202), яка не експресує MCSP.

Для оцінювання біспецифічних антигензв'язувальних молекул, мішенню яких є CEA, застосовували наступні лінії пухлинних клітин: людська клітинна лінія раку шлунку MKN45 (DSMZ № ACC 409), що експресує дуже високі рівні людського CEA; людська клітинна лінія аденокарциноми підшлункової залози HPAF-II (люб'язно надана фірмою Roche Nutley), що експресує високі рівні людського CEA; людська клітинна лінія первинної аденокарциноми підшлункової залози VxPC-3 (ECACC № 93120816), що експресує середні рівні людського CEA; клітинна лінія аденокарциноми ободової кишки жінки європеїдної раси LS-174T (ECACC № 87060401), що експресує середні рівні людського CEA; людська клітинна лінія аденокарциноми підшлункової залози ASPC-1 (ECACC № 96020930), що експресує дуже низькі рівні людського CEA; людська клітинна лінія епітеліоїдної карциноми підшлункової залози Panc-1 (ATCC № CRL-1469), що експресує (дуже) низькі рівні людського CEA; людська клітинна лінія карциноми ободової кишки HCT-116 (ATCC № CCL-247), не що експресує CEA; людська аденокарциномна клітинна лінія епітеліальної базальної мембрани альвеол A549-huCEA, яку стабільно трансфектували в лабораторії заявників для експресії людського CEA; і мишача клітинна лінія карциноми ободової кишки MC38-huCEA, яка була створена в лабораторії заявників, що стабільно експресує людський CEA.

Крім того, для оцінювання зв'язування різних біспецифічних конструкцій з людським CD3 на клітинах застосовували людську лінію клітин Т-клітинного лейкозу (Т-лімфобластний лейкоз) Jurkat (ATCC № TIB-152).

#### Приклад 1

##### Дозрівання афінності антитіла до MCSP M4-3/ML2

Процедуру дозрівання афінності здійснювали за допомогою олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу. Для цієї мети варіант важкого ланцюга M4-3 і варіант легкого ланцюга ML2 клонували у фагмідному векторі, аналогічно методу, описаному у Hoogenboom (Hoogenboom та інш., *Nucleic Acids Res.* 19, 1991, сс. 4133-4137). Залишки, які підлягають рандомізації ідентифікували спочатку шляхом створення 3D-моделі антитіла на основі класичного моделювання гомології і наступної ідентифікації доступних для розчинника для залишків гіперваріабельних ділянок (CDR) важкого і легкого ланцюга. Представлені в таблиці 1 олігонуклеотиди, рандомізовані на основі синтезу тринуклеотидів, придбавали у фірми Ella Biotech (Мюнхен, Німеччина). Створювали три незалежні підбібліотеки за допомогою класичної ПЦР, і вони включали рандомізацію в CDR-H1 в поєднанні з CDR-H2, або в CDR-L1 в поєднанні з CDR-L2. CDR-L3 рандомізували за допомогою іншого підходу. ДНК-фрагменти цих бібліотек клонували у фагміді за допомогою розщеплення рестриктазами і лігування, а потім інтродуктували за допомогою електропорації в бактерій штаму TG1.

##### Селекція із застосуванням бібліотек

Створені таким чином варіанти антитіл експонували в одновалентному форматі на частинках нитчастого фага у вигляді злиття з продуктом гену III фага M13, упакованого в кожну частинку. Експоновані на фазі варіанти потім піддавали скринінгу у відношенні їх біологічної активності (в даному контексті: афінність зв'язування), і кандидатів, що мають покращеним одним або декількома видами активності, застосовували для подальшої розробки. Методи створення фагових дисплейних бібліотек можна почерпнути у Lee та інш., *J. Mol. Biol.* 340, 2004, сс. 1073-1093.

Селекцію всіх бібліотек з дозрілою афінністю здійснювали в розчині згідно з наступною процедурою: 1) зв'язування  $\sim 10^{12}$  фагмідних частинок з кожної бібліотеки для дозрівання афінності з 100 нМ біотинільованою конструкцією hu-MCSP(D3-домен)-avi-his (SEQ ID NO: 118) протягом 0,5 год. в загальному об'ємі 1 мл; 2) іммобілізація біотинільованої конструкції hu-MCSP(D3-домен)-avi-his і специфічно зв'язаних фагових частинок шляхом додавання  $5,4 \times 10^7$  покритих стрептавідином магнітних гранул протягом 10 хв; 3) відмивання гранул з застосуванням 5-10× 1 мл 3ФР/Твин20 і 5-10× 1 мл 3ФР; 4) елювання фагових частинок шляхом додавання 1 мл 100 мМ TEA (триетиламін) протягом 10 хв і нейтралізація шляхом додавання 500 мкл 1М Трис/HCl, pH 7,4 і 5) повторне зараження що знаходяться на експоненціальній фазі росту бактерій *E. coli* TG1, зараження фагом-хелпером VCSM13 і потім осадження за допомогою ПЕГ/NaCl фагмідних частинок, призначених для застосування в наступних циклах селекції. Селекції здійснювали з застосуванням приблизно 3-5 циклів з застосуванням або постійних, або знижувальних концентрацій антигену (від  $10^{-7}$  М до  $2 \times 10^{-9}$  М).

В цикле 2, "захоплення" комплексів антиген-фаг здійснювали з застосуванням нейтравідинових планшетів замість стрептавідинових гранул. Специфічне зв'язувальні агенти ідентифікували за допомогою ELISA наступним чином: 100 мкл 10 нМ біотинільованої конструкції hu-MCSP(D3-домен)-avi-his на лунку застосовували для сенсibiliзації покритих нейтравідином планшетів. Додавали які містять Fab бактеріальні супернатанти і зв'язування

- 5 Fab-фрагментів виявляли за допомогою їх Flag-міток, застосовуючи антитіло до Flag/HRP як вторинне антитіло. Позитивні за даними ELISA клони експресували в бактеріях у вигляді розчинних Fab-фрагментів в 96-лунковому форматі й супернатанти піддавали скринінгу у відношенні кінетичних характеристик з застосуванням експериментального SPR-аналізу з застосуванням пристрою ProteOn XPR36 (фірма BioRad). Ідентифікували клони, що експресують Fab-фрагменти, зв'язування яких характеризувалось найбільш високими константами афінності, і секвенували відповідні фагміди.

Таблиця 1

(завжди виключали Cys і Met. Крім того, виключали Lys в тих випадках, коли олігонуклеотид являв собою зворотній праймер)

Положення	Рандомізація
Важкий ланцюг	
CDR1	
Ser31	S (40 %), решта (60 %, по 4 % кожного)
Gly32	G (40 %), решта (60 %, по 4 % кожного).
Tyr33	Y (40 %), решта (60 %, по 4 % кожного)
Tyr34	Y (40 %), решта (60 %, по 4 % кожного)
CDR2	
Tyr50	Y 40 %, (F, W, L, A, I, 30 %, по 6 % кожного), решта (30 %, по 2,5 % кожного)
Thr52	T (60 %), решта (40 %, по 2,5 % кожного)
Tyr53	Y (40 %), решта (60 %, по 3,8 % кожного)
Asp54	D (40 %), решта (60 %, по 3,8 % кожного)
Ser56	S (40 %), решта (60 %, по 3,8 % кожного)
Легкий ланцюг	
CDR1	
Gln27	Q (40 %), (E, D, N, S, T, R, 40 %, по 6,7 % кожного), решта (всього 20 %, по 2,2 % кожного)
Gly28	G (40 %), (N, T, S, Q, Y, D, E, 40 %, по 5,7 % кожного), решта (20 %, по 2,5 % кожного)
Asn31	N (40 %), (S, T, G, Q, Y, D, E, R, 50 %, по 6,3 % кожного), решта (10 %, по 1,4 % кожного)
Tyr32	Y (40 %), (W, S, R, 30 %, по 10 % кожного), решта (30 %, по 2,3 % кожного)
CDR2	
Tyr50	Y (70 %), (E, R, K, A, Q, T, S, D, G, W, F, 30 %, по 2,7 % кожного)
Thr51	T (50 %), (S, A, G, N, Q, V, 30 %, по 5 % кожного), решта (20 %, по 2 % кожного)
Ser52	S (50 %), решта (50 %, по 3,1 % кожного)
Ser53	S (40 %), (N, T, Q, Y, D, E, I, 40 %, по 5,7 % кожного), решта (20 %, по 2,2 % кожного)
CDR3	
Tyr91	Y (50 %), решта (50 %, по 3,1 % кожного)
Ser92	S (50 %), (N, Q, T, A, G 25 %, по 5 % кожного), решта (25 %, по 2,3 % кожного)
Lys93	K (50 %), S (5 %), T (5 %), N (5 %), решта (35 %, по 2,7 % кожного)
Leu94	L (50 %), (Y, F, S, I, A, V, 30 %, 5 % кожного), решта (20 %, по 2 % кожного)
Pro95	P (50 %), (S, A, 20 %, по 10 % кожного), решта (30 %, по 2,1 % кожного)
Trp96	W 50 %, (Y, R, L, 15 %, 5 % кожного), решта (35 %, по 2,5 % кожного)

- 10 На фіг. 2 представлений порівняльний аналіз первинної структури клонів антитіла до MCSP з дозрілою афінністю і батьківського клону, не який не піддавали процедурі дозрівання афінності (M4-3 ML2). Рандомізацію важкого ланцюга здійснювали тільки в CDR1 і 2. Рандомізацію легкого ланцюга здійснювали в CDR1 і 2, і незалежно в CDR3.

- 15 В процесі селекції в каркасних ділянках виникало декілька мутацій типу F71Y в клоне G3 або Y87H в клоне E10.

Одержання і очищення людського IgG<sub>1</sub>

ДНК-послідовності варіабельної ділянки важкого і легкого ланцюга варіантів з дозрілою афінністю субклонували в рамці зчитування або з константної ділянкою важкого ланцюга, або з константної ділянкою легкого ланцюга, попередньо вбудованої у відповідний реципієнтний експресійний вектор ссавців. Експресія антитіла находилась під контролем промотору MPSV, і вектор ніс синтетичну сигнальну полі(A)-послідовність на 3'-кінці кожної CDS. крім того, кожний вектор містив OriP-послідовність EBV.

Молекулу одержували шляхом сумісної трансфекції клітин HEK293-EBNA експресійними векторами ссавців з застосуванням поліетиленіміну (PEI). Клітини трансфектували відповідними експресійними векторами в співвідношенні 1:1. Для трансфекції клітини HEK293 EBNA культивували в суспензії і безсироватковому культуральному середовищі CD CHO. Для одержання в 500-мілілітрових струшувальних колбах 400 мільйонів клітин HEK293 EBNA висівали за 24 год. до трансфекції. Для трансфекції клітини центрифугували протягом 5 хв при 210 × g, супернатант заміняли 20 мл попередньо нагрітого середовища CD CHO. Експресійні вектори змішували в 20 мл середовища CD CHO до досягнення кінцевої кількості ДНК, що складає 200 мкг. Після додавання 540 мкл розчину PEI суміш інтенсивно перемішували протягом 15 з і потім інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі. Потім клітини змішували з розчином ДНК/PEI, переносили в 500-мілілітрову колбу і інкубували протягом 3 год. при 37 °C в інкубаторі в атмосфері, що містить 5 % CO<sub>2</sub>. Після періоду інкубації додавали 160 мл середовища F17 і клітини культивували протягом 24 год. Через один день після трансфекції додавали 1 мМ вальпроєву кислоту і 7 % Feed 1 (фірма Lonza). Після культивування протягом 7 днів супернатант збирали для очищення шляхом центрифугування протягом 15 хв при 210 × g, розчин стерилізували фільтрацією (фільтр 0,22 мкм), доповнювали азидом натрію до кінцевої концентрації 0,01 % (мас./об.), витримували при 4 °C.

Білки, що секретують очищали з супернатантів клітинних культур за допомогою афінної хроматографії на білку А. Супернатант вносили на колонку HiTrap ProteinA HP (CV=5 мл, фірма GE Healthcare), урівноважену 40 мл суміші, що містить 20 мМ фосфат натрію, 20 мМ цитрат натрію, 0,5 М хлорид натрію, pH 7,5. Незв'язаний білок видаляли відмиванням, застосовуючи рівний щонайменше 10 об'ємам колонки об'єм суміші, що містить 20 мМ фосфат натрію, 20 мМ цитрат натрію, 0,5 М хлорид натрію, pH 7,5. Потрібний білок елюювали, застосовуючи градієнт об'ємом, рівним 20 об'ємам колонки, від 20 мМ цитрату натрію, 0,5 М хлориду натрію, pH 7,5 до 20 мМ цитрату натрію, 0,5 М хлориду натрію, pH 2,5. Розчин білка нейтралізували, додаючи 1/10 0,5 М фосфату натрію, pH 8. Потрібний білок концентрували й фільтрували перед внесенням на колонку HiLoad Супердекс 200 (фірма GE Healthcare), урівноважену розчином, що містять 20 мМ гістидин, 140 мМ хлорид натрію, pH 6,0.

Концентрацію білка в очищених білкових зразках визначали шляхом вимірювання оптичної щільності (ОП) при 280 нм, застосовуючи коефіцієнт молярної екстинкції, розрахований на основі амінокислотної послідовності. Чистоту і молекулярну масу молекул аналізували за допомогою KE-ПААГ в присутності відновлювача і без нього. Застосовували систему Caliper LabChip GXII (фірма Caliper Lifescience) згідно з інструкціями виробника. Для аналізу застосовували по 2 мкг зразка. Вміст агрегатів в зразках антитіла аналізували, застосовуючи колонку для аналітичної гель-фільтрації TSKgel G3000 SW XL (фірма Tosoh) в рухомому буфері, що містить 25 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 125 мМ NaCl, 200 мМ моногідрохлорид L-аргініну, 0,02 % (мас./об.) NaN<sub>3</sub>, pH 6,7, при 25 °C.

Таблиця 2

Одержання і очистка анти-MCSP IgG з дозрілою афінністю

Конструкція	Вихід [мг/л]	HMW [%]	LMW [%]	Мономер [%]
M4-3(C1) ML2(G3)	43,9	0	0	100
M4-3(C1) ML2(E10)	59,5	0	0	100
M4-3(C1) ML2(C5)	68,9	0	0,8	99,2

Визначення афінності

ProteOn-аналіз

Величини K<sub>D</sub> вимірювали за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, застосовуючи пристрій ProteOn XPR36 (фірма BioRad) при 25 °C, застосовуючи як "захоплювальне" антитіло антитіло, специфічне у відношенні людського F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента (фірма Jackson ImmunoResearch, № 109-005-006), іммобілізованого за допомогою амінного сполучення на CM5-

чипах, і наступного "захоплення" Fab-фрагментів з бактеріального супернатанта або з препаратів очищених Fab. В цілому, метод полягав у наступному: біосенсорні чипи з карбоксиметилізованого декстрану (CM5, фірма GE Healthcare) активували за допомогою гідрохлориду N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодіміду (EDC) і N-гідрокисукциніміду (NHS) згідно з інструкціям постачальника. "Захоплювальне" антитіло, специфічне у відношенні людського F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, розводили 10 мМ ацетатом натрію, рН 5,0 до концентрації 50 мкг/мл перед ін'єкцією зі швидкістю потоку 10 мкл/хв до досягнення аж до приблизно 10000 одиниць відповіді (RU) зшитого "захоплювального" антитіла. Після ін'єкції "захоплювального" антитіла ін'єкували 1 М етаноламін для блокади непрореагованих груп. Для кінетичних вимірювань ін'єкували Fab з бактеріального супернатанту або очищені Fab зі швидкістю потоку 10 мкл/хв протягом 300 с і давали пройти дисоціації протягом 300 с для стабілізації основного рівня "захоплення". Рівні "захоплення" находились в діапазоні 100-500 RU. На наступній стадії аналіт, що являє собою конструкцію людський MCSP(D3-домен)-avi-his, ін'єкували або в одній концентрації, або у вигляді серій концентрацій (залежно від афінності клону в діапазоні від 100 нМ до 250 пМ), розведених в HBS-EP+ (фірма GE Healthcare, 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЕДТК, 0,05 % сурфактанту P20, рН 7,4), при 25 °С зі швидкістю потоку 50 мкл/хв. Поверхню сенсорного чипа регенерували шляхом ін'єкції гліцину, рН 1,5 протягом 30 з зі швидкістю 90 мкл/хв з наступною ін'єкцією NaOH протягом 20 с з такою ж самою швидкістю. Швидкість реакції асоціації ( $k_{on}$ ) і реакції дисоціації ( $k_{off}$ ) розраховували із застосуванням простої моделі зв'язування Ленгмюра 1:1 (програма ProteOn XPR36 Evaluation або програма Scrubber (BioLogic)) шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації і дисоціації. Константу рівноваги реакції дисоціації ( $K_D$ ) розраховували як співвідношення  $k_{off}/k_{on}$ . Ці дані застосовували для порівняльного оцінювання афінності зв'язування варіантів з дозрілою афінністю і батьківського антитіла. В таблиці 3а представлені дані, одержані при здійсненні зазначених аналізів.

G3, E10, C5 для легкого ланцюга і D6, A7, B7, B8, C1 для важкого ланцюга були вибрані для конверсії у формат людського IgG1. Оскільки CDR1 і 2 легкого ланцюга рандомізували незалежно від CDR3, то одержані CDR об'єднували в процесі IgG-конверсії.

Афінність IgG-формату знову вимірювали з застосуванням як антигену людського MCSP (SEQ ID NO: 118), а також його гомолога - MCSP мавп циномоглус (Cyno MCSP, SEQ ID NO: 117).

Метод повністю відповідав описаному для Fab-фрагментів, за виключенням того, що застосовували очищений IgG, одержаний з організму ссавців.

Таблиця 3а

Афінність до MCSP клонів з дозрілою афінністю: дані, одержані за допомогою Proteon-аналізу

Варіант	Людський MCSP	Людський MCSP	Сyno MCSP	Людський MCSP	Сyno MCSP
	Fab, $K_D$	IgG, $K_D$	IgG, $K_D$	IgG, $K_D$	IgG, $K_D$
	Дані об афінності, одержані за допомогою Proteon-аналізу			Порівняльна афінність зв'язування - кратність збільшення відносно батьківського антитіла	
Батьківське антитіло M4-3/ML2	$5 \times 10^{-9}$	$2 \times 10^{-9}$	$2 \times 10^{-9}$		
M4-3/ML2(G3)	$4 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-10}$	$6 \times 10^{-10}$	6,7	3,3
M4-3/ML2(E10)	$7 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-9}$	$2 \times 10^{-9}$	2,0	1,0
M4-3/ML2(E10/G3)		$4 \times 10^{-10}$	$9 \times 10^{-10}$	5,0	2,2
M4-3/ML2(C5)	$7 \times 10^{-10}$	$4 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-9}$	5,0	2,0
M4-3/ML2(C5/G3)		$7 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-9}$	2,9	2,0



Продовження Таблица 3а

M4-3(D6)/ML2	$2 \times 10^{-9}$	$4 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-9}$	5,0	2,0
M4-3(A7)/ML2	$2 \times 10^{-11}$	$8 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-9}$	2,5	2,0
M4-3(B7)/ML2		$5 \times 10^{-10}$	$7 \times 10^{-10}$	4,0	2,9
M4-3(B8)/ML2	$3 \times 10^{-10}$	$9 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-9}$	2,2	2,0
M4-3(C1)/ML2	$6 \times 10^{-10}$	$9 \times 10^{-10}$	$8 \times 10^{-10}$	2,2	2,5
M4-3(C1)/ML2(G3)		$7 \times 10^{-11}$	$2 \times 10^{-10}$	28,6	10,0
M4-3(C1)/ML2(E10)		$5 \times 10^{-10}$	$6 \times 10^{-10}$	4,0	3,3
M4-3(A7)/ML2(G3)		$7 \times 10^{-11}$	$2 \times 10^{-10}$	28,6	10,0
M4-3(A7)/ML2(E10)		$3 \times 10^{-10}$	$7 \times 10^{-10}$	6,7	2,9
M4-3(C1)/ML2(C5)		$2 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-10}$	10,0	6,7
M4-3(A7)/ML2(C5)		$7 \times 10^{-11}$	$2 \times 10^{-10}$	28,6	10,0

Визначення афінності за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR) з застосуванням Biacore T200

5 Експерименти з застосуванням поверхневого плазмонного резонансу (SPR) для визначення афінності і авідності IgG з дозрілою афінністю здійснювали за допомогою пристрою Biacore T200 при 25 °C, застосовуючи як рухомого буфера HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM ЕДТК, 0,005 % сурфактанту P20, фірма Biacore, Фрейбург/Німеччина).

10 Для аналізу авідності взаємодії різних анти-MCSP IgG з людським MCSP-D3 і MCSP-D3 мавп циномолгус здійснювали безпосередньо у поєднанні приблизно 9500 резонансних одиниць (RU) антитіла до пента-His (фірма Qiagen) на CM5-чипі при pH 5,0, застосовуючи стандартний набір для амінного сполучення (фірма Biacore, Фрейбург/Німеччина). Антигени "захоплювали", пропускаючи їх протягом 60 з в концентрації 30 нМ зі швидкістю 10 мкл/хв відповідно. IgG пропускали через проточну комірку в концентрації 0,0064-100 нМ зі швидкістю потоку 30 мкл/хв протягом 280 с. Моніторинг дисоціації здійснювали протягом 180 с. Різниці всіх показників переломлення коректували шляхом віднімання відповіді, одержаного в проточній референс-комірці. Для цього IgG пропускали по поверхні з іммобілізованим антитілом до пента-His, але ін'єкували HBS-EP, а не людський MCSP-D3 або MCSP-D3 мавп циномолгус.

20 Для вимірювання афінності IgG "захоплювали" на поверхні сенсорного чипа CM5 з іммобілізованим антитілом до людської Fc-ділянки. "Захоплений" IgG зшивали з поверхнею сенсорного чипа шляхом безпосередньої іммобілізації приблизно 9500 резонансних одиниць (RU) при pH 5,0, застосовуючи стандартний набір для амінного сполучення (фірма Biacore, Фрейбург/Німеччина). IgG "захоплювали", пропускаючи їх протягом 25 з в концентрації 10 нМ зі швидкістю 30 мкл/хв. MCSP-D3 людини і мавп циномолгус пропускали через проточну комірку 25 протягом 120 з в концентрації 2-500 нМ зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Моніторинг дисоціації здійснювали протягом 60 з. Моніторинг асоціації і дисоціації в випадку концентрацій 166 і 500 нМ здійснювали протягом 1200 і 600 з відповідно. Різницю всіх показників переломлення коректували шляхом віднімання відповіді, одержаного в проточній референс-комірці. Для цього антигени пропускали по поверхні з іммобілізованим антитілом до людської Fc-ділянки, але 30 ін'єкували HBS-EP, а не анти-MCSP IgG.

Кінетичні константи розраховували за допомогою програми Biacore T200 Evaluation (vAA, фірма Biacore AB, Уппсала/Швеція) шляхом припасування рівнянь для швидкостей до моделі зв'язування Ленгмюра 1:1 за допомогою чисельного інтегрування.

35 Більш висока афінність до MCSP-D3 людини і мавп циномолгус була підтверджена за допомогою вимірювань методом поверхневого плазмонного резонансу з застосуванням Biacore T200 крім того, вимірювання авідності продемонстрували підвищення аж до 3-кратного при двовалентному зв'язуванні (Таблица 3б).

Афінність й авідність анти-MCSP IgG до MCSP-D3 людини і MCSP D3 мавп циномогус

K <sub>D</sub> в нМ T=25 °C	Людський MCSP-D3		MCSP-D3 мавп циномогус	
	Афінність	Авідність	Афінність	Авідність
M4-3(C1) ML2(G3)	1,8	0,0045	1,4	0,0038
M4-3(C1) ML2(E10)	4,6	0,0063	3,8	0,0044
M4-3(C1) ML2(C5)	1,8	0,0046	1,3	0,0044
M4-3 ML2 (батьківське)	8,6	0,0090	11,4	0,0123

#### Приклад 2

Одержання ТСВ-молекули до MCSP (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA інвертована), що містить M4-3(C1) ML2(G3), як антитіло до MCSP і гуманізованого антитіла CH2527 як антитіло до CD3

ДНК-послідовності варіабельної ділянки важкого і легкого ланцюга субклонували в рамці зчитування або з константної ділянкою важкого ланцюга, або з константної ділянкою легкого ланцюга, попередньо вбудованої в відповідний реципієнтний експресійний вектор ссавців. Експресія антитіла находилась під контролем промотору MPSV, і вектор ніс синтетичну сигнальну полі(A)-послідовність на 3'-кінці кожної CDS. Крім того, кожний вектор містив OriP-послідовність EBV.

Молекулу одержували шляхом сумісної трансфекції клітин HEK293-EBNA експресійними векторами ссавців з застосуванням поліетиленіміну (PEI). Клітини трансфектували відповідними експресійними векторами в співвідношенні 1:2:1:1 ("вектор важкого ланцюга Fc("западина")": "вектор легкого ланцюга": "вектор легкого ланцюга Crossfab": "вектор важкого ланцюга Fc("виступ")-FabCrossfab").

Для трансфекції клітини HEK293 EBNA культивували в суспензії і безсироватковому культуральному середовищі CD CHO. Для одержання в 500-мілілітрових струшувальних колбах 400 мільйонів клітин HEK293 EBNA висівали за 24 год. до трансфекції. Для трансфекції клітини центрифугували протягом 5 хв при 210 × g, супернатант заміняли 20 мл попередньо нагрітого середовища CD CHO. Експресійні вектори змішували в 20 мл середовища CD CHO до досягнення кінцевої кількості ДНК, що складає 200 мкг. Після додавання 540 мкл розчину PEI суміш інтенсивно перемішували протягом 15 з і потім інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі. Потім клітини змішували з розчином ДНК/PEI, переносили в 500-мілілітрову колбу і інкубували протягом 3 год. при 37 °C в інкубаторі в атмосфері, що містить 5 % CO<sub>2</sub>. Після періоду інкубації додавали 160 мл середовища F17 і клітини культивували протягом 24 год. Через один день після трансфекції додавали 1 мМ вальпроєву кислоту і 7 % Feed 1 (фірма Lonza). Після культивування протягом 7 днів супернатант збирали для очищення шляхом центрифугування протягом 15 хв при 210 × g, розчин стерилізували фільтрацією (фільтр 0,22 мкм), доповнювали азидом натрію до кінцевої концентрації 0,01 % (мас./об.), витримували при 4 °C.

Білки, що секретують очищали з супернатантів клітинних культур за допомогою афінної хроматографії на білку А. Супернатант вносили на колонку HiTrap ProteinA HP (CV=5 мл, фірма GE Healthcare), урівноважену 40 мл суміші, що містить 20мМ фосфат натрію, 20мМ цитрат натрію, 0,5 М хлорид натрію, pH 7,5. Незв'язаний білок видаляли відмиванням, застосовуючи рівний щонайменше 10 об'ємам колонки об'єм суміші, що містить 20 мМ фосфат натрію, 20 мМ цитрат натрію, 0,5 М хлорид натрію, pH 7,5. Потрібний білок елюювали, застосовуючи градієнт об'ємом, рівним 20 об'ємам колонки, від 20 мМ цитрату натрію, 0,5 М хлориду натрію, pH 7,5 до 20 мМ цитрату натрію, 0,5 М хлориду натрію, pH 2,5. Розчин білка нейтралізували, додаючи 1/10 0,5М фосфату натрію, pH 8. Потрібний білок концентрували і фільтрували перед внесенням на колонку HiLoad Супердекс 200 (фірма GE Healthcare), урівноважену розчином, що містять 20 мМ гістидин, 140 мМ хлорид натрію, pH 6,0.

Концентрацію білка в очищених білкових зразках визначали шляхом вимірювання оптичної щільності (ОП) при 280 нм, застосовуючи коефіцієнт молярної екстинкції, розрахований на основі амінокислотної послідовності.

Чистоту і молекулярну масу молекул аналізували за допомогою KE-ПААГ в присутності відновлювача і без нього. Застосовували систему Caliper LabChip GXII (фірма Caliper Lifescience) згідно з інструкціями виробника. Для аналізу застосовували по 2 мкг зразка.

Вміст агрегатів в зразках антитіла аналізували, застосовуючи колонку для аналітичної гель-фільтрації TSKgel G3000 SW XL (фірма Tosoh) в рухомому буфері, що містить 25 мМ  $K_2HPO_4$ , 125 мМ NaCl, 200 мМ моногідроклорид L-аргініну, 0,02 % (мас./об.)  $NaN_3$ , pH 6,7, при 25 °C.

Таблиця 4а

Узагальнення даних про одержання і очищення TCB-молекули до MCSP

Конструкція	Титр [мг/л]	Вихід [мг/л]	Кількість агрегатів після 1-ої стадії очищення [%]	HMW [%]	LMW [%]	Мономери [%]
TCB-молекула до MCSP	157	0,32	32	3,3	0	96,7

5

На фіг. 3 представлено схематичне зображення TCB-молекули до MCSP (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA інвертована).

На фіг. 4 і в таблиці 4б представлені результати KE-ДСН-аналізу TCB-молекули до MCSP (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA інвертована) (SEQ ID NO: 12, 53, 54 і 55).

10

Таблиця 4б

KE-ДСН-аналіз TCB-молекули до MCSP

	Пік	кДа	Відповідний ланцюг
TCB-молекула до MCSP, невідновлювальні умови (А)	1	206,47	
TCB-молекула до MCSP, відновлювальні умови (Б)	1	29,15	Легкий ланцюг ML2 (C1)
	2	37,39	Легкий ланцюг huCH2527
	3	66,07	Fc("западина")
	4	94,52	Fc("виступ")

### Приклад 3

Одержання TCB-молекули до CEA (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA інвертована), що містить CH1A1A 98/99 2F1 як антитіло до CEA і гуманізоване антитіло CH2527 як антитіло до CD3

15

ДНК-послідовності варіабельної ділянки важкого і легкого ланцюга субклонували в рамці зчитування або з константної ділянкою важкого ланцюга, або з константної ділянкою легкого ланцюга, попередньо вбудованої в відповідний реципієнтний експресійний вектор ссавців. Експресія антитіла находилась під контролем промотору MPSV, і вектор ніс синтетичну сигнальну полі(А)-послідовність на 3'-кінці кожної CDS. Крім того, кожний вектор містив OriP-послідовність EBV.

20

Молекулу одержували шляхом сумісної трансфекції клітин HEK293-EBNA експресійними векторами ссавців з застосуванням поліетиленіміну (ПЕІ). Клітини трансфектували відповідними експресійними векторами в співвідношенні 1:2:1:1 ("вектор важкого ланцюга Fc("западина")": "вектор легкого ланцюга": "вектор легкого ланцюга Crossfab": "вектор важкого ланцюга Fc("виступ")-FabCrossfab").

25

Для трансфекції клітини HEK293 EBNA культивували в суспензії і безсироватковому культуральному середовищі CD CHO. Для одержання в 500-мілілітрових струшувальних колбах 400 мільйонів клітин HEK293 EBNA висівали за 24 год. до трансфекції. Для трансфекції клітини центрифугували протягом 5 хв при  $210 \times g$ , супернатант заміняли 20 мл попередньо нагрітого середовища CD CHO. Експресійні вектори змішували в 20 мл середовища CD CHO до досягнення кінцевої кількості ДНК, що складає 200 мкг. Після додавання 540 мкл розчину ПЕІ суміш інтенсивно перемішували протягом 15 з і потім інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі. Потім клітини змішували з розчином ДНК/ПЕІ, переносили в 500-мілілітрову колбу і інкубували протягом 3 год. при 37 °C в інкубаторі в атмосфері, що містить 5 %  $CO_2$ . Після періоду інкубації додавали 160 мл середовища F17 і клітини культивували протягом 24 год. Через один день після трансфекції додавали 1 мМ вальпроєву кислоту і 7 % Feed 1 (фірма Lonza). Після культивування протягом 7 днів супернатант збирали для очищення шляхом центрифугування протягом 15 хв при  $210 \times g$ , розчин стерилізували фільтрацією (фільтр 0,22 мкм), доповнювали азидом натрію до кінцевої концентрації 0,01 % (мас./об.), витримували при 4 °C.

40

Білки, що секретують очищали з супернатантів клітинних культур за допомогою афінної хроматографії на білку А. Супернатант вносили на колонку HiTrap ProteinA HP (CV=5 мл, фірма GE Healthcare), урівноважену 40 мл суміші, що містить 2 0мМ фосфат натрію, 20 мМ цитрат натрію, 0,5 М хлорид натрію, рН 7,5. Незв'язаний білок видаляли відмиванням, застосовуючи рівний щонайменше 10 об'ємам колонки об'єм суміші, що містить 20 мМ фосфат натрію, 20 мМ цитрат натрію, 0,5 М хлорид натрію, рН 7,5. Потрібний білок елюювали, застосовуючи градієнт об'ємом, рівним 20 об'ємам колонки, від 20 мМ цитрату натрію, 0,5 М хлориду натрію, рН 7,5 до 20 мМ цитрату натрію, 0,5 М хлориду натрію, рН 2,5. Розчин білка нейтралізували, додаючи 1/10 0,5 М фосфату натрію, рН 8. Потрібний білок концентрували і фільтрували перед внесенням на колонку HiLoad Супердекс 200 (фірма GE Healthcare), урівноважену розчином, що містять 20 мМ гістидин, 140 мМ хлорид натрію, рН 6,0.

Концентрацію білка в очищених білкових зразках визначали шляхом вимірювання оптичної щільності (ОП) при 280 нм, застосовуючи коефіцієнт молярної екстинкції, розрахований на основі амінокислотної послідовності.

Чистоту і молекулярну масу молекул аналізували за допомогою KE-ПААГ в присутності відновлювача і без нього. Застосовували систему Caliper LabChip GXII (фірма Caliper Lifescience) згідно з інструкціями виробника. Для аналізу застосовували по 2 мкг зразка.

Вміст агрегатів в зразках антитіла аналізували, застосовуючи колонку для аналітичної гел'фільтрації TSKgel G3000 SW XL (фірма Tosoh) в рухомому буфері, що містить 25 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 125 мМ NaCl, 200 мМ моногідрохлорид L-аргініну, 0,02 % (мас./об.) NaN<sub>3</sub>, рН 6,7, при 25 °С.

Таблиця 5

## Узагальнення даних про одержання й очищення TCB-молекули до CEA

Конструкція	Титр [мг/л]	Вихід [мг/л]	Кількість агрегатів після 1-ої стадії очищення [%]	HMW [%]	LMW [%]	Мономер [%]
TCB-молекула до CEA	66	0,31	21,5	8,1	4,4	87,5

На фіг. 5 представлено схематичне зображення TCB-молекули до CEA (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA інвертована).

На фіг. 6 і в таблиці 6 представлені результати KE-ДСН-аналізу TCB-молекули до CEA (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA інвертована) (SEQ ID NO: 22, 56, 57 і 58).

Таблиця 6

## KE-ДСН-аналіз TCB-молекули до CEA

	Пік	кДа	Відповідний ланцюг
TCB-молекула до CEA невідновлювальні умови (А)	1	205,67	Правильна молекула
TCB-молекула до CEA, відновлювальні умови (В)	1	28,23	Легкий ланцюг CH1A1A 98/99 × 2F1
	2	36,31	Легкий ланцюг CH2527
	3	63,48	Fc ("западина")
	4	90,9	Fc ("виступ")

В альтернативному методі очищення TCB-молекулу до CEA "захоплювали" із зібраного і освітленого ферментаційного супернатанту з застосуванням афінної хроматографії на білку А (MabSelect SuRe). Одержаний з білка А елюат потім піддавали катіонообмінній хроматографії (Porous 50 HS) і потім фракціонували і аналізували за допомогою ГФ-ЖХВР і капілярного електрофорезу. Які містять продукт фракції об'єднували і піддавали хроматографії на основі гідрофобного взаємодії (бутил-сефароза 4FF) при кімнатній температурі, застосовуючи режим зв'язування-елювання. Потім елюат фракціонували і аналізували за допомогою ГФ-ЖХВР і капілярного електрофорезу. Які містять продукт фракції об'єднували і потім піддавали аніонообмінній хроматографії (Q-Сефароза FF), застосовуючи проточний режим. В матеріалі, одержаному з застосуванням зазначеного метода очищення, вміст мономерів складав >98 %.

## Приклад 4

Зв'язування TCB-молекули до MCSP з клітинами, що експресують MCSP і CD3

Зв'язування TCB-молекули до MCSP тестували із застосуванням експресувальної MCSP клітинної лінії людської злоякісної меланоми (A375) і експресувальної CD3 іморталізованої лінії Т-лімфоцитів (Jurkat). В цілому, метод полягав у наступному: клітини збирали, підраховували, оцінювали їх життєздатність і ресуспендували з розрахунку  $2 \times 10^6$  клітин/мл в FACS-буфері (100 мкл 3ФР, 0,1 % БСА). 100 мкл клітинної суспензії (що містить  $0,2 \times 10^6$  клітин) інкубували в круглодонному 96-лунковому планшеті протягом 30 хв при 4 °C зі збільшуваними концентраціями TCB-молекули до MCSP (2,6 пМ-200 нМ), промивали двічі холодним 3ФР, 0,1 % БСА, повторно інкубували протягом ще 30 хв при 4 °C з кон'югованим з PE F(ab'')<sub>2</sub>-фрагментом козячого антилюдського IgG Fcγ-фрагментспецифічного AffiniPure як вторинного антитіла (фірма Jackson Immuno Research Lab PE № 109-116-170), промивали двічі холодним 3ФР, 0,1 % БСА і негайно аналізували за допомогою FACS з застосуванням пристрою FACS Cantoll (програма FACS Diva) шляхом установки дискримінаційного вікна на живі, DAPI-негативні клітини. Криві зв'язування одержували за допомогою програми GraphPadPrism5 (фіг. 7А, зв'язування з А375-клітинами, EC<sub>50</sub>=3381 пМ; фіг. 7Б, зв'язування з клітинами лінії Jurkat).

#### Приклад 5

Т-клітинний цитоліз, індукований TCB-антитілом до MCSP

Т-клітинний цитоліз, індукований TCB-антитілом до MCSP, оцінювали, застосовуючи панель пухлинних клітинних ліній, що експресують різні рівні MCSP (A375 = високий рівень MCSP, MV-3 = середній рівень MCSP, НСТ-116 = низький рівень MCSP, LS180=MCSP-негативна лінія). В цілому, метод полягав у наступному: клітини-мішені збирали за допомогою трипсину/ЕДТК, промивали і висівали з густиною 25000 клітин/лунку, застосовуючи круглодонні 96-лункові планшети. Клітинам давали закріпитися протягом ночі. Мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) одержували шляхом центрифугування в градієнті щільності Histopaque збагачених лімфоцитами препаратів (лейкоцитарні плівки), взятих у здорових донорів. Свіжу кров розводили стерильним 3ФР і нашаровували на градієнт Histopaque (фірма Sigma, № H8889). Після центрифугування (450 × g, 30 хв, кімнатна температура), плазму, яка знаходиться над інтерфазою, що містить PBMC, відкидали і PBMC переносили в нову фальконівську пробірку, яку потім заповнювали 50 мл 3ФР. Суміш центрифугували (400 × g, 10 хв, кімнатна температура), супернатант відкидали і дебрис PBMC промивали двічі стерильним 3ФР (стадії центрифугування при 350 × g, 10 хв). Здійснювали автоматичний підрахунок популяції PBMC (пристрій ViCell) і зберігали її в середовищі RPMI1640, що містить 10 % FCS і 1 % L-аланіл-L-глутаміну (фірма Biochrom, K0302) при 37 °C, в атмосфері, що містить 5 % CO<sub>2</sub>, в інкубаторі для клітин аж до подальшого використання (не більше 24 год.). Для аналізу цитолізу додавали антитіло в зазначених концентраціях (діапазон 1 пМ-10 нМ в трьох повтореннях). PBMC додавали до клітинам-мішеням при кінцевому співвідношенні ефекторних клітин і клітин-мішеней (Е:Т), що дорівнює 10:1. Цитоліз клітин-мішеней оцінювали після інкубації протягом 24 год. при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> шляхом кількісного оцінювання вивільнення ЛДГ в клітинні супернатанти клітин на стадії апоптозу/некрозу (набір для детекції ЛДГ (LDH detection kit), фірма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Максимальний лізис клітин-мішеней (= 100 %) був досягнутий шляхом інкубації клітин-мішеней з 1 % Тритон Х-100. Мінімальний лізис (= 0 %) відповідав сумісній інкубації клітин-мішеней з ефекторними клітинами без біспецифічної конструкції. Результати продемонстрували, що TCB-молекула до MCSP індукувала сильний і специфічний для мішені лізис MCSP-позитивних клітин-мішеней, не знижуючи при цьому MCSP-негативні клітинні лінії (фіг. 8А-Г). Величини EC<sub>50</sub>, одержані в аналізі цитолізу, розраховані за допомогою програми GraphPadPrism5, представлені в таблиці 7.

Таблиця 7

Величини EC<sub>50</sub> (пМ), що характеризують опосередкований Т-клітинами цитоліз пухлинних клітин, що експресують MCSP, індукований TCB-антитілом до MCSP

Клітинна лінія	Кількість копій MCSP-рецептора	EC <sub>50</sub> [пМ]
A375	387 058	12,3
MV-3	260 000	9,4
НСТ-116	36770	3,7
LS180	Негативна лінія	n.d.

#### Приклад 6

Підвищувальна регуляція CD25 і CD69 на ефекторних CD8<sup>+</sup> і CD4<sup>+</sup>-клітинах після Т-клітинного цитолізу пухлинних клітин, що експресують MCSP, індукованого TCB-антитілом до

## MCSP

Активацию CD8<sup>+</sup>- і CD4<sup>+</sup>-Т-клітин після Т-клітинного цитолізу що експресують MCSP пухлинних клітин лінії MV-3, опосередкованого TCB-антитілом до MCSP, оцінювали за допомогою FACS-аналізу, застосовуючи антитіла, які розпізнають маркери Т-клітинної активації, такі як CD25 (пізній маркер активації) і CD69 (ранній маркер активації). Антитіло і умови аналізу цитолізу відповідали описаним вище (приклад 5), при цьому застосовували такий самий діапазон концентрацій антитіла (1 пМ-10 нМ в трьох повтореннях), співвідношення Е:Т 10:1 і тривалість інкубації, що складала 24 год.

Після інкубації PBMC переносили в круглодонний 96-луночний планшет, центрифугували при 350 × g протягом 5 хв і промивали двічі ЗФР, що містять 0,1 % БСА. Зафарбовування поверхні у відношенні CD8 (ФІТЦ, антитіло до людського CD8, фірма BD, № 555634), CD4 (PECy7, антитіло до людського CD4, фірма BD, № 557852), CD69 (PE, антитіло до людського CD69, фірма Biolegend, № 310906) і CD25 (APC, антитіло до людського CD25, фірма BD, № 555434) здійснювали згідно з рекомендаціями постачальника. Клітини промивали двічі, застосовуючи 150 мкл/лунку ЗФР, що містить 0,1 % БСА, і фіксували протягом 15 хв при 4 °С, застосовуючи 100 мкл/лунку фіксувального буфера (фірма BD, № 554655). Після центрифугування зразки ресуспендували в 200 мкл/лунку ЗФР, 0,1 % БСА, який містив DAPI для виключення мертвих клітин при FACS-аналізі. Зразки аналізували за допомогою пристрою фірми BD FACS Fortessa. Результати свідчили про те, що TCB-антитіло до MCSP індукувало сильну і мішеньспецифічну підвищувальну регуляцію маркерів активації (CD25, CD69) на CD8<sup>+</sup>-Т-клітинах (фіг. 9А, Б) і CD4<sup>+</sup>-Т-клітинах (фіг. 9В, Г) після цитолізу.

## Приклад 7

Секреція цитокінів людськими ефекторними клітинами після Т-клітинного цитолізу пухлинних клітин, що експресують MCSP, індукованого TCB-антитілом до MCSP

Секрецію цитокінів людськими PBMC після Т-клітинного цитолізу що експресують MCSP пухлинних клітин лінії MV-3, індукованого TCB-антитілом до MCSP, оцінювали за допомогою FACS-аналізу клітинних супернатантів після аналізу цитолізу.

Застосовували то же антитіло і аналіз цитолізу здійснювали практично згідно з описаному вище методу (приклад 5 і 6), застосовуючи співвідношення Е:Т 10:1 і тривалість інкубації 24 год.

В кінці періоду інкубації планшет центрифугували протягом 5 хв при 350 × g, супернатант переносили в новий 96-луночний планшет і зберігали при -20 °С до наступного аналізу. Гранзим В, TNFα, IFN-γ, IL-2, IL-4 і IL-10, які секретують в клітинні супернатанти, визначали за допомогою CBA-аналізу (цитометричний аналіз з застосуванням набору гранул) BD® CBA Human Soluble Protein Flex Set, згідно з інструкціями виробника, застосовуючи пристрій FACS Cantoll. Застосовували наступні набори: набір фірми BD для CBA-аналізу людського гранзиму В (BD CBA human Granzyme B Flex Set, № BD 560304); для людського TNF (BD CBA human Flex Set, № BD 558273); для людського IFN-γ (BD CBA human IFN-γ Flex Set, № BD 558269); для людського IL-2 (BD CBA human IL-2 Flex Set, № BD 558270); для людського IL-4 (BD CBA human IL-4 Flex Set, № BD 558272); для людського IL-10 (BD CBA human IL-10 Flex Set, № BD 558274).

Результати продемонстрували, що TCB-антитіло до MCSP індукувало секрецію IL-2, IFN-γ, TNFα, гранзиму В і IL-10 (але не IL-4) після цитолізу (фіг. 10А-Е).

В поєднанні ці приклади продемонстрували, що біспецифічне антитіло до MCSP-CD3

- характеризувалось гарним зв'язуванням з MCSP-позитивними A375-клітинами,
- індукувало сильний і мішеньспецифічний цитоліз MCSP-позитивних ліній клітин-мішеней і не індукувало цитоліз MCSP-негативних клітинних ліній,
- індукувало сильну й мішеньспецифічну підвищувальну регуляцію маркерів активації (CD25, CD69) на CD8<sup>+</sup>- і CD4<sup>+</sup>-Т-клітинах після цитолізу,
- індукувало секрецію IL-2, IFN-γ, TNFα, гранзиму В і IL-10 (але не IL-4) при цитолізі.

## Приклад 8

Зв'язування TCB-молекули до CEA з клітинами, що експресують CEA і CD3

Зв'язування TCB-молекули до CEA тестували з застосуванням трансфектованих клітин, що експресують CEA аденокарциноми легені (A549-huCEA) і що експресують CD3 іморталізованих ліній Т-лімфоцитів людини і мавп циномолгус (Jurkat і HSC-F відповідно). Як контролю застосовували "непрямовану" TCB-молекулу (SEQ ID NO: 59, 60, 61 і 62; див. приклад 24). В цілому, метод полягав у наступному: клітини збирали, підраховували, оцінювали їх життєздатність і ресуспендували з розрахунку  $2 \times 10^6$  клітин/мл в FACS-буфері (100 мкл ЗФР, 0,1 % БСА). 100 мкл клітинної суспензії (що містить  $0,2 \times 10^6$  клітин) інкубували в круглодонному 96-луноковому планшеті протягом 30 хв при 4 °С з збільшуваними концентраціями TCB-молекули до CEA (61 пМ-1000 нМ), промивали двічі холодним ЗФР, 0,1 % БСА, повторно інкубували протягом ще 30 хв при 4 °С з кон'югованим з ФІТЦ F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом козячого антилюдського

IgG Fcy-фрагментспецифічного AffiniPure як вторинного антитіла (фірма Jackson Immuno Research Lab FITC, № 109-096-097), промивали двічі холодним ЗФР, 0,1 % БСА і негійно аналізували за допомогою FACS з застосуванням пристрою FACS Cantoll (програма FACS Diva) шляхом установки дискримінаційного вікна на живі PI-негативні клітини. Криві зв'язування одержували за допомогою програми GraphPadPrism5 (фіг. 11А, зв'язування з А549-клітинами (EC<sub>50</sub> 6,6 нМ); на фіг. 11Б, зв'язування з клітинами Jurkat; фіг. 11В, зв'язування з клітинами HSC-F).

#### Приклад 9

Опосередкований Т-клітинами цитоліз пухлинних клітин-мішеней, що експресують СЕА, індукований ТСВ-антитілом до СЕА

Опосередкований Т-клітинами цитоліз клітин-мішеней, що індукується ТСВ-антитілом до СЕА, оцінювали з застосуванням людських пухлинних клітин ліній HPAFII (високий рівень СЕА), ВхРС-3 (середній рівень СЕА) і ASPC-1 (низький рівень СЕА). Як негативні контролю застосовували НСТ-116 (СЕА-негативна лінія пухлинних клітин) і "неспрямовану" ТСВ-молекулу. Людські РВМС застосовували як ефекторних клітин і цитоліз оцінювали через 24 год. і 48 год. після інкубації з біспецифічним антитілом. В цілому, метод полягав у наступному: клітини-мішені збирали за допомогою трипсину/ЕДТК, промивали і висівали з густиною 25000 клітин/лунку, застосовуючи круглодонні 96-луночні планшети. Клітинам давали закріпитися протягом ночі. Мононуклеарні клітини периферійної крові (РВМС) одержували шляхом центрифугування в градієнті щільності Histopaque збагачених лімфоцитами препаратів (лейкоцитарні плівки), взятих у здорових донорів. Свіжу кров розводили стерильним ЗФР і нашаровували на градієнт Histopaque (фірма Sigma, № H8889). Після центрифугування (450 × g, 30 хв, кімнатна температура), плазму, яка знаходиться над інтерфазою, що містить РВМС, відкидали і РВМС переносили в нову фальконівську пробірку, яку потім заповнювали 50 мл ЗФР. Суміш центрифугували (400 × g, 10 хв, кімнатна температура), супернатант відкидали і дебрис РВМС промивали двічі стерильним ЗФР (стадії центрифугування при 350 × g, 10 хв). Здійснювали автоматичний підрахунок популяції РВМС (пристрій ViCell) і зберігали її в середовищі RPMI1640, що містить 10 % FCS і 1 % L-аланін-L-глутаміну (фірма Biochrom, K0302) (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) в інкубаторі для клітин аж до подальшого використання (не більше 24 год.). Для аналізу цитолізу додавали антитіла в зазначених концентраціях (діапазон 6 пМ-100 нМ в трьох повтореннях). РВМС додавали до клітинам-мішеням при кінцевому співвідношенні ефекторних клітин і клітин-мішеней (Е:Т) 10:1. Цитоліз клітин-мішеней оцінювали після інкубації протягом 24 год. і 48 год. шляхом кількісного оцінювання вивільнення ЛДГ (лактатдегідрогеназа) в клітинні супернатанти клітин на стадії апоптозу/некрозу (набір для детекції ЛДГ (LDH detection kit), фірма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Максимальний лізис клітин-мішеней (= 100 %) був досягнутий шляхом інкубації клітин-мішеней з 1 % Тритон X-100. Мінімальний лізис (= 0 %) відповідав сумісній інкубації клітин-мішеней з ефекторними клітинами без біспецифічної конструкції. Результати продемонстрували, що ТСВ-молекула до СЕА індукувала сильний і специфічний для мішені цитоліз СЕА-позитивних клітин-мішеней (фіг. 12А-3). Величини EC<sub>50</sub>, одержані в аналізі цитолізу, розраховані за допомогою програми GraphPadPrism5, представлені в таблиці 8.

Таблиця 8

Кількість копій СЕА-рецептора і величини EC<sub>50</sub> (пМ), що характеризують опосередкований Т-клітинами цитоліз пухлинних клітин, що експресують СЕА, індукований ТСВ-антитілом до СЕА

Клітинна лінія	Кількість копій СЕА-рецептора	EC <sub>50</sub> [пМ], 48 год.
HPAFII	120 000-205 000	667
ВхРС-3	41 000	3785
ASPC1	3500-8000	846

#### Приклад 10

Проліферація і активація Т-клітин через 5 днів після опосередкованого ТСВ-молекулою до СЕА цитолізу пухлинних клітин-мішеней, що експресують СЕА

Активацію і проліферацію Т-клітин оцінювали через 5 днів після опосередкованого ТСВ-молекулою до СЕА цитолізу що експресують СЕА пухлинних клітин-мішеней, таких як HPAFII (високий рівень СЕА), ВхРС-3 (середній рівень СЕА) і ASPC-1 (низький рівень СЕА). Як негативні контролю застосовували НСТ-116 (СЕА-негативна лінія пухлинних клітин) і "неспрямовану" ТСВ-молекулу. Експериментальні умови для аналізу проліферації були такими

же, що і описані в прикладі 9, за исключением того, що на лунку круглодонного 96-луночного планшета висівали тільки по 10000 клітин-мішеней. Для оцінювання проліферації Т-клітин свіжовиділені PBMC мітили з застосуванням CFSE (фірма Sigma, № 1888). В цілому, метод полягав у наступному: маточний розчин CFSE розводили з одержанням робочого розчину з концентрацією 100 мкМ.  $90 \times 10^6$  PBMC-клітин ресуспендували в 90 мл попередньо нагрітого ЗФР і доповнювали 90 мкл робочого розчину CFSE. Клітини негайно перемішували і інкубували протягом 15 хв при 37 °С. К клітинам додавали 10 мл попередньо нагрітого FCS для припинення реакції. Клітини центрифугували протягом 10 хв при 400 g, ресуспендували в 50 мл середовища й інкубували протягом 30 хв при 37 °С. Після інкубації клітини промивали однократно теплим середовищем, підраховували, ресуспендували в середовищі й додавали до клітинам-мішеням для аналізу цитолізу і наступного вимірювання проліферації і активації клітин при Е:Т, що складає 10:1. Проліферацію оцінювали через 5 днів після цитолізу у відношенні CD4<sup>+</sup>- і CD8<sup>+</sup>-позитивних Т-клітин шляхом кількісного оцінювання розведення красителя CFSE. Експресію CD25 оцінювали з застосуванням таких же субпопуляцій Т-клітин, застосовуючи антитіло до людського CD25. В цілому, метод полягав у наступному: після центрифугування ( $400 \times g$  протягом 4 хв) клітини ресуспендували, промивали FACS-буфером і інкубували з 25 мкл розведеної суміші антитіл до CD4/CD8/CD25 протягом 30 хв при 4 °С (кон'юговане з APC/Cy7 антитіло до людського CD4, № 317418, кон'юговане з APC антитіло до людського CD8, № 301014, кон'юговане з PE/Cy7 антитіло до людського CD25, № 302612). Потім клітини промивали тричі для видалення незв'язаних антитіл і, наприкінці, ресуспендували в 200 мкл FACS-буфера, що містить йодид пропідію (PI), для виключення мертвих клітин для FACS-оцінювання. Флуоресценцію вимірювали з застосуванням пристрою фірми BD FACS Cantoll. Результати продемонстрували, що ТСВ-молекула до СЕА індукувала сильну і мішеньспецифічну проліферацію CD8<sup>+</sup>- і CD4<sup>+</sup>-Т-клітин (фіг. 13А-Г), а також їх активацію, що встановлено по підвищувальній регуляції маркера активації CD25 (фіг. 13Д-З).

#### Приклад 11

Секреція цитокінів людськими ефекторними клітинами після опосередкованого Т-клітинами цитолізу пухлинних клітин, що експресують СЕА, індукованого ТСВ-антитілом до СЕА

Секрецію цитокінів людськими PBMC після опосередкованого Т-клітинами цитолізу що експресують СЕА пухлинних клітин лінії MKN45, індукованого ТСВ-антитілом до СЕА, оцінювали за допомогою FACS-аналізу (СВА-набір) клітинних супернатантів після аналізу цитолізу.

Експериментальні умови були ідентичними з описаними в прикладі 9. В кінці періоду інкубації планшет центрифугували протягом 5 хв при  $350 \times g$ , супернатант переносили в новий 96-луночний планшет і зберігали при -20 °С до наступного аналізу. Секретувальні в клітинні супернатанти (А) IFN- $\gamma$ , (Б) TNF $\alpha$ , (В) гранзим В, (Г) IL-2, (Д) IL-6 і (Е) IL-10 виявляли, застосовуючи систему BD<sup>®</sup> CBA Human Soluble Protein Flex Set, згідно з інструкціями виробника за допомогою пристрою FACS Cantoll. Застосовували наступні набори: BD CBA human IL-2 BD Flex Set, № BD 558270; BD CBA human granzyme B BD Flex Set, № BD 560304; BD CBA human TNF Flex Set, № BD 558273; BD CBA human IFN- $\gamma$  Flex Set, № BD 558269; BD CBA human IL-4 Flex Set, № BD 558272; BD CBA human IL-10 Flex Set, № BD 558274.

Результати продемонстрували, що опосередкований ТСВ-антитілом до СЕА цитоліз (але не цитоліз, опосередкований контрольною "неспрямованою" ТСВ-молекулою), індукував секрецію IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , гранзиму В, IL-2, IL-6 і IL-10 (фіг. 14А-Е).

#### Приклад 12

Опосередкований Т-клітинами цитоліз клітин-мішеней в присутності збільшуваних концентрацій СЕА, що секретується (sCEA)

Оцінювали опосередкований Т-клітинами цитоліз пухлинних клітин-мішеней (LS180), що експресують СЕА, індукований ТСВ-антитілом до СЕА, в присутності збільшуваних концентрацій СЕА, що секретується (sCEA, 2,5 нг/мл-5 мкг/мл). Людські PBMC застосовували як ефекторних клітин і цитоліз оцінювали через 24 год. і 48 год. після інкубації з біспецифічним антитілом і sCEA. В цілому, метод полягав у наступному: клітини-мішені збирали за допомогою трипсину/ЕДТК, промивали і висівали з густиною 25000 клітин/лунку, застосовуючи круглодонні 96-луночні планшети. Клітинам давали закріпитися протягом ночі. Мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) одержували шляхом центрифугування в градієнті щільності Histopaque збагачених лімфоцитами препаратів (лейкоцитарні плівки), взятих у здорових донорів. Свіжу кров розводили стерильним ЗФР і нашаровували на градієнт Histopaque (фірма Sigma, № H8889). Після центрифугування ( $450 \times g$ , 30 хв, кімнатна температура), плазму, яка знаходиться над інтерфазою, що містить PBMC, відкидали і PBMC переносили в нову фальконівську пробірку, яку потім заповнювали 50 мл ЗФР. Суміш центрифугували ( $400 \times g$ , 10 хв, кімнатна температура), супернатант відкидали і дебрис PBMC промивали двічі стерильним



ЗФР (стадії центрифугування при 350 × g, 10 хв). Здійснювали автоматичний підрахунок популяції PBMC (пристрій ViCell) і зберігали її в середовищі RPMI1640, що містить 10 % FCS і 1 % L-аланін-L-глутаміну (фірма Biochrom, K0302) (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) в інкубаторі для клітин аж до подальшого використання (не більше 24 год.). Для аналізу цитолізу застосовували TCB-антитіло до CEA у фіксованій концентрації 1нМ і sCEA застосовували в експерименте в діапазоні концентрацій від 2,5 нг до 5 мкг/мл. PBMC додавали до клітинам-мішеням при кінцевому співвідношенні ефекторних клітин і клітин-мішеней (Е:Т) 10:1. Цитоліз клітин-мішеней оцінювали після інкубації протягом 24 год. і 48 год. шляхом кількісного оцінювання вивільнення ЛДГ (лактатдегідрогеназа) в клітинні супернатанти клітин на стадії апоптозу/некрозу (набір для детекції ЛДГ (LDH detection kit, фірма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Максимальний лізис клітин-мішеней (= 100 %) був досягнутий шляхом інкубації клітин-мішеней з 1 % Тритон Х-100. Мінімальний лізис (= 0 %) відповідав сумісній інкубації клітин-мішеней з ефекторними клітинами без биспецифічного антитіла. Цитоліз, опосередкований TCB-антитілом до CEA за відсутності sCEA, приймали за 100 % і цитоліз, виявлений в присутності збільшуваних концентрацій sCEA стандартизували відносно цього параметра. Результати продемонстрували, що sCEA мав лише незначний вплив на опосередкований TCB-антитілом до CEA цитоліз що експресують CEA клітин-мішеней (фіг. 15А, Б). Ніякого впливу на Т-клітинний цитоліз не виявлено при концентраціях sCEA аж до 0,2 мкг/мл. При застосуванні sCEA в концентраціях, що перевищують 0,2 мкг/мл, виявлено лише слабкий вплив на загальний цитоліз (зниження на 10-50 %).

#### Приклад 13

Опосередкований Т-клітинами цитоліз клітин-мішеней з застосуванням PBMC людини і мавп циномогус як ефекторних клітин

Оцінювали опосередкований Т-клітинами цитоліз клітин лінії A549 (аденокарцинома легені), що надекспресують людський CEA (A549-hCEA), через 21 год. і 40 год. після інкубації з TCB-антитілом до CEA і PBMC людини або PBMC мавп циномогус як ефекторних клітин. В цілому, метод полягав у наступному: клітини-мішені збирали за допомогою трипсину/ЕДТК, промивали і висівали з густиною 25000 клітин/лунку, застосовуючи круглодонні 96-луночні планшети. Клітинам давали закріпитися протягом декількох годин. Мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) одержували шляхом центрифугування в градієнті щільності Histopaque збагачених лімфоцитами препаратів (лейкоцитарні плівки), взятих у здорових донорів або здорових мавп циномогус. В останньому випадку застосовували градієнт щільності 90 % Histopaque-ЗФР. Свежую кров розводили стерильним ЗФР і нашаровували на градієнт Histopaque (фірма Sigma, № H8889). Після центрифугування (450 × g, 30 хв, кімнатна температура для людських PBMC, відповідно 520 × g, 30 хв, кімнатна температура для PBMC мавп циномогус), плазму, що знаходиться над інтерфазою, що містить PBMC, відкидали і PBMC переносили в нову фальконівську пробірку, яку потім заповнювали 50 мл ЗФР. Суміш центрифугували (400 × g, 10 хв, кімнатна температура), супернатант відкидали і дебрис PBMC промивали двічі стерильним ЗФР (стадії центрифугування при 350 × g, 10 хв). Для одержання PBMC мавп циномогус здійснювали додаткову стадію низькошвидкісного центрифугування при 150 × g протягом 15 хв. Здійснювали автоматичний підрахунок популяції PBMC (пристрій ViCell) і зберігали її в середовищі RPMI1640, що містить 10 % FCS і 1 % L-аланін-L-глутаміну (фірма Biochrom, K0302) (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) в інкубаторі для клітин аж до подальшого використання (аж до 4 год.). Для аналізу цитолізу додавали антитіла в зазначених концентраціях (діапазон 6 пМ-100 нМ в трьох повтореннях). PBMC додавали до клітинам-мішеням при кінцевому співвідношенні ефекторних клітин і клітин-мішеней Е:Т 10:1. Цитоліз клітин-мішеней оцінювали після інкубації протягом 21 год. і 40 год. шляхом кількісного оцінювання вивільнення ЛДГ (лактатдегідрогеназа) в клітинні супернатанти клітин на стадії апоптозу/некрозу (набір для детекції ЛДГ (LDH detection kit), фірма Roche Applied Science, №11 644 793 001). Максимальний лізис клітин-мішеней (= 100 %) був досягнутий шляхом інкубації клітин-мішеней з 1 % Тритон Х-100. Мінімальний лізис (= 0 %) відповідав сумісній інкубації клітин-мішеней з ефекторними клітинами без биспецифічного антитіла. Результати продемонстрували, що TCB-молекула до CEA індукувала специфічний для мішені цитоліз CEA-позитивних клітин-мішеней при застосуванні як ефекторних клітин (PBMC) як клітин людини (фіг. 16А, Б), так і клітин мавп циномогус (фіг. 16Б, Г). Величини EC<sub>50</sub>, одержані при аналізі цитолізу через 40 год., розраховані за допомогою програми GraphPadPrism5, складали 306 пМ для PBMC людини і 102 пМ для PBMC мавп циномогус.

#### Приклад 14

Опосередкований Т-клітинами цитоліз людських клітинних ліній, що експресують CEA колоректального раку, індукований TCB-антитілом до CEA

Оцінювали опосередкований Т-клітинами цитоліз що експресують СЕА людських клітинних ліній колоректального раку через 48 год. після інкубації з людськими РВМС і ТСВ-антитілом до СЕА в концентрації 0,8 нМ, 4 нМ і 20 нМ. В цілому, метод полягав у наступному: РВМС виділяли з лейкоцитів конусів, одержаних з індивідуальних здорових донорів. Клітини розводили 3ФР (1:10) і нашаровували на Lymphorger в 50-мілілітрових фальконівських пробірках. Після центрифугування (1800 об/хв протягом 25 хв), шар РВМС відокремлювали від інтерфазу і промивали 4 рази 3ФР. РВМС підраховували, заморожували в 10 % ДМСО в FCS в умовах заморожування з контрольованою швидкістю з розрахунку  $40 \times 10^6$  клітин/мл і зберігали в жидком азоті аж до подальшого використання. Для аналізу Т-клітинного цитолізу пухлинні клітини висівали в 96-луночні планшети безпосередньо з заморожених маточних розчинів. Клітини швидко нагрівали і негайно переносили в попередньо нагріте середовище, центрифугували і ресуспендували у повному середовищі (середовище DMEM, Ісков або RPMI-1640, все доповнені 10 % FCS і 1 % пеніциліну/стрептоміцину) і висівали з густиною  $2,5 \times 10^4$  клітин/лунку. Потім планшети інкубували при 37 °C у вологій камері в атмосфері 10 % CO<sub>2</sub> і наступного дня середовище заміняли на 100 мкл RPMI, 2 % FCS з 1 % глутаміну і 50 мкл ТСВ-молекули до СЕА (діапазон кінцевих концентрацій від 6,4 до 20000 пМ, стадії титрування 1:5, лунки в двох повтореннях для кожного стану). Для аналізу застосовували свіже відтаювані РВМС (відтаювання із заморожених пляшок протягом 2 год. від початку аналізу), і 50 мкл ( $3 \times 10^5$ ) додавали в кожну лунку з одержанням співвідношення: ефекторні клітини:клітини-мішені (Е:Т), рівного 10:1. Додавали Тритон Х100 (50 мкл, 4 %) до 150 мкл клітин-мішеней з одержанням величин максимального вивільнення. Планшети інкубували при 37 °C протягом 48 год., і визначали цитолітичну активність за допомогою набору для детекції цитотоксичності за допомогою лактатдегідрогенази (Lactose Dehydrogenase Cytotoxicity Detection Kit) (фірма Roche) згідно з інструкціями виробника. Процент специфічного клітинного лізису розраховували як [вивільнення із зразка - спонтанне вивільнення]/[максимальне вивільнення – спонтанне вивільнення] × 100. На фіг. 17А-В продемонстрована кореляція між експресією СЕА (кількість копій рецептора розраховували за допомогою набору QIFIKIT, див. нижче) і % цитолізу для 31 клітинної лінії колоректального раку (зазначені на осі x). На фіг. 17Г продемонстрована кореляція між експресією СЕА і % специфічного лізису при застосуванні ТСВ-антитіла до СЕА в концентрації 20 нМ (кореляція Спірмена = 0,7289,  $p < 0,0001$ ,  $n=31$ ), що свідчить про те, що пухлинні клітини, що експонують велику кількість копій СЕА-рецептора (>50000), піддавали ефективному лізису при застосуванні ТСВ-антитіла до СЕА, в то час як група клітин, що експонують малу кількість копій СЕА-рецептора (<10000), не лізували при застосуванні ТСВ-антитіла до СЕА в таких же експериментальних умовах. На фіг. 17Д продемонстрована кореляція між рівнем експресії СЕА і величиною EC<sub>50</sub> ТСВ-антитіла до СЕА. Хоча кореляція виявилась статистично незначною (коефіцієнт кореляції Спірмена = -0,3994,  $p=0,1006$ ,  $R^2=0,1358$ ), на графіку чітко видна тенденція до підвищення активності ТСВ-антитіла до СЕА (тобто більше низькі величини EC<sub>50</sub>) при застосуванні ліній пухлинних клітин, що експресують велику кількість копій СЕА-рецепторів.

Для аналізу експресії СЕА на поверхні клітин ракових клітин застосовували набір Qifikit (фірма DakoCytomation, Глоstrup, Данія) для калібрування флуоресцентних сигналів і визначення кількості сайтів зв'язування на клітину. Клітини інкубували на льоді протягом 30 хв з мишачим моноклональним антитілом до людського CEACAM5 (0,5 мкг на  $5 \times 10^5$  клітин, клон: CI-P83-1, sc-23928, Santa Cruz), промивали двічі 3ФР1×-BCA 0,1 % з наступною інкубацією протягом 45 хв з поліклональним кон'югованим з флуоресцеїнізтіюціанатом козячим антимишачим антитілом, що входить в набір Qifikit. Мертві клітини виключали з аналізу, застосовуючи зафарбовування 4',6-діамидино-2-фениліндолом (DAPI). Зразки аналізували за допомогою аналізатора CyAn™ ADP (фірма Beckman Coulter). Одержували все дані про середніх інтенсивностях флуоресценції (MFI) після аналізу даних за допомогою програми Summit 4.3. Зазначені MFI застосовували для визначення відносної кількості антитілозв'язувальних сайтів на клітинних лініях (результати представлені у вигляді кількості копій СЕА), застосовуючи рівняння, одержане на основі калібрувальної кривої (калібрувальні гранули з набору Qifikit).

Лінії клітин колоректального раку, застосовні для аналізів Т-клітинного цитолізу і кількісного оцінювання поверхневої експресії СЕА, висівали з кріофлаконів. Метод, застосовний для підтримання замороженого маточного розчину, описаний у Bracht з співавторами (Bracht та інш., Br J Cancer 103, 2010, сс. 340-346).

#### Приклад 15

Протипухлинна ефективність in vivo ТСВ-молекули до СЕА у відношенні лінії людської карциноми ободової кишки LS174T-fluc2, сумісно трансплантованою з людськими РВМС

(співвідношення Е:Т 5:1)

Мишам лінії NOG (NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma$ null) (n=12) ін'єктували підшкірно  $1 \times 10^6$  клітин LS174T-fluc2, попередньо змішаних з людськими РВМС в загальному об'ємі 100 мкл в ЗФР, співвідношення Е:Т складало 5:1. Клітини лінії LS174T-fluc2 були сконструйовані так, що вони експресували люциферазу, що дозволяло здійснювати моніторинг розвитку пухлини на основі біоломінесценції (BLI) неінвазивним і високочутливим методом. Для оцінювання ранніх і відкладених впливів лікування мишам вводили два рази в тиждень шляхом i.v.-ін'єкцій або 0,5, або 2,5 мг/кг ТСВ-молекули до СЕА, починаючи з дня 1 (рання стадія лікування) або дня 7 (відкладена стадія лікування) після сумісної s.c.-трансплантації пухлинних клітин/РВМС. Як контроль однієї групи мишей вводили два рази в тиждень шляхом i.v.-ін'єкцій 2,5 мг/кг контрольної ТСВ-молекули, яка мала такий самий формат, що і ТСВ-молекула до СЕА (в даному випадку ТСВ-молекула до MCSP, яка служила як "неспрямованого" контролю, оскільки клітини LS174T-fluc2 не експресують MCSP), а додатковій контрольній групі вводили тільки ЗФР (наповнювач), починаючи з дня 1. Об'єм пухлин вимірювали раз в тиждень за допомогою цифрового кронциркуля. крім того, мишам ін'єктували i.p. один раз в тиждень D-люциферин і емісію біоломінісцентного світла живими пухлинними клітинами вимірювали за допомогою пристрою IVIS Spectrum (фірма Perkin Elmer). Обробку продовжували аж до 19 днів після інокуляції пухлинних клітин, що відповідало дню закінчення дослідження. Результати експерименту представлені на фіг. 18А-Г. Результати представлені у вигляді середнього значення і СКО об'ємів пухлин 12 мишей, виміряних кронциркулем (А і В) і виміряних на основі біоломінесценції (інтегральний потік, Б і Г) в різних досліджуваних групах ((А, Б) рання стадія лікування, (В, Г) відкладена стадія лікування).

#### Приклад 16

Протипухлинна ефективність in vivo ТСВ-молекули до СЕА у відношенні лінії людської карциноми ободової кишки LS174T-fluc2, сумісно трансплантованої з людськими РВМС (співвідношення Е:Т 1:1)

Мишам лінії NOG (NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma$ null) (n=10) ін'єктували підшкірно  $1 \times 10^6$  клітин LS174T-fluc2 (див. приклад 15), попередньо змішаних з людськими РВМС в загальному об'ємі 100 мкл в ЗФР, співвідношення Е:Т складало 1:1. Для оцінювання ранніх і відкладених впливів лікування мишам вводили два рази в тиждень шляхом i.v.-ін'єкцій або 2,5 мкг ТСВ-молекули до СЕА, починаючи з дня 1 (рання стадія лікування) або дня 7 (відкладена стадія лікування) після інокуляції пухлинних клітин. Як контроль одній групі мишей вводили два рази в тиждень шляхом i.v.-ін'єкцій 2,5 мг/кг контрольної ТСВ-молекули (див. приклад 15), а додатковій контрольній групі вводили тільки ЗФР (наповнювач), починаючи з дня 1. Об'єм пухлин вимірювали раз в тиждень за допомогою цифрового кронциркуля. крім того, мишам ін'єктували i.p. один раз в тиждень D-люциферин і емісію біоломінісцентного світла живими пухлинними клітинами вимірювали за допомогою пристрою IVIS Spectrum (фірма Perkin Elmer). Обробку продовжували аж до 23 днів після інокуляції пухлинних клітин, що відповідало дню закінчення дослідження. Результати експерименту представлені на фіг. 19А-Г. Результати представлені у вигляді середнього значення і СКО об'ємів пухлин, виміряних кронциркулем (А) і виміряних на основі біоломінесценції (Б) в різних досліджуваних групах (n=10).

#### Приклад 17

Ефективність in vivo мишачизованої ТСВ-молекули до СЕА у відношенні лінії Panco2-huCEA, установлена із застосуванням ортотопічної моделі пухлини на імунокомпетентних трансгенних мишах huCD3 $\epsilon$ /huCEA

Трансгенним мишам лінії huCD3 $\epsilon$ /huCEA (n=10) вводили шляхом ін'єкції в підшлункову залозу  $2 \times 10^5$  клітин лінії Panco2-huCEA в загальному об'ємі 10 мкл в ЗФР. Оскільки мишачі клітини не експресували СЕА, лінії клітин мишачої карциноми підшлункової залози конструювали так, що вони надекспресували людський СЕА як антигену-мішені для ТСВ-молекули до СЕА. Мишам ін'єктували двічі в тиждень i.v. 0,5 мг/кг мишачизованої ТСВ-молекули до СЕА або ЗФР в контрольній групі (наповнювач) і здійснювали моніторинг виживаності. У тварин щоденно контролювали клінічні симптоми і оцінювали небажані явища. Критеріями закінчення дослідження були візуальні признаки захворювання тварин: брудна шерсть, вигнута дугою спина, проблеми з диханням, порушена локомоція. Дані про загальну виживаність представлені на фіг. 20. Результати виражені у вигляді процента тварин, що вижили, в кожний момент часу. Достовірність різниць між групою, що піддавали обробці досліджуваною сполукою, і контрольною групою, яку обробляли ЗФР, порівнювали за допомогою парного t-критерію Стьюдента (p=0,078).

#### Приклад 18

Визначення афінності ТСВ-молекули до СЕА з СЕА і з CD3 за допомогою поверхневого

плазмонного резонансу (SPR)

Експерименти на основі поверхневого плазмонного резонансу (SPR) здійснювали з застосуванням пристрою Biacore T100 при 25 °C, застосовуючи як рухомого буфера HBS-EP (0,01M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTK, 0,005 % сурфактанту P20, фірма Biacore, Фрейбург, Німеччина).

Для вимірювання афінності TCB-молекулу до CEA "захоплювали" на поверхні сенсорного чипа CM5 за допомогою іммобілізованого антитіла до людського Fab (фірма GE Healthcare, № 28-9583-25). Застосовний для "захоплення" IgG зшивали з поверхнею сенсорного чипа шляхом безпосередньої іммобілізації приблизно 10000 резонансних одиниць (RU) при pH 5,0, застосовуючи стандартний набір для амінного сполучення (фірма Biacore, Фрейбург, Німеччина).

Для аналізу взаємодії з людським CD3ε "стебло"-Fc ("виступ")-Avi/CD3δ-"стебель"-Fc("западина") (SEQ ID NO: 120 і 121 відповідно) TCB-молекулу до CEA "захоплювали" протягом 30 з в концентрації 50 нМ при швидкості потоку 10 мкл/хв. CD3ε/CD3δ пропускали в концентрації 0,68-500 нМ при швидкості потоку 30 мкл/хв через проточні комірки протягом 360 з. Моніторинг дисоціації здійснювали протягом 360 з.

Величину  $K_D$ , яка характеризує взаємодію між TCB-молекулою до CEA і рекомбінантним пухлинним антигеном-мішенню, таким як людський NABA-avi-his (що містять В3-домен людського CEA (CEACAM5), оточений N-, A1- і A2-доменами людського CEACAM1 з С-кінцевою міткою avi 6his tag; див. SEQ ID NO: 119), визначали шляхом "захоплення" TCB-молекули протягом 40 с при швидкості потоку 10 мкл/хв. Антиген пропускали по поверхні проточної комірки протягом 240 з в діапазоні концентрацій від 0,68 до 500 нМ при швидкості потоку 30 мкл/хв. Дисоціацію оцінювали протягом 240 з.

Різниці всіх показань переломлення коректували шляхом віднімання відповіді, одержаного в проточній референс-комірці. Для цього варіанта антигени пропускали по поверхні з іммобілізованим антитілом до людського Fab, але на яку ін'єкували HBS-EP, а не CEA.

Кінетичні константи визначали шляхом чисельного інтегрування за допомогою програми Biacore T200 Evaluation (vAA, фірма Biacore AB, Уппсала/Швеція) для апроксимації даних з застосуванням уравнень для швидкостей на основі Ленгмюрівської моделі зв'язування (1:1). Час напівжиття ( $t_{1/2}$ ) взаємодії розраховували, застосовуючи наступну формулу:  $t_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$ .

TCB-молекула до CEA зв'язувалась з пухлиною-мішенню і з CD3ε/CD3δ в наномолярному діапазоні, при цьому величини  $K_D$  складали 62 нМ у відношенні людського NABA і 75,3 нМ у відношенні людського CD3ε/CD3δ. Час напівжиття одновалентного зв'язування з NABA складав 5,3 хв, час напівжиття зв'язування з CD3ε/CD3δ складав 5,7 хв. Кінетичні параметри узагальнені в таблиці 9.

Таблиця 9

Афінність TCB-молекули до CEA з людським NABA і людським CD3ε/CD3δ (T=25 °C)

Антиген	TCB	$k_{on}$ [1/Mc]	$k_{off}$ [1/з]	$t_{1/2}$ [хв]	$K_D$ [нМ]
Людський NABA	TCB-молекула до CEA	$3,49 \times 10^4$	$2,18 \times 10^{-3}$	5,3	62,4
Людський CD3ε/CD3δ	TCB-молекула до CEA	$2,69 \times 10^4$	$2,03 \times 10^{-3}$	5,7	75,3

#### Приклад 19

Визначення афінності TCB-молекули до MSCP з MSCP і з CD3 за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR)

Експерименти на основі поверхневого плазмонного резонансу (SPR) здійснювали з застосуванням пристрою Biacore T100 при 25 °C, застосовуючи як рухомого буфера HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTK, 0,005 % сурфактанту P20, фірма Biacore, Фрейбург, Німеччина).

Для вимірювання афінності TCB-молекулу до MSCP "захоплювали" на поверхні сенсорного чипа CM5 за допомогою іммобілізованого антитіла до людського Fab (фірма GE Healthcare, № 28-9583-25). Застосовний для "захоплення" IgG зшивали з поверхнею сенсорного чипа шляхом безпосередньої іммобілізації приблизно 7500 резонансних одиниць (RU) при pH 5,0, застосовуючи стандартний набір для амінного сполучення (фірма Biacore, Фрейбург, Німеччина). TCB-молекулу до MSCP "захоплювали" протягом 60 з в концентрації 30 нМ при швидкості потоку 10 мкл/хв. MSCP-D3 людини і мавп циномолгус (див. SEQ ID NO: 118 і 117 відповідно) пропускали в концентрації 0,024-50 нМ при швидкості потоку 30 мкл/хв через проточні комірки протягом 90 з. Діапазон концентрацій для конструкції CD3ε "стебло"-Fc

("виступ")-Аvi/CD3δ-"стебель"-Fc("западина") людини і мавп циномолгус складав 1,17-600 нМ. Оскільки очікували, що взаємодію з мишачим MCSP-D3 (SEQ ID NO: 122) буде слабким, діапазон концентрацій для цього антигену вибирали між 3,9 і 500 нМ. При оцінюванні всіх взаємодій моніторинг дисоціації здійснювали протягом 120 с. Різниці всіх показників переломлення коректували шляхом віднімання відповіді, одержаного в проточній референс-комірці. Для цього варіанта антигени пропускали по поверхні з іммобілізованим антитілом до людського Fab, але на яку ін'єктували HBS-EP, а не TCB-молекулу до MCSP.

Кінетичні константи визначали шляхом чисельного інтегрування за допомогою програми Biacore T200 Evaluation (vAA, фірма Biacore AB, Уппсала/Швеція) для апроксимації даних із застосуванням рівнянь для швидкостей на основі Ленгмюрівської моделі зв'язування (1:1). Взаємодію TCB-молекули до MCSP з мишачим MCSP-D3 визначали в стабільному стані. Час напівжиття ( $t_{1/2}$ ) взаємодії розраховували, застосовуючи наступну формулу:  $t_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$ .

TCB-молекула до MCSP зв'язувалась з пухлиною-мішенню в пікомолярному діапазоні, при цьому величини  $K_D$  складали 0,15 нМ для антигену людини і 0,12 нМ для антигену мавп циномолгус. Зв'язування рекомбінантного CD3ε/CD3δ з TCB-молекулою до MCSP характеризувалось величиною  $K_D$  78 нМ (людський) і 104 нМ (мавпячий). Час напівжиття одновалентного зв'язування з пухлинним антигеном складав аж до 260 хв, і з CD3ε/CD3δ складав 2,9 хв. Після того, як антитіло до MCSP піддавали процедурі дозрівання афінності, виявлене певне зв'язування з рекомбінантним мишачим MCSP-D3. Величина  $K_D$  цього взаємодії находилась в мікромолярному діапазоні (1,6 мМ). Кінетичні параметри узагальнені в таблиці 10.

Таблиця 10

Афінність TCB-молекули до MCSP з MCSP-D3 людини,  
мавп циномолгус і мишей і з CD3ε/CD3δ людини і мавп циномолгус (T=25 °C)

	$k_{on}$ [1/Мс]	$k_{off}$ [1/з]	$t_{1/2}$ [хв]	$K_D$ [нМ]
Людський MCSP-D3	$3,89 \times 10^5$	$5,63 \times 10^{-5}$	205	0,15
Мавпячий MCSP-D3	$3,70 \times 10^5$	$4,39 \times 10^{-5}$	263	0,12
Мишачий MCSP-D3	Nd	Nd	nd	1570*
Людський CD3ε/CD3δ	$4,99 \times 10^4$	$3,92 \times 10^{-3}$	2,9	78,7
Мавпячий CD3ε/CD3δ	$4,61 \times 10^4$	$4,78 \times 10^{-3}$	2,4	104

\*визначали шляхом вимірювання в стабільному стані.

#### Приклад 20

Термостабільність TCB-молекули до CEA

Термостабільність TCB-молекули до CEA визначали на основі динамічного розсіювання світла (DLS). 30 мкг профільтованого білкового зразка з концентрацією білка 0,5 мг/мл вносили з дублюванням в планшет-рідер типу Dynapro (фірма Wyatt Technology Corporation; США). Температуру підвищували з 25 до 75 °C зі швидкістю 0,05 °C/хв, визначаючи радіус і загальну інтенсивність розсіювання. Результати представлені на фіг. 21. Температуру агрегації TCB-молекули до CEA вимірювали при 55 °C.

#### Приклад 21

Термостабільність TCB-молекули до MCSP

Термостабільність TCB-молекули до MCSP визначали на основі динамічного розсіювання світла (DLS). 30 мкг профільтованого білкового зразка з концентрацією білка 0,5 мг/мл вносили з дублюванням в планшет-рідер типу Dynapro (фірма Wyatt Technology Corporation; США). Температуру підвищували з 25 до 75 °C зі швидкістю 0,05 °C/хв, визначаючи радіус і загальну інтенсивність розсіювання. Результати представлені на фіг. 22. Температуру агрегації TCB-молекули до MCSP вимірювали при 55 °C.

#### Приклад 22

Опосередкований Т-клітинами цитоліз пухлинних клітин-мішеней, що експресують MCSP, індукований TCB-антитілом до MCSP і антитілом до MCSP 1+1 CrossMab

Опосередкований Т-клітинами цитоліз клітин-мішеней, індукований TCB-антитілом до MCSP і TCB-антитілом до MCSP 1+1 CrossMab (активувальне Т-клітини біспецифічне антитіло, що має такі же зв'язувальні CD3 і MCSP послідовності, що і TCB-антитіло до MCSP, молекулярний формат якого представлений на фіг. 1Г), оцінювали з застосуванням пухлинних клітин-мішеней ліній A375 (високий рівень MCSP), MV-3 (середній рівень MCSP) і HCT-116 (низький рівень

MCSP). Як негативного контролю застосовували клітини лінії LS180 (MCSP-негативна лінія пухлинних клітин). Цитоліз пухлинних клітин оцінювали через 24 год. і 48 год. після інкубації клітин-мішеней з антитілами і ефекторними клітинами (людські PBMC). В цілому, метод полягав у наступному: клітини-мішені збирали за допомогою трипсину/ЕДТК, промивали і висівали з густиною 25000 клітин/лунку, застосовуючи плоскодонні 96-луночні планшети. Клітинам давали закріпитися протягом ночі. Мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) одержували шляхом центрифугування в градієнті щільності Histopaque збагачених лімфоцитами препаратів (лейкоцитарні плівки), взятих у здорових донорів. Свіжу кров розводили стерильним 3ФР і нашаровували на градієнт Histopaque (фірма Sigma, № H8889). Після центрифугування (450 × g, 30 хв, кімнатна температура), плазму, яка знаходиться над інтерфазою, що містить PBMC, відкидали і PBMC переносили в нову фальконівську пробірку, яку потім заповнювали 50 мл 3ФР. Суміш центрифугували (400 × g, 10 хв, кімнатна температура), супернатант відкидали і дебрис PBMC промивали двічі стерильним 3ФР (стадії центрифугування при 350 × g, 10 хв). Здійснювали автоматичний підрахунок популяції PBMC (пристрій ViCell) і зберігали її в середовищі RPMI1640, що містить 10 % FCS і 1 % L-аланін-L-глутаміну (фірма Biochrom, K0302) при 37 °C, в атмосфері, що містить 5 % CO<sub>2</sub>, в інкубаторі для клітин аж до подальшого використання (не більше 24 год.). Для аналізу цитолізу додавали антитіло в зазначених концентраціях (діапазон 0,01 пМ-10 нМ в трьох повтореннях). PBMC додавали до клітинам-мішеням при кінцевому співвідношенні ефекторних клітин і клітин-мішеней (Е:Т), що дорівнює 10:1. Цитоліз клітин-мішеней оцінювали після інкубації протягом 24 год. і 48 год. шляхом кількісного оцінювання вивільнення ЛДГ в клітинні супернатанти клітин на стадії апоптозу/некрозу (набір для детекції ЛДГ (LDH detection kit), фірма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Максимальний лізис клітин-мішеней (= 100 %) був досягнутий шляхом інкубації клітин-мішеней з 1 % Тритон Х-100. Мінімальний лізис (= 0 %) відповідав сумісній інкубації клітин-мішеней з ефекторними клітинами без біспецифічної конструкції. Результати продемонстрували, що TCB-антитіло до MCSP являлось більше ефективним, ніж TCB-антитіло до MCSP 1+1 CrossMab, оскільки індукувало більш сильний цитоліз MCSP-позитивних клітин-мішеней в обидва моменти часу і мало дію у відношенні всіх пухлинних клітин-мішеней (фіг. 23А-3). Величини EC<sub>50</sub>, одержані в аналізі цитолізу, розраховані за допомогою програми GraphPadPrism5, представлені в таблиці 11.

Таблиця 11

Кількість копій MCSP-рецептора і величини EC<sub>50</sub> (пМ), що характеризують опосередкований Т-клітинами цитоліз що експресують MCSP пухлинних клітин, індукований TCB-антитілом до MCSP

Клітинна лінія	Кількість копій MCSP-рецептора	EC <sub>50</sub> [пМ] через 24 год.	EC <sub>50</sub> [пМ] через 48 год.
A375	387 058	0,1	н.в.
MV-3	260 000	1,0	0,7
HCT-116	36770	~6,2e-008	~0,09
LS180	Негативна лінія	~764	n.d.

(н.в. = не визначали)

#### Приклад 23

Підвищувальна регуляція CD25 і CD69 на ефекторних CD8<sup>+</sup> і CD4<sup>+</sup>-клітинах після Т-клітинного цитолізу що експресують MCSP пухлинних клітин, індукованого TCB-антитілом до MCSP і антитілом до MCSP 1+1 CrossMab

Активацію CD8<sup>+</sup> і CD4<sup>+</sup>-Т-клітин після Т-клітинного цитолізу що експресують MCSP пухлинних клітин (A375 і MV-3), опосередкованого TCB-антитілом до MCSP і антитілом до MCSP 1+1 CrossMab, оцінювали за допомогою FACS-аналізу, застосовуючи антитіла, які розпізнають маркери Т-клітинної активації, такі як CD25 (пізній маркер активації) і CD69 (ранній маркер активації). Антитіло і умови аналізу цитолізу практично відповідали описаним вище (приклад 22), при цьому застосовували такий самий діапазон концентрацій антитіла (0,01 пМ-10 нМ в трьох повтореннях), співвідношення Е:Т, рівне 10:1, і тривалість інкубації 48 год.

Після інкубації PBMC переносили в круглодонний 96-луночний планшет, центрифугували при 350 × g протягом 5 хв і промивали двічі 3ФР, що містять 0,1 % БСА. Фарбування поверхні у відношенні CD8 (ФІТЦ, антитіло до людського CD8, фірма BD, № 555634), CD4 (PECy7, антитіло до людського CD4, фірма BD, № 557852), CD69 (PE, антитіло до людського CD69,

фірма Biolegend, № 310906) і CD25 (APC, антитіло до людського CD25, фірма BD, № 555434) здійснювали згідно з рекомендаціям постачальника. Клітини промивали двічі, застосовуючи 150 мкл/лунку 3ФР, що містить 0,1 % БСА, і фіксували протягом 15 хв при 4 °С, застосовуючи 100 мкл/лунку фіксувального буфера (фірма BD, № 554655). Після центрифугування зразки ресуспендували в 200 мкл/лунку 3ФР, 0,1 % БСА, який містив DAPI для виключення мертвих клітин при FACS-аналізі. Зразки аналізували за допомогою пристрою фірми BD FACS Fortessa. Результати продемонстрували, що ТСВ-антитіло до МСРР індукувало сильну і мішенеспецифічну підвищувальну регуляцію маркерів активації (CD25, CD69) на CD8<sup>+</sup>-Т-клітинах (фіг. 24А, Б (для А375-клітин) і Д, Е (для MV-3-клітин) і CD4<sup>+</sup>-Т-клітинах (фіг. 24В, Г (для А375-клітин) і Ж, З (для MV-3-клітин) після цитолізу. Аналогічно результатам, одержаним при вивченні цитолізу, активація Т-клітин оказалась більш сильною при застосуванні ТСВ-антитіла до МСРР, ніж антитіла до МСРР 1+1 CrossMab.

#### Приклад 24

Одержання ТСВ-молекули DP47 GS (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA інвертована = "неспрямована ТСВ-молекула), що містить DP47 GS як незв'язувальне антитіло і гуманізоване антитіло CH2527 як антитіло до CD3

"Неспрямовану ТСВ-молекулу" застосовували як контролю в описаних вище експериментах. Біспецифічне антитіло взаємодіяло з CD3ε, але не зв'язувалося з будь-яким іншим антигеном і тому не могло перехресно зшивати Т-клітини з будь-якими клітинами-мішенями (і відповідно не могло індукувати ніякий цитоліз). Тому зазначену молекулу застосовували як негативного контролю в аналізах для моніторингу будь-якої неспецифічної Т-клітинної активації.

ДНК-послідовності варіабельної ділянки важкого і легкого ланцюга субклонували в рамці зчитування або з константної ділянкою важкого ланцюга, або з константної ділянкою легкого ланцюга, попередньо вбудованої в відповідний реципієнтний експресійний вектор ссавців. Експресія антитіла находилась під контролем промотору MPSV, і вектор ніс синтетичну сигнальну полі(А)-послідовність на 3'-кінці кожної CDS. крім того, кожний вектор містив OriP-послідовність EBV.

Молекулу одержували шляхом сумісної трансфекції клітин HEK293-EBNA експресійними векторами ссавців із застосуванням поліетиленіміну (ПЕІ). Клітини трансфектували відповідними експресійними векторами в співвідношенні 1:2:1:1 ("вектор важкого ланцюга Fc("западина")": "вектор легкого ланцюга": "вектор легкого ланцюга Crossfab": "вектор важкого ланцюга Fc("виступ")-FabCrossfab").

Для трансфекції клітини HEK293 EBNA культивували в суспензії і безсироватковому культуральному середовищі CD CHO. Для одержання в 500-мілілітрових струшувальних колбах 400 мільйонів клітин HEK293 EBNA висівали за 24 год. до трансфекції. Для трансфекції клітини центрифугували протягом 5 хв при 210 × g, супернатант заміняли 20 мл попередньо нагрітого середовища CD CHO. Експресійні вектори змішували в 20 мл середовища CD CHO до досягнення кінцевої кількості ДНК, що складає 200 мкг. Після додавання 540 мкл розчину ПЕІ суміш інтенсивно перемішували протягом 15 з і потім інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі. Потім клітини змішували з розчином ДНК/ПЕІ, переносили в 500-мілілітрову колбу і інкубували протягом 3 год. при 37 °С в інкубаторі в атмосфері, що містить 5 % CO<sub>2</sub>. Після періоду інкубації додавали 160 мл середовища F17 і клітини культивували протягом 24 год. Через один день після трансфекції додавали 1 мМ вальпроєву кислоту і 7 % Feed 1 (фірма Lonza). Після культивування протягом 7 днів супернатант збирали для очищення шляхом центрифугування протягом 15 хв при 210 × g, розчин стерилізували фільтрацією (фільтр 0,22 мкм), доповнювали азидом натрію до кінцевої концентрації 0,01 % (мас./об.) і витримували при 4 °С.

Білки, що секретують очищали з супернатантів клітинних культур за допомогою афінної хроматографії на білку А. Супернатант вносили на колонку HiTrap ProteinA HP (CV=5 мл, фірма GE Healthcare), урівноважену 40 мл суміші, що містить 20 мМ фосфат натрію, 20 мМ цитрат натрію, 0,5М хлорид натрію, рН 7,5. Незв'язаний білок видаляли відмиванням, застосовуючи рівний щонайменше 10 об'ємам колонки об'єм суміші, що містить 20 мМ фосфат натрію, 20 мМ цитрат натрію, 0,5 М хлорид натрію, рН 7,5. Потрібний білок елюювали, застосовуючи градієнт об'ємом, рівним 20 об'ємам колонки, від 20 мМ цитрату натрію, 0,5 М хлориду натрію, рН 7,5 до 20 мМ цитрату натрію, 0,5 М хлориду натрію, рН 2,5. Розчин білка нейтралізували, додаючи 1/10 0,5 М фосфату натрію, рН 8. Потрібний білок концентрували і фільтрували перед внесенням на колонку HiLoad Супердекс 200 (фірма GE Healthcare), урівноважену розчином, що містять 20 мМ гістидин, 140 мМ хлорид натрію, рН 6,0.

Концентрацію білка в очищених білкових зразках визначали шляхом вимірювання оптичної щільності (ОП) при 280 нм, застосовуючи коефіцієнт молярної екстинкції, розрахований на основі амінокислотної послідовності.

Чистоту і молекулярну масу молекул аналізували за допомогою KE-ПААГ в присутності відновлювача і без нього. Застосовували систему Caliper LabChip GXII (фірма Caliper Lifescience) згідно з інструкціями виробника. Для аналізу застосовували по 2 мкг зразка. Вміст агрегатів в зразках антитіла аналізували, застосовуючи колонку для аналітичної гель-фільтрації TSKgel G3000 SW XL (фірма Tosoh) в рухомому буфері, що містить 25 мМ  $K_2HPO_4$ , 125 мМ NaCl, 200 мМ моногідрохлорид L-аргініну, 0,02 % (мас./об.)  $NaN_3$ , pH 6,7, при 25 °C.

Таблиця 12

Узагальнення даних про одержання й очищення TCB-молекули DP47 GS

Конструкція	Титр [мг/л]	Вихід [мг/л]	Кількість агрегатів після 1-ої стадії очищення [%]	HMW [%]	LMW [%]	Мономер [%]
TCB-молекула DP47 GS	103,7	8,04	8	2,3	6,9	91,8

На фіг. 25 і в таблиці 13 представлені результати KE-ДСН-аналізу TCB-молекули DP47 GS (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA інвертована), що містить DP47 GS як антитіло, яке не зв'язується і гуманізоване антитіло CH2527 як антитіло до CD3 (SEQ ID NO: 59, 60, 61 і 62).

Таблиця 13

Результати KE-ДСН-аналізу TCB-молекули DP47 GS

	Пік	кДа	Відповідний ланцюг
TCB-молекула DP47 GS, невідновлювальні умови (А)	1	165,22	Молекула з двома відсутніми легкими ланцюгами
	2	181,35	Молекула з 1 відсутнім легким ланцюгом
	3	190,58	Правильна молекула без N-зв'язаного глікозилування
	4	198,98	Правильна молекула
TCB-молекула DP47 GS, відновлювальні умови (Б)	1	27,86	Легкий ланцюг DP47 GS
	2	35,74	Легкий ланцюг huCH2527
	3	63,57	Fc("западина")
	4	93,02	Fc("виступ")

Хоча вище винахід описано достатньо докладно за допомогою ілюстрацій і прикладів, наведених для цілей кращого його розуміння, опис і приклади не повинні розглядатися як обмежувальні об'єм винаходу. Всі процитовані в даному описі патентні й наукові публікації повністю включені у нього як посилання.

#### ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> РОШ ГЛІКАРТ АГ

<120> БІСПЕЦИФІЧНІ АНТИГЕНЗВ'ЯЗУВАЛЬНІ МОЛЕКУЛИ,  
ЩО АКТИВУЮТЬ Т-КЛІТИНИ

<130> 31447

<150> EP 13156686.1

<151> 2013-02-26

<160> 122

<170> PatentIn, версія 3.5



```

<210> 1
<211> 455
<212> PRT
5  <213> Штучна послідовність

<220>
<223>  HC CD3 CH2527 (VH_3-23(12))
10
<400>  1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

15  Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
          20          25          30

20  Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

25  Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
          50          55          60

30  Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
        65          70          75          80

35  Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
          85          90          95

40  Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
          100          105          110

45  Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
          115          120          125

50  Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
          130          135          140

55  Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
        145          150          155          160

        Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
          165          170          175

60  Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
          180          185          190

        Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

```

## UA 119320 C2

		195					200					205				
5	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu
		210					215					220				
10	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
	225					230					235					240
15	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
					245					250					255	
20	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
				260					265					270		
25	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
		290					295					300				
30	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
	305					310					315					320
35	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
					325					330					335	
40	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
				340					345					350		
45	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
			355					360					365			
50	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
		370					375					380				
55	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
	385					390					395					400
60	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
					405					410					415	
65	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				420					425					430		
70	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
			435					440					445			

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455  
 5  
 <210> 2  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 10 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> LC CD3 CH2527 (VL\_7-46(13))  
 15 <400> 2  
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 20 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 25 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 30 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala  
 65 70 75 80  
 35 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 40 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 100 105 110  
 45 Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu  
 115 120 125  
 50 Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro  
 130 135 140  
 Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala  
 145 150 155 160  
 55 Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala  
 165 170 175  
 60 Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg

	180	185	190
5	Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr 195 200 205		
10	Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser 210 215		
15	<210> 3 <211> 125 <212> PRT <213> Штучна послідовність		
20	<220> <223> VH CD3 CH2527 (VH_3-23(12))		
25	<400> 3		
30	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
35	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr 20 25 30		
40	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
45	Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp 50 55 60		
50	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr 65 70 75 80		
55	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr 85 90 95		
60	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe 100 105 110		
65	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120 125		
70	<210> 4 <211> 5 <212> PRT <213> Штучна послідовність		
75	<220> <223> HCDR1 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))		

<400> 4

Thr Tyr Ala Met Asn  
1 5

5

<210> 5  
<211> 19  
<212> PRT  
10 <213> Штучна послідовність

<220>  
<223> HCDR2 CD3 CH2527 (VH\_3-23(12))

15 <400> 5

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser  
1 5 10 15

20 Val Lys Gly

25 <210> 6  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

30 <220>  
<223> HCDR3 CD3 CH2527 (VH\_3-23(12))

<400> 6

35 His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

40 <210> 7  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
45 <223> VL CD3 CH2527 (VL\_7-46(13))

<400> 7

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
50 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

55 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly  
35 40 45

60 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

	50		55		60
5	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala	65	70	75	80
10	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn	85	90	95	
15	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	100	105		
	<210> 8				
	<211> 14				
	<212> PRT				
	<213> Штучна послідовність				
20	<220>				
	<223> LCDR1 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))				
	<400> 8				
25	Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn	1	5	10	
30	<210> 9				
	<211> 7				
	<212> PRT				
	<213> Штучна послідовність				
35	<220>				
	<223> LCDR2 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))				
	<400> 9				
40	Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro	1	5		
45	<210> 10				
	<211> 9				
	<212> PRT				
	<213> Штучна послідовність				
	<220>				
50	<223> LCDR3 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))				
	<400> 10				
55	Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val	1	5		
60	<210> 11				
	<211> 442				
	<212> PRT				
	<213> Штучна послідовність				

<220>

<223> HC MCSP M4-3 (C1)\$

5 <400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

10

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly  
20 25 30

15

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

20

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

25

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

30

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
115 120 125

40

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
130 135 140

45

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
165 170 175

50

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
180 185 190

55

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
195 200 205

60

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
210 215 220

	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
	225					230					235					240	
5	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
					245					250					255		
10	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
				260					265					270			
15	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
			275					280					285				
20	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
		290					295					300					
25	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
	305					310					315					320	
30	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
					325					330					335		
35	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
				340					345					350			
40	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
			355					360					365				
45	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
		370					375					380					
50	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
	385					390					395					400	
55	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
					405					410					415		
60	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
				420					425					430			
65	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
			435					440									
70	<210>	12															
	<211>	214															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															



<220>

<223> LC MCSP ML2 (G3)

5 <400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
20 25 30

15

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

20

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

25

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp  
85 90 95

30

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

35

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

40

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

45

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

50

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

55

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

60

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 13  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 5 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> VH MCSP M4-3 (C1)  
  
 10 <400> 13  
  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
  
 15 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly  
 20 25 30  
  
 20 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
  
 25 Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
  
 30 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80  
  
 35 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 40 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110  
  
 40 <210> 14  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 45 <220>  
 <223> HCDR1 MCSP M4-3 (C1)  
  
 <400> 14  
  
 50 Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn  
 1 5  
  
 55 <210> 15  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 60 <223> HCDR2 MCSP M4-3 (C1)

<400> 15

Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

5

<210> 16  
<211> 3  
<212> PRT  
10 <213> Штучна послідовність

<220>  
<223> HCDR3 MCSP M4-3 (C1)

15 <400> 16

Phe Asp Tyr  
1

20

<210> 17  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

25

<220>  
<223> VL MCSP ML2 (G3)

<400> 17

30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

35 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
20 25 30

40 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

45

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

50

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp  
85 90 95

55 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

60

<210> 18  
<211> 11  
<212> PRT

<213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> LCDR1 MCSP ML2 (G3)  
 5 <400> 18  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn  
 1 5 10  
 10  
 <210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> LCDR2 MCSP ML2 (G3)  
 20 <400> 19  
 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser  
 1 5  
 25  
 <210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 30  
 <220>  
 <223> LCDR3 MCSP ML2 (G3)  
 <400> 20  
 35  
 Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp Thr  
 1 5  
 40  
 <210> 21  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 45  
 <220>  
 <223> HC CEA CH1A1A 98-99  
 <400> 21  
 50  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe  
 55 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 60

	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Thr	Tyr	Val	Glu	Glu	Phe	
	50						55					60					
5	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Phe	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
10	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
15	Ala	Arg	Trp	Asp	Phe	Ala	Tyr	Tyr	Val	Glu	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	
				100					105					110			
20	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
			115					120					125				
25	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
	130						135					140					
30	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
	145					150					155					160	
35	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
					165					170					175		
40	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
				180					185					190			
45	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
			195					200					205				
50	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
	210						215					220					
55	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
	225					230					235					240	
60	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
					245					250					255		
65	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				260					265					270			
70	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
		275						280					285				
75	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	

	290		295		300												
5	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
	305					310					315					320	
10	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
					325					330					335		
15	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
				340					345					350			
20	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
			355					360					365				
25	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
		370					375					380					
30	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
	385					390					395					400	
35	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
					405					410					415		
40	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
				420					425					430			
45	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
			435					440					445				
50	Pro	Gly	Lys														
		450															
55	<210>	22															
	<211>	215															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
60	<220>																
	<223>	LC CEA 2F1															
	<400>	22															
55	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
	1				5					10					15		
60	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Thr	Tyr	
				20					25					30			

	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35							40					45			
5	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Arg	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50						55					60				
10	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
15	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu
					85					90					95	
20	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
				100					105					110		
25	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
			115					120					125			
30	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
							135					140				
35	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
	145					150					155					160
40	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
					165					170					175	
45	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
				180					185					190		
50	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
			195					200					205			
55	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
	210						215									
60	<210>	23														
	<211>	121														
	<212>	PRT														
	<213>	Штучна послідовність														
65	<220>															
	<223>	VH CEA CH1A1A 98-99														
70	<400>	23														
75	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe  
20 25 30

5 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

10 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe  
50 55 60

15 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

20 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

25 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

30 <210> 24  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

35 <220>  
<223> HCDR1 CEA CH1A1A 98-99  
  
<400> 24

40 Glu Phe Gly Met Asn  
1 5

45 <210> 25  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність  
  
<220>  
<223> HCDR2 CEA CH1A1A 98-99  
  
<400> 25

50 Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

60



<210> 26  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 5  
 <220>  
 <223> HCDR3 CEA CH1A1A 98-99  
 <400> 26  
 10  
 Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10  
 15  
 <210> 27  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 20  
 <220>  
 <223> VL CEA 2F1  
 <400> 27  
 25  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 30  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr  
 20 25 30  
 35  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 40  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 45  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu  
 85 90 95  
 50  
 Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 55  
 <210> 28  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> LCDR1 CEA 2F1  
 60  
 <400> 28

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala  
 1 5 10

5  
 <210> 29  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

10  
 <220>  
 <223> LCDR2 CEA 2F1  
 <400> 29

15  
 Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg  
 1 5

20  
 <210> 30  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

25  
 <220>  
 <223> LCDR3 CEA 2F1  
 <400> 30

30  
 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr  
 1 5 10

35  
 <210> 31  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

40  
 <220>  
 <223> VL CD3 CH2527 (VL\_7-43(11))  
 <400> 31

45  
 Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

50  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30

55  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
 35 40 45

60  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60

65  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val  
 65 70 75 80

5 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 10 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser  
 100 105 110  
 <210> 32  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 15 <220>  
 <223> VH CD3 CH2527 (VHcomboA49SV93A)  
 <400> 32  
 20 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 30 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 35 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 40 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 45 Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 50 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 55 <210> 33  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> VH CD3 CH2527 (VHcomboA49SV93AR94K)  
 60 <400> 33

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 5  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 10 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 15 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 20 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 25 Tyr Cys Ala Lys His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 30 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 35 <210> 34  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 40 <220>  
 <223> VH MCSP M4-3 (D6)  
 <400> 34  
 45 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly  
 20 25 30  
 50 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 55 Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Lys Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 60 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

5 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 10 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110  
 <210> 35  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 15 <220>  
 <223> HCDR2 MCSP M4-3 (D6)  
 <400> 35  
 20 Ile Thr Phe Asp Gly Lys Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
 25 <210> 36  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 30 <220>  
 <223> VH MCSP M4-3 (A7)  
 <400> 36  
 35 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 40 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Asp Gly  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 45 Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 50 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80  
 55 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 60 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

<210> 37  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 5 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> HCDR1 MCSP M4-3 (A7)  
  
 10 <400> 37  
  
 Asp Gly Tyr Tyr Trp Asn  
 1 5  
  
 15  
 <210> 38  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 20  
 <220>  
 <223> HCDR2 MCSP M4-3 (A7)  
  
 <400> 38  
 25  
 Ile Thr Phe Asp Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
  
 30 <210> 39  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 35 <220>  
 <223> VH MCSP M4-3 (B7)  
  
 <400> 39  
  
 40 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly  
 45 20 25 30  
  
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 50  
 Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ile Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
  
 55  
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80  
  
 60 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

5

<210> 40  
<211> 15  
<212> PRT  
10 <213> Штучна послідовність

<220>  
<223> HCDR2 MCSP M4-3 (B7)

15 <400> 40

Ile Thr Phe Asp Gly Ile Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

20

<210> 41  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

25

<220>  
<223> VH MCSP M4-3 (B8)

<400> 41

30

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

35 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly  
20 25 30

40 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

45

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

50

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

55 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

60

<210> 42  
<211> 112  
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH MCSP M4-3

5

<400> 42

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

10

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly  
20 25 30

15

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

20

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

25

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

30

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

35

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

40

<220>

<223> VL MCSP ML2 (E10)

<400> 43

45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

50

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr  
20 25 30

55

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

60

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60



Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

5 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp  
85 90 95

10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

15 <210> 44  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

20 <220>  
<223> LCDR1 MCSP ML2 (E10)  
<400> 44

25 Arg Ala Ser Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr Leu Asn  
1 5 10

30 <210> 45  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

35 <220>  
<223> LCDR3 MCSP ML2 (E10)  
<400> 45

40 Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 46  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

50 <220>  
<223> VL MCSP ML2 (E10-G3)  
<400> 46

55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

60 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr  
20 25 30

60 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 5  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp  
 85 90 95  
 15 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 47  
 <211> 107  
 20 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> VL MCSP ML2 (C5)  
 25 <400> 47  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Arg Glu Tyr  
 20 25 30  
 35 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 40 Tyr Tyr Thr Gly Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 45 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp  
 85 90 95  
 50 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 55 <210> 48  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 60 <220>

<223> LCDR1 MCSP ML2 (C5)

<400> 48

5 Arg Ala Ser Arg Gly Ile Arg Glu Tyr Leu Asn  
1 5 10

<210> 49  
10 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
15 <223> LCDR2 MCSP ML2 (C5)

<400> 49

Tyr Thr Gly Ser Leu His Ser  
20 1 5

<210> 50  
<211> 9  
25 <212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
30 <223> LCDR3 MCSP ML2 (C5)

<400> 50

Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp Thr  
35 1 5

<210> 51  
<211> 107  
<212> PRT  
40 <213> Штучна послідовність

<220>  
<223> VL MCSP ML2 (C5-G3)

45 <400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

50 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Arg Glu Tyr  
20 25 30

55 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Gly Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
60 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

5

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp  
 85 90 95

10

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

15

<210> 52  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

20

<220>  
 <223> VL MCSP ML2  
 <400> 52

25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

30

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
 20 25 30

35

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

40

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

45

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

50

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp  
 85 90 95

55

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

60

<210> 53  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)  
 <400> 53

	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	
				20				25						30			
	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	
10			35					40					45				
	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	
15		50					55					60					
	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	
	65					70					75					80	
20																	
	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	
					85					90					95		
	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	
25				100					105					110			
	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	
30			115					120					125				
	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
35		130					135					140					
	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	
	145					150					155					160	
40																	
	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
					165					170					175		
	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	
45				180					185					190			
	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	
50			195					200					205				
	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys											
55		210															
	<210>	54															
	<211>	685															
	<212>	PRT															
60	<213>	Штучна послідовність															

<220>

<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc («виступ») P329GLALA

5 <400> 54

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

10

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly  
20 25 30

15

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

20

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

25

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

30

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
115 120 125

40

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
130 135 140

45

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
165 170 175

50

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
180 185 190

55

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
195 200 205

60

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
210 215 220

	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	
	225					230					235					240	
5	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	
					245					250					255		
10	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
				260					265					270			
15	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	
			275					280					285				
20	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	
	290						295					300					
25	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	
	305					310					315					320	
30	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	
					325					330					335		
35	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
				340					345					350			
40	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	
			355					360					365				
45	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	
	370						375					380					
50	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	
	385					390					395					400	
55	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	
				405					410						415		
60	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	
				420					425					430			
65	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	
			435					440					445				
70	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
	450						455					460					

	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	465					470					475					480	
5	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
					485					490					495		
10	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
				500					505					510			
15	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
			515					520					525				
20	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
		530					535					540					
25	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	545					550					555					560	
30	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
					565					570					575		
35	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	
				580					585					590			
40	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	
			595					600					605				
45	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
	610						615					620					
50	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
	625					630					635					640	
55	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
					645					650					655		
60	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
				660					665					670			
65	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
			675					680					685				
70	<210>	55															
	<211>	442															
	<212>	PRT															
75	<213>	Штучна послідовність															



<220>

<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - Fc («западина») P329GLALA

<400> 55

5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

10

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly  
20 25 30

15

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

20

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

25

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

30

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
115 120 125

40

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
145 150 155 160

45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
165 170 175

50

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
180 185 190

55

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
195 200 205

60

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
210 215 220

	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
	225					230					235					240	
5	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
					245					250					255		
10	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
				260					265					270			
15	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
			275					280					285				
20	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
		290					295					300					
25	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
					325					330					335		
30	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
				340					345					350			
35	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
			355					360					365				
40	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
		370					375					380					
45	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
	385					390					395					400	
50	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
					405					410					415		
55	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
				420					425					430			
60	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
			435					440									
	<210>	56															
	<211>	214															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															

<220>

<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 56

5

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

10

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

15

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly  
35 40 45

20

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

25

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala  
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

30

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala  
100 105 110

35

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
115 120 125

40

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
145 150 155 160

45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
165 170 175

50

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
180 185 190

55

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys  
195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210

60

<210> 57  
 <211> 694  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 5  
 <220>  
 <223> CEA CH1A1A 98/99 - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc («виступ»)  
 P329GLALA  
 10 <400> 57  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe  
 20 25 30  
 20 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 25 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe  
 50 55 60  
 30 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 35 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 40 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 45 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 50 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 55 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 60 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	210						215					220				
5																
	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu
	225					230					235					240
10																
	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser
					245					250					255	
15																
	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val
				260					265					270		
20																
	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser
			275					280					285			
25																
	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
	290						295					300				
30																
	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met
	305					310					315					320
35																
	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His
					325					330					335	
40																
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
			355					360					365			
45																
	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
	370						375					380				
50																
	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
	385					390					395					400
55																
	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val
					405					410					415	
60																
	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu
				420					425					430		
65																
	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
			435					440					445			

	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	
	450						455					460					
5																	
	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	
	465					470					475					480	
10	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
					485					490					495		
15	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
				500					505					510			
20	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
			515					520					525				
25	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
	530						535					540					
30	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
	545					550					555					560	
35	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	
					565					570					575		
40	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
				580					585					590			
45	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	
			595					600					605				
50	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
	610						615					620					
55	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	
	625					630					635					640	
60	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
					645					650					655		
65	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
				660					665					670			
70	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	
			675					680					685				

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
690

5 <210> 58  
<211> 451  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

10 <220>  
<223> CEA CH1A1A 98/99 (VH-CH1) - Fc («западина») P329GLALA  
  
<400> 58

15 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

20 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe  
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

25 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe  
50 55 60

30 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

35 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

40 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125

45 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
130 135 140

50 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
145 150 155 160

55 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
165 170 175

60 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
180 185 190

	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
				195				200					205				
5	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
		210					215					220					
10	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
	225					230					235					240	
15	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				245						250					255		
20	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				260					265					270			
25	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
			275					280					285				
30	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
		290					295					300					
35	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
	305					310					315					320	
40	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
					325					330					335		
45	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
				340					345					350			
50	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
			355					360					365				
55	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
		370					375					380					
60	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
	385					390					395					400	
65	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
					405					410					415		
70	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
				420					425					430			



His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
435 440 445

5 Pro Gly Lys  
450

<210> 59  
10 <211> 215  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
15 <223> LC DP47 GS

<400> 59

20 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

30 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

35 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
40 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
100 105 110

45 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
115 120 125

50 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
130 135 140

55 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
60 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
180 185 190

5 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
195 200 205

10 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 60  
15 <211> 214  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
20 <223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 60

25 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

30 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly  
35 40 45

35 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

40 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala  
65 70 75 80

45 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala  
100 105 110

50 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
115 120 125

55 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
130 135 140

60 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 165 170 175  
 5  
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
 180 185 190  
 10  
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys  
 195 200 205  
 15 Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210  
 <210> 61  
 20 <211> 688  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 25 <223> DP47 GS (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc («виступ»)  
 P329GLALA  
 <400> 61  
 30 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 40 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 55 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 115 120 125  
 60

	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	
	130						135					140					
5	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	
	145					150					155					160	
10	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	
					165					170						175	
15	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	
				180					185					190			
20	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	
			195					200					205				
25	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
	210						215					220					
30	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
	225					230					235					240	
35	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	
				245						250					255		
40	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	
				260					265					270			
45	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	
			275					280					285				
50	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	
	290						295					300					
55	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	
	305					310					315					320	
60	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	
					325					330					335		
65	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	
				340					345					350			
70	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	
			355					360					365				
75	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	

	370		375		380												
5	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	
	385					390					395					400	
10	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	
					405					410					415		
15	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	
				420					425					430			
20	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	
			435					440					445				
25	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	
	450						455					460					
30	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	
	465					470					475					480	
35	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
					485					490						495	
40	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
				500					505					510			
45	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
			515					520					525				
50	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	530						535					540					
55	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
	545					550				555						560	
60	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
					565					570					575		
65	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
				580					585					590			
70	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	
			595					600					605				
75	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	610						615					620					

5 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 625 630 635 640  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 645 650 655  
 10 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 660 665 670  
 15 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 675 680 685  
 20 <210> 62  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 25 <220>  
 <223> DP47 GS (VH-CH1) - Fc («западина») P329GLALA  
 <400> 62  
 30 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 35 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 40 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 55 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 115 120 125  
 60 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val

	130		135		140												
5	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	
	145					150					155					160	
10	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	
					165					170						175	
15	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	
				180					185					190			
20	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	
			195					200					205				
25	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
		210					215					220					
30	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
35	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
				245						250					255		
40	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
			260						265					270			
45	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
			275					280					285				
50	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
		290					295					300					
55	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305				310						315					320	
60	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
				325						330					335		
65	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
				340					345					350			
70	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	
			355					360					365				
75	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
		370					375					380					

5 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415  
 10 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430  
 15 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 20 <210> 63  
 <211> 1365  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 25 <220>  
 <223> HC CD3 CH2527 (VH\_3-23(12))  
 <400> 63  
 gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60  
 30 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt ggcgcaggcc 120  
 cctggcgaag gcctggaatg ggtgtcccg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180  
 tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240  
 35 ctgtacctgc agatgaacag cctgcggggc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300  
 cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcacccctc 360  
 40 gtgaccgtgt catctgctag caccaagggc ccatcgggtc tccccctggc accctcctcc 420  
 aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480  
 ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc 540  
 45 gtccctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600  
 ttggggcacc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660  
 50 aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg ccagcacct 720  
 gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 780  
 atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840  
 55 gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900  
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960  
 60 tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1020



	gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc	1080
	ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc	1140
5	tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag	1200
	accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg	1260
	gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg	1320
10	cacaaccact acacgcagaa gaggcctctcc ctgtctccgg gtaaa	1365
	<210> 64	
15	<211> 645	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
20	<223> LC CD3 CH2527 (VL_7-46(13))	
	<400> 64	
	caggccgtcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg	60
25	acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa	120
	aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc	180
	cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc	240
30	cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc	300
	ggcggaggca ccaagctgac agtcctaggt caacccaagg ctgccccag cgtgaccctg	360
35	ttcccccca gcagcgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctgggtctg cctgatcagc	420
	gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggccg acagcagccc cgtgaaggcc	480
	ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac	540
40	ctgagcctga cccccgagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgaccac	600
	gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc	645
45	<210> 65	
	<211> 375	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
50	<220>	
	<223> VH CD3 CH2527 (VH_3-23(12))	
	<400> 65	
55	gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg	60
	agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt ggcgcaggcc	120
	cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc	180
60	tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc	240

	ctgtacctgc agatgaacag cctgcggggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg	300
	cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcacccctc	360
5	gtgaccgtgt catct	375
	<210> 66	
10	<211> 15	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
15	<223> HCDR1 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))	
	<400> 66	
	acctacgcca tgaac	15
20	<210> 67	
	<211> 57	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
25	<220>	
	<223> HCDR2 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))	
	<400> 67	
30	cggatcagaa gcaagtacaa caactacgcc acctactacg ccgacagcgt gaagggc	57
	<210> 68	
	<211> 42	
35	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
40	<223> HCDR3 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))	
	<400> 68	
	cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct ac	42
45	<210> 69	
	<211> 327	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
50	<220>	
	<223> VL CD3 CH2527 (VL_7-46(13))	
	<400> 69	
55	caggccgtcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg	60
	acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa	120
	aagcccggcc aggccttcag aggactgacg ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc	180
60	cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc	240

	cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc	300
	ggcggaggca ccaagctgac agtccta	327
5	<210> 70 <211> 42 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
10	<220> <223> LCDR1 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))	
15	<400> 70 ggcagttcta caggcgccgt gaccaccagc aactacgcca ac	42
20	<210> 71 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
25	<220> <223> LCDR2 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))	
	<400> 71 ggcassaaca agagagcccc t	21
30	<210> 72 <211> 27 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
35	<220> <223> LCDR3 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))	
40	<400> 72 gccctgtggt acagcaacct gtgggtg	27
45	<210> 73 <211> 1326 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> HC MCSP M4-3 (C1)	
50	<400> 73 caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg	60
	acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag	120
55	caccccgga agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac	180
	aacccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc	240
	ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac	300
60	tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc	360

	ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg	420
5	gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc	480
	ggcgtgcaca ctttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg	540
	gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag	600
10	cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca	660
	tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca	720
15	aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac	780
	gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	840
	aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc	900
20	ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	960
	aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa	1020
25	ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg	1080
	acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1140
	cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcccttcttc	1200
30	ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1260
	tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1320
35	ggtaaa	1326
	<210> 74	
	<211> 642	
	<212> ДНК	
40	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> LC MCSP ML2 (G3)	
45	<400> 74	
	gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc	120
50	ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc	180
	cggttttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccattagctc cctgcagccc	240
55	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tactctgctc tgccgtggac cttcggccag	300
	ggaacaaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga	360
	tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
60	cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480

		gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
		ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
5		ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt	642
10	<210>	75	
	<211>	336	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
15	<220>		
	<223>	VH MCSP M4-3 (C1)	
	<400>	75	
		caggtgcaat tgcaggaaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg	60
20		acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag	120
		caccccgga agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac	180
		aacccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc	240
		ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac	300
		tactggggcc agggcacct ggtcacctg tccagc	336
30	<210>	76	
	<211>	18	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
35	<220>		
	<223>	HCDR1 MCSP M4-3 (C1)	
	<400>	76	
		agcggctatt attggaac	18
40			
45	<210>	77	
	<211>	48	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
50	<220>		
	<223>	HCDR2 MCSP M4-3 (C1)	
	<400>	77	
		tacatcactt tcgacggctc taacaactac aacccagcc tgaagtcc	48
55	<210>	78	
	<211>	9	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
60	<220>		
	<223>	HCDR3 MCSP M4-3 (C1)	

	<400> 78 ttcgactac	9
5	<210> 79 <211> 321 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
10	<220> <223> VL MCSP ML2 (G3)	
	<400> 79 gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
15	atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc	180
20	cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccattagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tactctgctc tgccgtggac cttcggccag	300
25	ggaacaaagg tggagatcaa g	321
	<210> 80 <211> 33 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
30	<220> <223> LCDR1 MCSP ML2 (G3)	
35	<400> 80 cgggscagcc agggcatccg gaactacctg aac	33
	<210> 81 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
40	<220> <223> LCDR2 MCSP ML2 (G3)	
45	<400> 81 tacaccagca gcctgcacag c	21
50	<210> 82 <211> 27 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
55	<220> <223> LCDR3 MCSP ML2 (G3)	
60	<400> 82 cagcagtact ctgctctgcc gtggacc	27

	<210>	83		
	<211>	1353		
	<212>	ДНК		
5	<213>	Штучна послідовність		
	<220>			
	<223>	HC CEA CH1A1A 98-99		
10	<400>	83		
	cagggtgcagc	tgggtgcagtc	tggcgccgaa	gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg 60
	tcctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
15	ccaggccagg	gcctcgaatg	gatgggcttg	atcaaacacca agaccggcga ggccacctac 180
	gtggaagagt	tcaagggcag	agtgaccttc	accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
	atggaactgc	ggagcctgag	aagcgacgac	accgccgtgt actactgcmc cagatgggac 300
20	ttcgcctatt	acgtggaagc	catggactac	tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
	agcgctagca	ccaagggccc	atcggctctt	ccctggcac cctcctcaa gagcacctct 420
25	gggggacacag	cgccccctggg	ctgcctggtc	aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg 480
	tcgtggaact	caggcgccct	gaccagcggc	gtgcacacct tcccggttgt cctacagtcc 540
	tcaggactct	actccctcag	cagcgtggtg	accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600
30	acctacatct	gcaacgtgaa	tcacaagccc	agcaaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
	cccaaatactt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
35	ggaccgtcag	tcttcctctt	ccccccaaaa	cccaaggaca ccctcatgat ctccccggacc 780
	cctgagggtca	catgcgtggg	ggtggacgtg	agccacgaag accctgagggt caagtttaac 840
	tgggtacgtgg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag 900
40	aacagcacgt	accgtgtggg	cagcgtcctc	accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
	aaggagtaca	agtgcaagggt	ctccaacaaa	gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
45	tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	cagggtgtaca ccttgcccc atccccggat 1080
	gagctgacca	agaaccagggt	cagcctgacc	tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
	atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200
50	gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcctc	tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
	tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
55	acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt	aaa 1353
	<210>	84		
	<211>	645		
60	<212>	ДНК		
	<213>	Штучна послідовність		

	<220>		
	<223>	LC CEA 2F1	
5	<400>	84	
		gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
		atcacttgca aggccagtc ggctgtgggt acgtatgttg cgtgggtatca gcagaaacca	120
10		gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca	180
		aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
		gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc	300
15		cagggcacca agctcgagat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
		ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
20		tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
		caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg	540
		acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
25		ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt	645
	<210>	85	
30	<211>	363	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
35	<223>	VH CEA CH1A1A 98-99	
	<400>	85	
		caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg	60
40		tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct	120
		ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac	180
		gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac	240
45		atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac	300
		ttcgctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct	360
50		agc	363
	<210>	86	
	<211>	15	
55	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
60	<223>	HCDR1 CEA CH1A1A 98-99	
	<400>	86	



	gagttcggca tgaac	15
5	<210> 87 <211> 51 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
10	<220> <223> HCDR2 CEA CH1A1A 98-99 <400> 87 tggatcaaca csaagaccgg cgaggccacc tacgtggaag agttcaaggg c	51
15	<210> 88 <211> 36 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
20	<220> <223> HCDR3 CEA CH1A1A 98-99 <400> 88	
25	tgggacttcg cctattacgt ggaagccatg gactac	36
30	<210> 89 <211> 324 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
35	<220> <223> VL CEA 2F1 <400> 89 gatatccaga tgaccacgtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
40	atcacttgca aggccagtgc ggctgtgggt acgtatgttg cgtgggtatca gcagaaacca	120
	gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca	180
	aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
45	gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc	300
	cagggcacca agctcgagat caag	324
50	<210> 90 <211> 33 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
55	<220> <223> LCDR1 CEA 2F1 <400> 90 aaggccagtg cggctgtggg tacgtatggt gcg	33
60		

<210> 91  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 5  
 <220>  
 <223> LCDR2 CEA 2F1  
 <400> 91  
 10 tcggcatcct accgcaaaag g 21  
 <210> 92  
 <211> 30  
 15 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> LCDR3 CEA 2F1  
 20  
 <400> 92  
 caccaatatt acacctatcc tctattcacg 30  
 25 <210> 93  
 <211> 642  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 30 <220>  
 <223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)  
 <400> 93  
 35 caggccgtcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60  
 acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120  
 aagcccggcc aggccttcag aggactgacg ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180  
 40 cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240  
 cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300  
 ggcgaggga ccaagctgac agtctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360  
 45 cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420  
 aaggattatt ttcctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480  
 50 gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540  
 acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600  
 agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642  
 55  
 <210> 94  
 <211> 2055  
 <212> ДНК  
 60 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) -  
Fc («виступ») P329GLALA

5 <400> 94  
caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60  
acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120  
10 caccccggca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac 180  
aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240  
ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac 300  
15 tactggggcc agggcacct ggtcaccgtg tccagcgcta gcacaaaggg cccagcgtg 360  
ttccctctgg ccctagcag caagagcaca tctggcgga cagccgccct gggctgcctc 420  
20 gtgaaggact actttcccga gcctgtgacc gtgtcctgga actctggcgc cctgacaagc 480  
ggcgtgcaca cttttccagc cgtgctgcag agcagcggcc tgtactctct gagcagcgtg 540  
gtcaccgtgc ctagcagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600  
25 cccagcaaca ccaaagtgga caagaagggt gagcccaaga gctgtgatgg cggaggaggg 660  
tccggaggcg gaggatccga ggtgcagctg ctggaatctg gcggcggact ggtgcagcct 720  
30 ggcggatctc tgagactgag ctgtgccgcc agcggcttca ccttcagcac ctacgccatg 780  
aactgggtgc gccaggcccc tggcaaaggc ctggaatggg tgtcccgat cagaagcaag 840  
tacaacaact acgccacct ctacgccgac agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg 900  
35 gagcacagca agaaccacct gtacctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 960  
gtgtactatt gtgtgcggca cggcaacttc ggcaacagct atgtgtcttg gtttgcctac 1020  
40 tggggccagg gcacctcgt gaccgtgtca agcgttagcg tggccgctcc ctccgtgttt 1080  
atctttcccc catccgatga acagctgaaa agcggcaccg cctccgtcgt gtgtctgctg 1140  
aacaattttt accctaggga agctaaagtg cagtggaaag tggataacgc actgcagtcc 1200  
45 ggcaactccc aggaatctgt gacagaacag gactccaagg acagcaccta ctccctgtcc 1260  
tccaccctga cactgtctaa ggctgattat gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 1320  
50 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtgacaag 1380  
accacacct gtcccccttg tctgcccct gaagctgctg gcggcccttc tgtgttctctg 1440  
ttcccccaa agccaagga caccctgatg atcagccgga ccccgaagt gacctgcgtg 1500  
55 gtggtggatg tgtccacga ggaccctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 1560  
gaagtgcaca acgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1620  
60 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1680

	gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1740
	ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag	1800
5	gtcagcctgt ggtgcctggg caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1860
	agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1920
10	tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1980
	ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	2040
	ctgtctccgg gtaaa	2055
15	<210> 95 <211> 1326 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
20	<220> <223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - Fc («западина») P329GLALA	
25	<400> 95 caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg	60
	acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag	120
30	caccccggca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac	180
	aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc	240
	ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac	300
35	tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagcgcta gcaccaaggg cccctccgtg	360
	ttccccctgg cccccagcag caagagcacc agcggcggca cagccgctct gggctgcctg	420
40	gtcaaggact acttccccga gcccgtagacc gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc	480
	ggcgtgcaca ctttccccgc cgtgctgcag agttctggcc tgtatagcct gagcagcgtg	540
	gtcaccgtgc cttctagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag	600
45	cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg gagcccaaga gctgcgacaa aactcacaca	660
	tgcccaccgt gcccagcacc tgaagctgca gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca	720
50	aaaccaaggg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac	780
	gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtcc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	840
	aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc	900
55	ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	960
	aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa	1020
60	ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc	1080
	tcgtgcgag tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1140

	cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcccttcttc	1200
5	ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1260
	tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1320
	ggtaaa	1326
10	<210> 96 <211> 642 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
15	<220> <223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)	
20	<400> 96 caggccgtcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg	60
	acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa	120
25	aagcccggcc aggccttcag aggactgac ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc	180
	cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc	240
	cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc	300
30	ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt	360
	cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg	420
35	aaggattatt ttcctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga	480
	gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtgggtg	540
	acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc	600
40	agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt	642
45	<210> 97 <211> 2082 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
50	<220> <223> CEA CH1A1A 98/99 - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc («виступ») P329GLALA	
	<400> 97 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg	60
55	tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggcc	120
	cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac	180
60	gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accaccgaca ccagcaccag caccgcctac	240
	atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac	300

	ttcgccctact atgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct	360
5	agtgctagca caaagggccc cagcgtgttc cctctggccc ctagcagcaa gagcacatct	420
	ggcggaacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact ttcccagacc cgtgacagtg	480
	tcctggaact ctggcgccct gacaagcggc gtgcacacct ttccagccgt gctgcagagc	540
10	agcggcctgt actctctgag cagcgtggtc accgtgccta gctctagcct gggcacccag	600
	acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaaacacca aggtggacaa gaaggtggaa	660
15	ccaagagct gcgatggcgg aggcggctcc ggaggcggag gatccgaggt gcagctgctg	720
	gaatctggcg gcggactggg gcagcctggc ggatctctga gactgagctg tgccgccagc	780
	ggcttcacct tcagcaccta cgccatgaac tgggtgcgcc aggcccttg caaaggcctg	840
20	gaatgggtgt cccggatcag aagcaagtac aacaactacg ccacctacta cgccgacagc	900
	gtgaagggcc ggttcaccat cagccgggac gacagcaaga acacctgta cctgcagatg	960
25	aacagcctgc gggccgagga caccgccgtg tactattgtg tgccggcacgg caacttcggc	1020
	aacagctatg tgtcttggtt tgcctactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcaagc	1080
	gctagcgtgg ccgctccctc cgtgtttatc tttcccccac ccgatgaaca gctgaaaagc	1140
30	ggcaccgcct ccgtcgtgtg tctgctgaac aatttttacc ctagggaagc taaagtgcag	1200
	tggaaagtgg ataacgcact gcagtccggc aactcccagg aatctgtgac agaacaggac	1260
35	tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc accctgacac tgtctaaggc tgattatgag	1320
	aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag	1380
	agcttcaaca ggggagagtg tgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgcccctgaa	1440
40	gctgctggcg gcccttctgt gttcctgttc ccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc	1500
	agccggaccc ccgaagtgac ctgcgtgggt gtggatgtgt cccacgagga ccctgaagtg	1560
45	aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagacaaa gccgcgggag	1620
	gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg	1680
	ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag	1740
50	aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca	1800
	tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgtggg gcctgggtcaa aggcttctat	1860
55	cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc	1920
	acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttccctc acagcaagct caccgtggac	1980
	aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac	2040
60	aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa	2082

	<210>	98	
	<211>	1353	
	<212>	ДНК	
5	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	CEA CH1A1A 98/99 (VH-CH1) - Fc («западина») P329GLALA	
10	<400>	98	
	caggtgcagc	tggtgcagtc	tggcgccgaa
	gtgaagaaac	ctggagctag	tgtgaaggtg
			60
	tcctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc
	gagttcggca	tgaactgggt	ccgacaggct
			120
15	ccaggccagg	gcctcgaatg	gatgggctgg
	atcaacacca	agaccggcga	ggccacctac
			180
	gtggaagagt	tcaagggcag	agtgccttc
	accacggaca	ccagcaccag	caccgcctac
			240
	atggaactgc	ggagcctgag	aagcgacgac
	accgccgtgt	actactgcgc	cagatgggac
			300
20	ttcgcctatt	acgtggaagc	catggactac
	tggggccagg	gcaccaccgt	gaccgtgtct
			360
	agcgctagca	ccaagggccc	ctccgtgttc
	cccctggccc	ccagcagcaa	gagcaccagc
			420
25	ggcggcacag	ccgctctggg	ctgcctggtc
	aaggactact	tccccgagcc	cgtgaccgtg
			480
	tcctggaaca	gcggagccct	gacctccggc
	gtgcacacct	tccccgccgt	gctgcagagt
			540
	tctggcctgt	atagcctgag	cagcgtggtc
	accgtgcctt	ctagcagcct	gggcacccag
			600
30	acctacatct	gcaacgtgaa	ccacaagccc
	agcaacacca	aggtggacaa	gaaggtggag
			660
	cccaagagct	gcgacaaaac	tcacacatgc
	ccaccgtgcc	cagcacctga	agctgcaggg
			720
35	ggaccgtcag	tcttcctctt	ccccccaaaa
	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccgacc
			780
	cctgaggtca	catgcgtggc	ggcggacgtg
	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac
			840
	tggtacgtgg	acggcgtgga	ggtgcataat
	gccaagacaa	agccgcggga	ggagcagtac
			900
40	aacagcacgt	accgtgtggc	cagcgtcctc
	accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc
			960
	aaggagtaca	agtgaaggt	ctccaacaaa
	gccctcggcg	cccccatcga	gaaaaccatc
			1020
45	tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca
	caggtgtgca	ccctgcccc	atcccgggat
			1080
	gagctgacca	agaaccaggc	cagcctctcg
	tgcgcagtca	aaggcttcta	tcccagcgac
			1140
	atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggagc
	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc
			1200
50	gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcctc
	gtgagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg
			1260
	tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc
	gtgatgcatg	aggctctgca	caaccactac
			1320
55	acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt
	aaa		1353
	<210>	99	
	<211>	645	
60	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	

<220>  
 <223> LC DP47 GS

5 <400> 99  
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120  
 10 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180  
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240  
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacgct gacgttcggc 300  
 15 caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360  
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420  
 20 tatcccagag aggccaaagt acagtggag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480  
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540  
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600  
 25 ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 100  
 30 <211> 642  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 35 <223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 100  
 caggccgtcg tgaccaggga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60  
 40 acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaaactg ggtgcaggaa 120  
 aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180  
 cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240  
 45 cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300  
 ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360  
 50 cctctggctc ctagtccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420  
 aaggattatt ttcctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480  
 gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540  
 55 acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600  
 agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

60 <210> 101



<211> 2064  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

5 <220>  
 <223> DP47 GS (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc («Виступ»)  
 P329GLALA

<400> 101

10	gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct	120
	ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180
15	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300
20	ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag cacaaggggc	360
	cccagcgtgt tccctctggc ccctagcagc aagagcacat ctggcggaac agccgccttg	420
	ggctgcctcg tgaaggacta ctttcccagc cctgtgaccg tgtcctggaa ctctggcgcc	480
25	ctgacaagcg gcgtgcacac ctttccagcc gtgctgcaga gcagcggcct gtactctctg	540
	agcagcgtgg tcaccgtgcc tagcagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
30	aaccacaagc ccagcaacac caaagtggac aagaagggtg agcccaagag ctgtgatggc	660
	ggaggagggg ccggaggcgg aggatccgag gtgcagctgc tggaatctgg cggcggactg	720
	gtgcagcctg gcggatctct gagactgagc tgtgccgcca gcggcttcac cttcagcacc	780
35	tacgccatga actgggtgcg ccaggcccct ggcaaaggcc tggaatgggt gtcccggatc	840
	agaagcaagt acaacaacta cgccacctac tacgccgaca gcgtgaaggg ccggttcacc	900
40	atcagccggg acgacagcaa gaacaccctg tacctgcaga tgaacagcct gcgggcccag	960
	gacaccgccg tgtactattg tgtgcggcac ggcaacttcg gcaacagcta tgtgtcttg	1020
	tttgctact ggggccaggg caccctcgtg accgtgtcaa gcgctagcgt ggccgctccc	1080
45	tccgtgttta tctttcccc atccgatgaa cagctgaaaa gcggcaccgc ctccgtcgtg	1140
	tgtctgctga acaattttta ccctagggaa gctaaagtgc agtggaaggt ggataacgca	1200
50	ctgcagtccg gcaactccca ggaatctgtg acagaacagg actccaagga cagcacctac	1260
	tccctgtcct ccaccctgac actgtctaag gctgattatg agaaacacaa agtctacgcc	1320
	tgcaagtc cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag	1380
55	tgtgacaaga cccacacctg tcccccttgt cctgcccctg aagctgctgg cggcccttct	1440
	gtgttcctgt tcccccaaa gcccaaggac accctgatga tcagccggac ccccgaagtg	1500
60	acctgcgtgg tgggtgatgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg	1560

		gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	1620
		taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1680
5		aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	1740
		aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga tgagctgacc	1800
		aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1860
10		gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1920
		tccgacggct ctttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1980
15		gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	2040
		agcctctccc tgtctccggg taaa	2064
20	<210>	102	
	<211>	1335	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
25	<220>		
	<223>	DP47 GS (VH-CH1) - Fc («западина») P329GLALA	
	<400>	102	
		gaggtgcaat tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
30		tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt cccccaggct	120
		ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacatactac	180
35		gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
		ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300
		ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc	360
40		ccctccgtgt tccccctggc ccccagcagc aagagcacca gcggcggcac agccgctctg	420
		ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc	480
45		ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg	540
		agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
		aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaagggtg agcccaagag ctgcgacaaa	660
50		actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc	720
		ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780
55		gtgggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
		gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
		gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag	960
60		gtctccaaca aagccctcgg cgcgcccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020

```

ccccgagaac cacaggtgtg caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag      1080
gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag      1140
5 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccggtgctgga ctccgacggc      1200
tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc      1260
10 ttctcatgct ccgatgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc      1320
ctgtctccgg gtaaa      1335

```

```

15 <210> 103
    <211> 207
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

```

```

20 <400> 103

```

```

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1          5          10          15

```

```

25 Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
    20          25          30

```

```

30 Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
    35          40          45

```

```

35 Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
    50          55          60

```

```

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65          70          75          80

```

```

40 His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
    85          90          95

```

```

45 Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
    100          105          110

```

```

50 Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
    115          120          125

```

```

55 Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
    130          135          140

```

```

60 Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
    145          150          155          160

```

	Pro	Val	Thr	Arg	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Arg	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn	
					165					170					175		
5	Lys	Glu	Arg	Pro	Pro	Pro	Val	Pro	Asn	Pro	Asp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Arg	
				180					185					190			
10	Lys	Gly	Gln	Arg	Asp	Leu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Asn	Gln	Arg	Arg	Ile		
			195					200					205				
15	<210>	104															
	<211>	198															
	<212>	PRT															
	<213>	Macaca fascicularis															
	<400>	104															
20	Met	Gln	Ser	Gly	Thr	Arg	Trp	Arg	Val	Leu	Gly	Leu	Cys	Leu	Leu	Ser	
	1				5					10					15		
25	Ile	Gly	Val	Trp	Gly	Gln	Asp	Gly	Asn	Glu	Glu	Met	Gly	Ser	Ile	Thr	
				20					25					30			
30	Gln	Thr	Pro	Tyr	Gln	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Ile	Leu	Thr	
			35					40					45				
35	Cys	Ser	Gln	His	Leu	Gly	Ser	Glu	Ala	Gln	Trp	Gln	His	Asn	Gly	Lys	
		50					55					60					
40	Asn	Lys	Glu	Asp	Ser	Gly	Asp	Arg	Leu	Phe	Leu	Pro	Glu	Phe	Ser	Glu	
	65					70				75						80	
45	Met	Glu	Gln	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Val	Cys	Tyr	Pro	Arg	Gly	Ser	Asn	Pro	
					85					90					95		
50	Glu	Asp	Ala	Ser	His	His	Leu	Tyr	Leu	Lys	Ala	Arg	Val	Cys	Glu	Asn	
				100					105					110			
55	Cys	Met	Glu	Met	Asp	Val	Met	Ala	Val	Ala	Thr	Ile	Val	Ile	Val	Asp	
			115					120					125				
60	Ile	Cys	Ile	Thr	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Lys	
		130					135					140					
65	Asn	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Arg	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	
	145					150					155					160	
70	Gly	Arg	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn	Lys	Glu	Arg	Pro	Pro	Pro	Val	Pro	Asn	
					165					170					175		

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly  
180 185 190

5

Leu Asn Gln Arg Arg Ile  
195

10

<210> 105  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

15

<220>  
<223> линкер

<400> 105

20

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

25

<210> 106  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

30

<220>  
<223> линкер

<400> 106

35

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

40

<210> 107  
<211> 227  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 107

45

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
1 5 10 15

50

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
20 25 30

55

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
50 55 60

60

	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	65	70	75	80
5	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	85	90	95	
10	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	100	105	110	
15	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	115	120	125	
20	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	130	135	140	
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	145	150	155	160
25	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	165	170	175	
30	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	180	185	190	
35	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	195	200	205	
40	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	210	215	220	
	Pro	Gly	Lys														225			
45	<210>	108																		
	<211>	19																		
	<212>	PRT																		
	<213>	Штучна послідовність																		
50	<220>																			
	<223>	лидерний пептид																		
	<400>	108																		
55	Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	1	5	10	15
60	Ala	His	Ser																	

<210> 109  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 5 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> лидерний пептид  
  
 10 <400> 109  
 atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57  
  
 <210> 110  
 15 <211> 57  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 20 <223> лидерний пептид  
  
 <400> 110  
 atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57  
  
 25  
 <210> 111  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 30  
 <220>  
 <223> лидерний пептид  
  
 <400> 111  
 35  
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15  
  
 40 Phe Pro Gly Ala Arg Cys  
 20  
  
 <210> 112  
 45 <211> 66  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 50 <223> лидерний пептид  
  
 <400> 112  
 atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctgggtt ccacaggtgcc 60  
  
 55 aggtgt 66  
  
 <210> 113  
 <211> 19  
 60 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> лидерний пептид  
 5 <400> 113  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 10 Val His Ser  
 15 <210> 114  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 20 <220>  
 <223> лидерний пептид  
 <400> 114  
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattcc 57  
 25  
 <210> 115  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 30 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> лидерний пептид  
 35 <400> 115  
 atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccactggagt gcattcc 57  
 40  
 <210> 116  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 45 <223> лидерний пептид  
 <400> 116  
 atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct 57  
 50  
 <210> 117  
 <211> 643  
 <212> PRT  
 <213> Macaca fascicularis  
 55  
 <400> 117  
 Leu Ser Leu Glu Gly Ser Arg Thr Leu Thr Val Cys Pro Gly Ser Val  
 1 5 10 15  
 60



	Gln	Pro	Leu	Ser	Ser	Gln	Thr	Leu	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Thr	
				20					25					30			
5	Asp	Pro	Gln	Leu	Leu	Leu	Tyr	Arg	Val	Val	Arg	Gly	Pro	Gln	Leu	Gly	
			35					40					45				
10	Arg	Leu	Phe	His	Ala	Gln	Gln	Asp	Ser	Thr	Gly	Glu	Ala	Leu	Val	Asn	
		50					55					60					
15	Phe	Thr	Gln	Ala	Glu	Val	Tyr	Ala	Gly	Asn	Ile	Leu	Tyr	Glu	His	Glu	
	65					70					75					80	
20	Met	Pro	Thr	Glu	Pro	Phe	Trp	Glu	Ala	His	Asp	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	
					85					90					95		
25	Val	Ser	Phe	Glu	Ala	Ala	Cys	Pro	Gln	Arg	Pro	Ser	His	Leu	Trp	Lys	
			115					120					125				
30	Asn	Lys	Gly	Leu	Trp	Val	Pro	Glu	Gly	Gln	Arg	Ala	Lys	Ile	Thr	Met	
		130					135					140					
35	Ala	Ala	Leu	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Leu	Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Pro	Gln	
	145					150					155					160	
40	Arg	Leu	Glu	His	Asp	Val	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Gln	Phe	Pro	Ser	Arg	
					165					170					175		
45	Gly	Gln	Leu	Leu	Val	Ser	Glu	Glu	Pro	Leu	His	Ala	Gly	Gln	Pro	His	
				180					185					190			
50	Phe	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gln	Leu	Val	Tyr	Ala	His	Gly	
			195					200					205				
55	Gly	Gly	Gly	Thr	Gln	Gln	Asp	Gly	Phe	His	Phe	Arg	Ala	His	Leu	Gln	
		210					215					220					
60	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Val	Ala	Gly	Pro	Gln	Thr	Ser	Glu	Ala	Phe	
	225					230					235					240	
65	Ala	Ile	Thr	Val	Arg	Asp	Val	Asn	Glu	Arg	Pro	Pro	Gln	Pro	Gln	Ala	
					245					250					255		
70	Ser	Val	Pro	Leu	Arg	Ile	Thr	Arg	Gly	Ser	Arg	Ala	Pro	Ile	Ser	Arg	

	260	265	270
5	Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu 275 280 285		
10	Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly 290 295 300		
15	Gly Gly Pro Gly Pro Val Thr His Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser 305 310 315 320		
	Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Val Phe 325 330 335		
20	Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu 340 345 350		
25	Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Gln Ala Pro 355 360 365		
30	Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln 370 375 380		
	Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu 385 390 395 400		
35	Ile Gln Gly Pro Lys Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Ala 405 410 415		
40	Ser Ala Phe Ser Gln Leu Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala 420 425 430		
45	Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu 435 440 445		
50	Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Ile Thr Val Arg Ala 450 455 460		
	Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu 465 470 475 480		
55	Arg Leu Asp Pro Thr Ile Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr 485 490 495		
60	Gly Ser Val Pro His Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg 500 505 510		

Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu  
 515 520 525  
 5  
 Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu  
 530 535 540  
 10  
 Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Thr Gly Asp Ser  
 545 550 555 560  
 15 Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser  
 565 570 575  
 20 Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val  
 580 585 590  
 Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Thr Arg Met Glu Ala Gly Lys Pro  
 595 600 605  
 25  
 Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro  
 610 615 620  
 30  
 Val Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Gly Phe Leu Glu Ala Asn  
 625 630 635 640  
 35 Met Phe Ser  
 40 <210> 118  
 <211> 643  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 118  
 Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys Pro Gly Ser Val  
 1 5 10 15  
 50 Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser Ser Ser Ala Gly Thr  
 20 25 30  
 55 Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly  
 35 40 45  
 Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn  
 50 55 60  
 60

	Phe	Thr	Gln	Ala	Glu	Val	Tyr	Ala	Gly	Asn	Ile	Leu	Tyr	Glu	His	Glu	
	65					70					75					80	
5	Met	Pro	Pro	Glu	Pro	Phe	Trp	Glu	Ala	His	Asp	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	
					85					90					95		
10	Leu	Ser	Ser	Pro	Pro	Ala	Arg	Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Ala	
				100					105					110			
15	Val	Ser	Phe	Glu	Ala	Ala	Cys	Pro	Gln	His	Pro	Ser	His	Leu	Trp	Lys	
			115					120					125				
20	Asn	Lys	Gly	Leu	Trp	Val	Pro	Glu	Gly	Gln	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Val	
		130					135					140					
25	Ala	Ala	Leu	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Leu	Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Pro	Gln	
	145					150					155					160	
30	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Val	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Gln	Phe	Pro	Ser	Arg	
					165					170					175		
35	Gly	Gln	Leu	Leu	Val	Ser	Glu	Glu	Pro	Leu	His	Ala	Gly	Gln	Pro	His	
			180						185					190			
40	Phe	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gln	Leu	Val	Tyr	Ala	His	Gly	
			195					200					205				
45	Gly	Gly	Gly	Thr	Gln	Gln	Asp	Gly	Phe	His	Phe	Arg	Ala	His	Leu	Gln	
		210					215					220					
50	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Gly	Pro	Gln	Thr	Ser	Glu	Ala	Phe	
	225					230					235					240	
55	Ala	Ile	Thr	Val	Arg	Asp	Val	Asn	Glu	Arg	Pro	Pro	Gln	Pro	Gln	Ala	
					245				250						255		
60	Ser	Val	Pro	Leu	Arg	Leu	Thr	Arg	Gly	Ser	Arg	Ala	Pro	Ile	Ser	Arg	
				260					265					270			
65	Ala	Gln	Leu	Ser	Val	Val	Asp	Pro	Asp	Ser	Ala	Pro	Gly	Glu	Ile	Glu	
			275				280						285				
70	Tyr	Glu	Val	Gln	Arg	Ala	Pro	His	Asn	Gly	Phe	Leu	Ser	Leu	Val	Gly	
		290					295					300					
75	Gly	Gly	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Arg	Phe	Thr	Gln	Ala	Asp	Val	Asp	Ser	

	305		310		315		320
5	Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe	325		330		335	
10	Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu	340		345		350	
15	Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro	355		360		365	
20	Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln	370		375		380	
25	Ile Gln Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr	405		410		415	
30	Ser Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala	420		425		430	
35	Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu	435		440		445	
40	Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val Arg Ala	450		455		460	
45	Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu	465		470		475	480
50	Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr	485		490		495	
55	Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg	500		505		510	
60	Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu	515		520		525	
	Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu	530		535		540	
	Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser	545		550		555	560

5 Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser  
 565 570 575  
 10 Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val  
 580 585 590  
 15 Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro  
 595 600 605  
 20 Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro  
 610 615 620  
 25 Glu Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn  
 625 630 635 640  
 Met Phe Ser  
 30 <210> 119  
 <211> 428  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> NABA-avi-his  
 35 <400> 119  
 Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu  
 1 5 10 15  
 40 Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser  
 20 25 30  
 45 Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr  
 35 40 45  
 50 Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg  
 50 55 60  
 55 Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln  
 65 70 75 80  
 Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val  
 85 90 95  
 60 Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys

	100	105	110
5	Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala 115 120 125		
10	Met Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp 130 135 140		
15	Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser 145 150 155 160		
20	Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr 165 170 175		
25	Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser 180 185 190		
30	Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile 195 200 205		
35	Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser 210 215 220		
40	Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn 225 230 235 240		
45	Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr 245 250 255		
50	Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr 260 265 270		
55	Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Leu Ser 275 280 285		
60	Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr 290 295 300		
	Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly 305 310 315 320		
	Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu 325 330 335		
	Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Ile Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val 340 345 350		

5 Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile  
 355 360 365  
 Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala  
 370 375 380  
 10 Leu Pro Gln Glu Asn Leu Ile Asn Val Asp Leu Glu Val Leu Phe Gln  
 385 390 395 400  
 15 Gly Pro Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu  
 405 410 415  
 20 Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His His His  
 420 425  
 25 <210> 120  
 <211> 360  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 30 <220>  
 <223> CD3ε «стебель»-Fc («виступ»)-Avi  
 <400> 120  
 35 Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys  
 1 5 10 15  
 Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro  
 20 25 30  
 40 Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp  
 35 40 45  
 45 Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 50 Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg  
 85 90 95  
 55 Val Ser Glu Asn Cys Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 60 Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro



	115	120	125	
5	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 130 135 140			
10	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 145 150 155 160			
15	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 165 170 175			
20	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 180 185 190			
25	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 195 200 205			
30	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 210 215 220			
35	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 225 230 235 240			
40	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys 245 250 255			
45	Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 260 265 270			
50	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 275 280 285			
55	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 290 295 300			
60	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser 305 310 315 320			
	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 325 330 335			
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu 340 345 350			
	Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu 355 360			

<210> 121  
 <211> 325  
 5 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> CD3d «стебель»-Fc («западина»)  
 10 <400> 121  
  
 Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys  
 1 5 10 15  
 15  
 Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser  
 20 25 30  
 20  
 Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly  
 35 40 45  
 25  
 Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr  
 50 55 60  
 30  
 Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Arg Ser Glu Gln Leu Tyr Phe Gln  
 65 70 75 80  
 35  
 Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 85 90 95  
 40  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 100 105 110  
 45  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 115 120 125  
 50  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 130 135 140  
 55  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 165 170 175  
 60  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 180 185 190  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

		195		200		205										
5	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
		210					215					220				
10	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	225					230					235					240
15	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
					245					250					255	
20	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr
				260					265					270		
25	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
		290					295					300				
30	Ser	Pro	Gly	Lys	Ser	Gly	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys
	305					310					315					320
35	Ile	Glu	Trp	His	Glu											
					325											
40	<210>	122														
	<211>	658														
	<212>	PRT														
	<213>	Mus musculus														
45	<400>	122														
50	Leu	Ser	Leu	Glu	Gly	Thr	Arg	Lys	Leu	Thr	Val	Cys	Pro	Glu	Ser	Val
	1				5					10					15	
55	Gln	Pro	Leu	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala
				20					25					30		
60	Asp	Pro	Arg	His	Leu	Leu	Tyr	Arg	Val	Val	Arg	Gly	Pro	Gln	Leu	Gly
			35					40					45			
65	Arg	Leu	Leu	His	Ala	Gln	Gln	Gly	Ser	Ala	Glu	Glu	Val	Leu	Val	Asn
		50					55				60					
70	Phe	Thr	Gln	Ala	Glu	Val	Asn	Ala	Gly	Asn	Ile	Leu	Tyr	Glu	His	Glu
	65					70					75					80

	Met	Ser	Ser	Glu	Pro	Phe	Trp	Glu	Ala	His	Asp	Thr	Ile	Gly	Leu	Leu	
					85					90					95		
5																	
	Leu	Ser	Ser	Pro	Pro	Ala	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Met	
				100					105					110			
10	Val	Ser	Phe	Asp	Ala	Ala	Cys	Pro	Gln	Arg	Pro	Ser	Arg	Leu	Trp	Lys	
			115					120					125				
15	Asn	Lys	Gly	Leu	Trp	Val	Pro	Glu	Gly	Gln	Arg	Ala	Lys	Ile	Thr	Val	
		130					135					140					
20	Ala	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala	Ser	Val	Pro	Ala	Ser	Gln	
	145					150					155					160	
	Arg	Ser	Arg	His	Asp	Val	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Gln	Phe	Pro	Thr	Arg	
					165					170					175		
25																	
	Gly	Gln	Leu	Leu	Val	Ser	Glu	Glu	Pro	Leu	His	Ala	Arg	Arg	Pro	Tyr	
				180					185					190			
30	Phe	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu	Ala	Ala	Gly	Gln	Leu	Val	Tyr	Ala	His	Gly	
			195					200					205				
35	Gly	Gly	Gly	Thr	Gln	Gln	Asp	Gly	Phe	Arg	Phe	Arg	Ala	His	Leu	Gln	
		210					215					220					
40	Gly	Pro	Thr	Gly	Thr	Ser	Val	Ala	Gly	Pro	Gln	Thr	Ser	Glu	Ala	Phe	
	225					230					235					240	
	Val	Ile	Thr	Val	Arg	Asp	Val	Asn	Glu	Arg	Pro	Pro	Gln	Pro	Gln	Ala	
					245					250					255		
45																	
	Ser	Ile	Pro	Leu	Arg	Val	Thr	Arg	Gly	Ser	Arg	Ala	Pro	Val	Ser	Arg	
				260					265					270			
50	Ala	Gln	Leu	Ser	Val	Val	Asp	Pro	Asp	Ser	Ala	Pro	Gly	Glu	Ile	Glu	
			275					280					285				
55	Tyr	Glu	Val	Gln	Arg	Ala	Pro	His	Asn	Gly	Phe	Leu	Ser	Leu	Ala	Gly	
		290					295					300					
60	Asp	Asn	Thr	Gly	Pro	Val	Thr	His	Phe	Thr	Gln	Ala	Asp	Val	Asp	Ala	
	305					310					315					320	

	Gly	Arg	Leu	Ala	Phe	Val	Ala	Asn	Gly	Ser	Ser	Val	Ala	Gly	Val	Phe	
					325					330					335		
5	Gln	Leu	Ser	Met	Ser	Asp	Gly	Ala	Ser	Pro	Pro	Ile	Pro	Met	Ser	Leu	
				340					345					350			
10	Ala	Val	Asp	Val	Leu	Pro	Ser	Thr	Ile	Glu	Val	Gln	Leu	Arg	Ala	Pro	
			355					360					365				
15	Leu	Glu	Val	Pro	Gln	Ala	Leu	Gly	Arg	Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Gln	Gln	
		370					375					380					
20	Leu	Gln	Val	Ile	Ser	Asp	Arg	Glu	Glu	Pro	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Leu	
	385					390					395					400	
25	Thr	Gln	Gly	Pro	Leu	Tyr	Gly	Gln	Leu	Leu	Val	Gly	Gly	Gln	Pro	Ala	
					405					410					415		
30	Ser	Ala	Phe	Ser	Gln	Leu	Gln	Val	Asp	Gln	Gly	Asp	Val	Val	Phe	Val	
				420					425					430			
35	Phe	Thr	Asn	Phe	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	His	Phe	Lys	Val	Val	Ala	Leu	
			435					440					445				
40	Ala	Arg	Gly	Val	Asn	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Asn	Val	Thr	Val	Gln	Ala	
		450					455					460					
45	Leu	Leu	His	Val	Trp	Ala	Gly	Gly	Pro	Trp	Pro	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	
	465					470					475					480	
50	Arg	Leu	Asp	Pro	Thr	Val	Leu	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Ala	Asn	Arg	Thr	
					485					490					495		
55	Gly	Ser	Met	Pro	His	Phe	Arg	Leu	Leu	Ala	Gly	Pro	Arg	Tyr	Gly	Arg	
				500					505					510			
60	Val	Val	Arg	Val	Ser	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Ser	Arg	Ser	Asn	Gln	Leu	
			515					520					525				
65	Val	Glu	His	Phe	Thr	Gln	Arg	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	
		530					535					540					
70	Glu	Val	Gly	Lys	Pro	Glu	Gly	Arg	Ser	Thr	Gly	Pro	Ala	Gly	Asp	Arg	
	545					550					555					560	
75	Leu	Thr	Leu	Glu	Leu	Trp	Ala	Lys	Gly	Val	Pro	Pro	Ala	Val	Ala	Leu	

[illegible]

### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

30 1. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка містить:

(I) перший антигензв'язувальний фрагмент, який являє собою молекулу Fab, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3, яка містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга SEQ ID NO: 4, CDR 2 важкого ланцюга SEQ ID NO: 5, CDR 3 важкого ланцюга SEQ ID NO: 6, 35 CDR 1 легкого ланцюга SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкого ланцюга SEQ ID NO: 9 і CDR 3 легкого ланцюга SEQ ID NO: 10, де перший антигензв'язувальний фрагмент являє собою одержану в результаті кросинговеру молекулу Fab, в якій або варіабельні, або константні ділянки, зокрема константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab обмінені;

(II) другий і третій антигензв'язувальні фрагменти, кожний з яких являє собою молекулу Fab, яка 40 має здатність специфічно зв'язуватися з CEA, яка містить CDR 1 важкого ланцюга SEQ ID NO: 24, CDR 2 важкого ланцюга SEQ ID NO: 25, CDR 3 важкого ланцюга SEQ ID NO: 26, CDR 1 легкого ланцюга SEQ ID NO: 28, CDR 2 легкого ланцюга SEQ ID NO: 29 і CDR3 легкого ланцюга SEQ ID NO: 30;

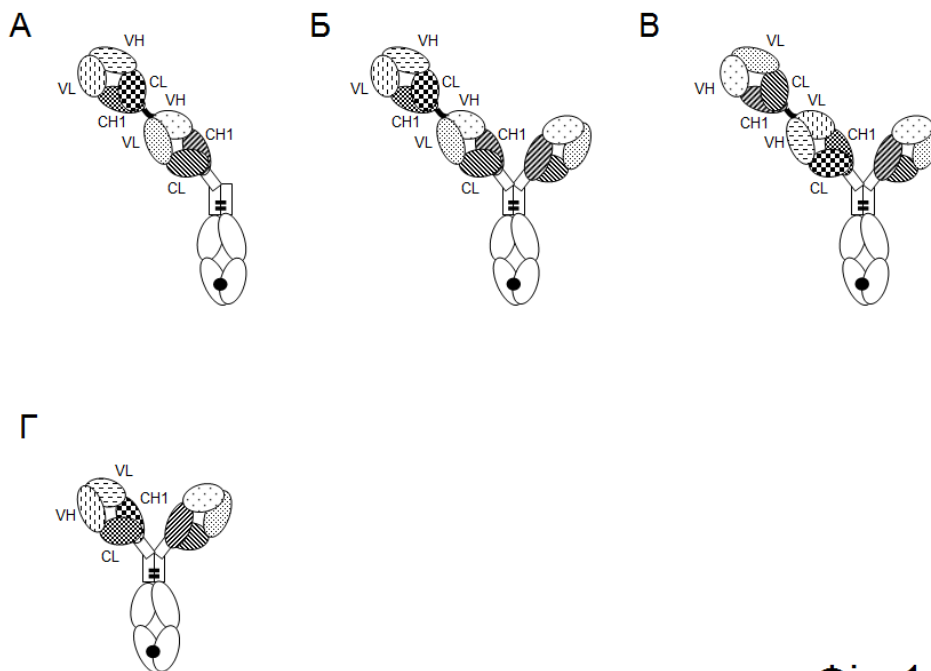
(III) Fc-домен, що складається з першої й другої субодиниць, які мають здатність до стабільної асоціації, де другий антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці Fab важкого ланцюга з N-кінцем Fab важкого ланцюга першого антигензв'язувального фрагмента, і перший антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці Fab важкого ланцюга з N-кінцем першої субодиниці Fc-домену, і в якій третій антигензв'язувальний фрагмент злитий на С-кінці Fab важкого ланцюга з N-кінцем другої субодиниці Fc-домену. 45

50 2. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, за п. 1, в якій перший антигензв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 55 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 7.

3. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за п. 1 або 2, в якій другий і третій антигензв'язувальні фрагменти містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 23, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 60 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 27.

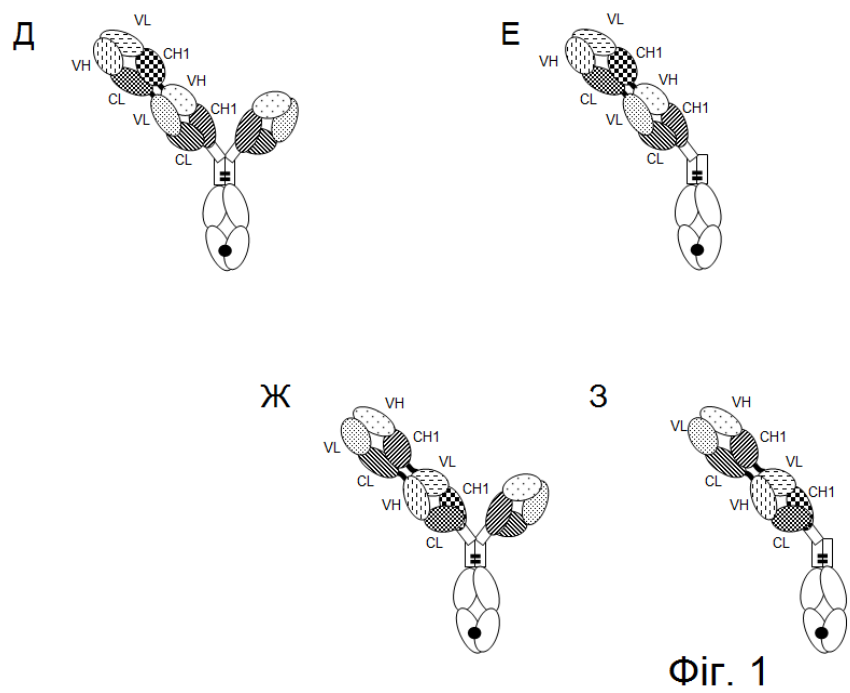
4. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким з пп. 1-3, в якій перший антигензв'язувальний фрагмент являє собою одержану в результаті кросінговеру молекулу Fab, в якій константні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab обмінені і яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, в якій кожен із другого і третього антигензв'язувальних фрагментів являє собою звичайну молекулу Fab, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27.
5. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким з пп. 1-4, в якій Fc-домен являє собою Fc-домен IgG, зокрема Fc-домен IgG1.
6. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким з пп. 1-5, в якій Fc-домен являє собою людський Fc-домен.
7. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким з пп. 1-6, в якій Fc-домен містить модифікацію, яка посилює асоціацію першої й другої субодиниці Fc-домену.
8. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за п. 7, в якій в СН3-домени першої субодиниці Fc-домену амінокислотний залишок замінений на амінокислотний залишок, що має більший об'єм бокового ланцюга, утворюючи тим самим опуклість в СН3-домени першої субодиниці, яка може поміщатися в порожнину в СН3-домени другої субодиниці, і в СН3-домени другої субодиниці Fc-домену амінокислотний залишок замінений на амінокислотний залишок, що має менший об'єм бокового ланцюга, створюючи тим самим порожнину в СН3-домени другої субодиниці, в яку може поміщатися опуклість в СН3-домени першої субодиниці.
9. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким одним з пп. 1-8, в якій в СН3-домени першої субодиниці Fc-домену залишок треоніну в положенні 366 замінений залишком триптофану (T366W), і в СН3-домени другої субодиниці Fc-домену залишок тирозину в положенні 407 замінений залишком валіну (Y407V); в якій необов'язково:  
(а) у другій субодиниці Fc-домену додатково залишок треоніну в положенні 366 замінений залишком серину (T366S) і залишок лейцину в положенні 368 замінений залишком аланіну (L368A); і/або  
(б) у першій субодиниці Fc-домену додатково залишок серину в положенні 354 замінений залишком цистеїну (S354C) й у другій субодиниці Fc-домену додатково залишок тирозину в положенні 349 замінений залишком цистеїну (Y349C) (нумерація EU за Кеботом).
10. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким з пп. 1-9, в якій Fc-домен характеризується зниженою афінністю зв'язування з Fc-рецептором і/або зниженою ефекторною функцією у порівнянні з нативним Fc-доменом IgG1.
11. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким з пп. 1-10, в якій Fc-домен містить одну або декілька амінокислотну(их) заміну(ін), яка(і) знижує(ють) зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію.
12. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за п. 11, в якій зазначена(і) одна або декілька амінокислотна(их) заміна(ін) знаходиться(яться) в одному або декількох положенні(ях), вибраному(их) з групи: L234, L235 і P329 (нумерація EU за Кеботом).
13. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким одним з пп. 1-12, в якій кожна субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни L234A, L235A і P329G (нумерація EU за Кеботом).
14. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким одним з пп. 10-12, де Fc-рецептор являє собою Fcγ-рецептор.
15. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким з пп. 10-12, де ефекторна функція являє собою антитіло-зумовлену клітиноопосередковану цитотоксичність (ADCC).
16. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким з пп. 1-14, яка складається з першого, другого та третього антигензв'язувальних фрагментів, Fc-домену, та необов'язково одного або декількох пептидних лінкерів.
17. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула за будь-яким одним з пп. 1-16, яка містить поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 22, поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 56, поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 57 і поліпептидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 58.

18. Виділений полінуклеотид або багато полінуклеотидів, що кодує (ють) активувальну Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу за будь-яким з пп. 1-17.
19. Вектор, зокрема експресійний вектор, який містить полінуклеотид або багато полінуклеотидів за п. 18.
- 5 20. Клітина-хазяїн, яка містить полінуклеотид або багато полінуклеотидів за п. 18 або вектор за п. 19.
21. Спосіб одержання активуючої Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3 і CEA, що включає стадії, на яких:
  - а) культивують клітину-хазяїна за п. 20 в умовах, придатних для експресії активувальної Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули, і
  - б) виділяють активуючу Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу.
- 10 22. Активуюча Т-клітини біспецифічна антигензв'язувальна молекула, одержана способом за п. 21.
23. Фармацевтична композиція, яка містить активуючу Т-клітини біспецифічну антигензв'язувальну молекулу за будь-яким з пп. 1-17 або 22 і фармацевтично прийнятний носій.
- 15 24. Застосування активуючої Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули за будь-яким з пп. 1-17 або 22 або фармацевтичної композиції за п. 23 для лікування злоякісного новоутворення в індивідуума, який цього потребує.
- 20 25. Застосування активуючої Т-клітини біспецифічної антигензв'язувальної молекули за будь-яким з пп. 1-17 або 22 для приготування лікарського засобу для лікування злоякісного новоутворення в індивідуума, який цього потребує.
26. Спосіб лікування злоякісного новоутворення в індивідуума, що включає введення зазначеному індивідууму в терапевтично ефективній кількості композиції, яка містить активуючу
- 25 Т-клітини біспецифічну антигензв'язуючу молекулу за будь-яким з пп. 1-17 або 22 у фармацевтично прийнятній формі.
27. Спосіб індукції лізису клітини-мішені, що включає контактування клітини-мішені з активуючою Т-клітини біспецифічною антигензв'язувальною молекулою за будь-яким з пп. 1-17 або 22 в присутності Т-клітини.



Фіг. 1



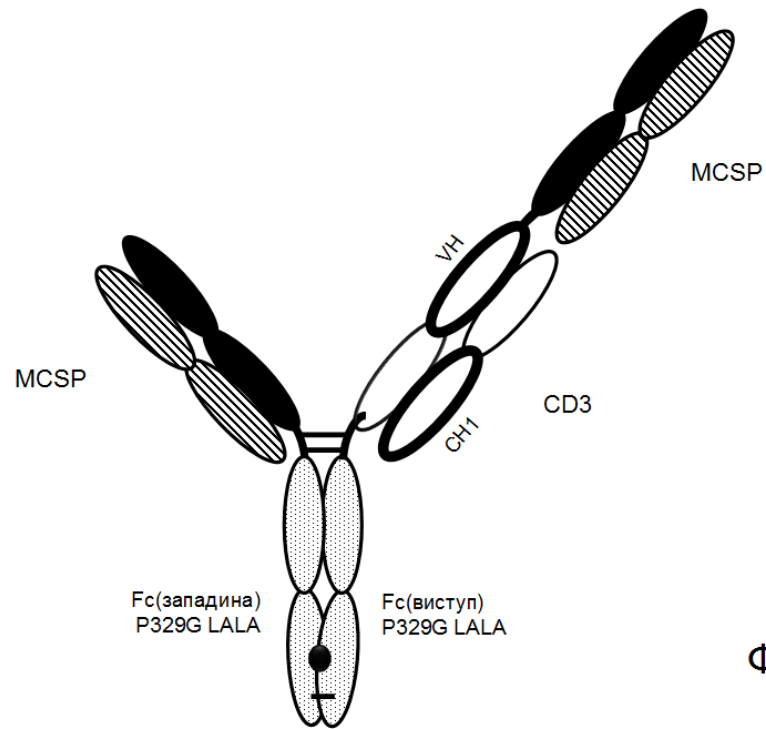


Фіг. 1

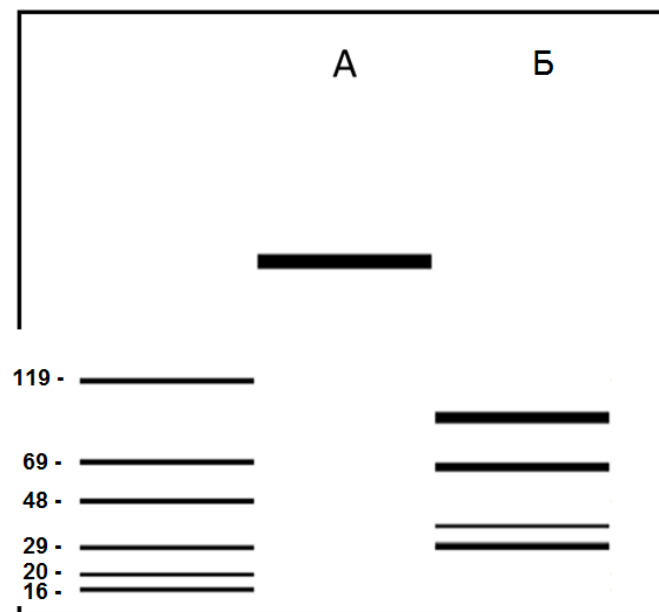
батьківська HC	1	QVQLQESGPGLVKPSQTLISLTCTVSGGSITSGYVNWIRQHPGKLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTSRNQPSLKLSVITAADTAWYYCADFDYWGQGTFLVTVSS
D6 (SEQ ID NO 34)	1	.....F...K.....
A7 (SEQ ID NO 36)	1	.....D.....
B7 (SEQ ID NO 39)	1	.....F...I.....
B8 (SEQ ID NO 41)	1	.....F...R.....
C1 (SEQ ID NO 13)	1	.....F.....

батьківська LC	1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNYLWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISISLQPEDFATYYCQQYSKLPWTFGGGTKEIK
G3 (SEQ ID NO 17)	1	.....Y.....
E10 (SEQ ID NO 43)	1	.....Y...G.....H.....
E10-G3 (SEQ ID NO 46)	1	.....Y...G.....H.....A.....
C5 (SEQ ID NO 47)	1	.....R...E.....G.....E.....
C5-G3 (SEQ ID NO 51)	1	.....R...E.....G.....A.....

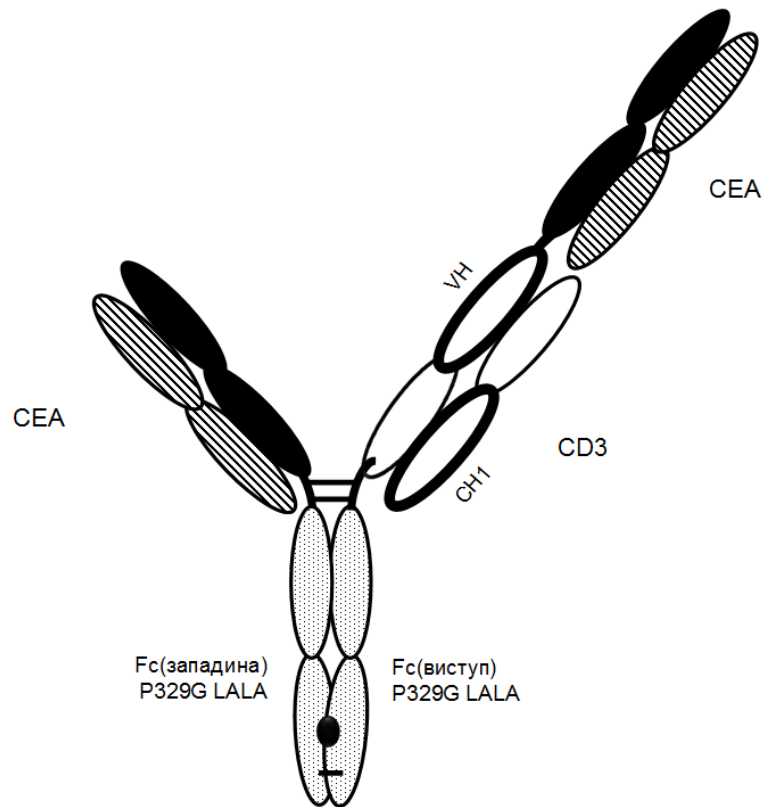
Фіг. 2



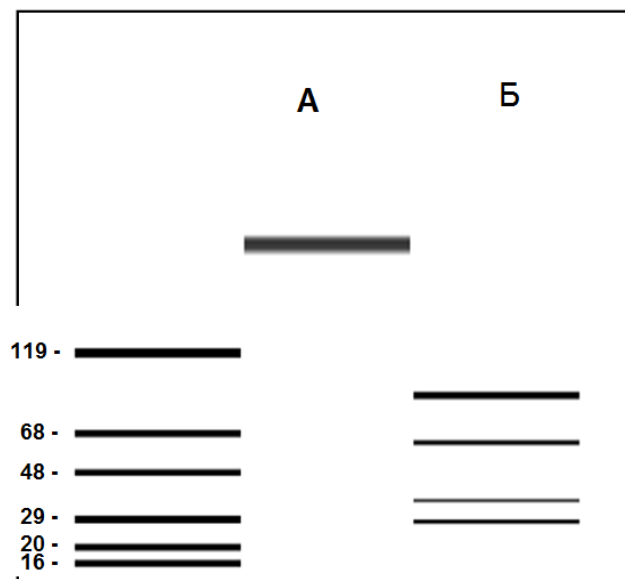
Фіг. 3



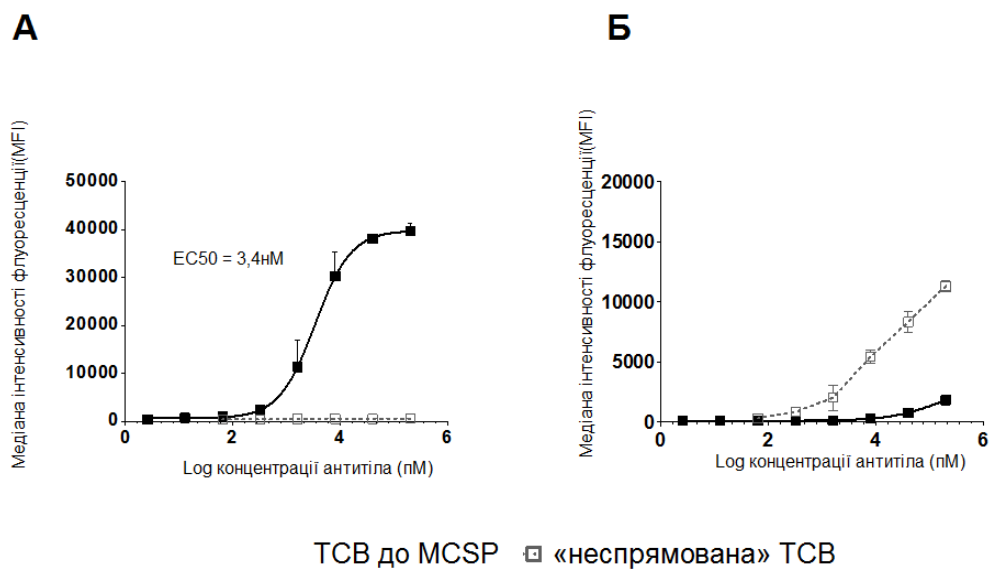
Фіг. 4



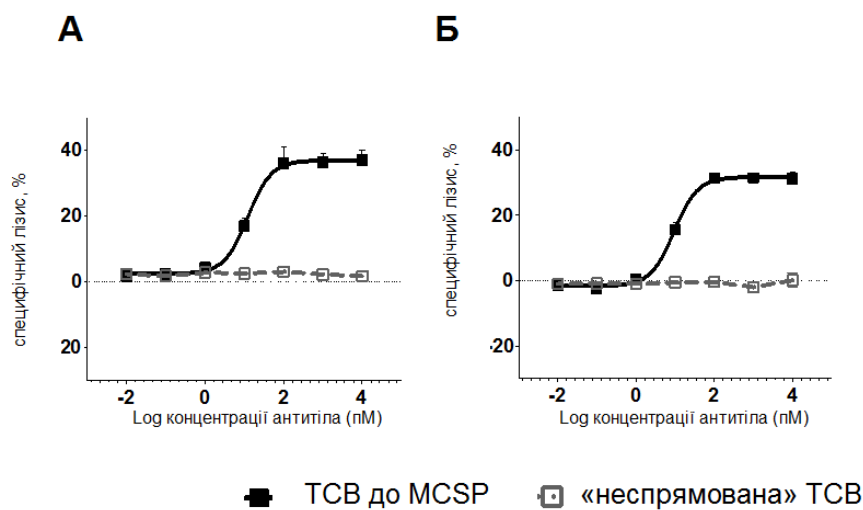
Фиг. 5



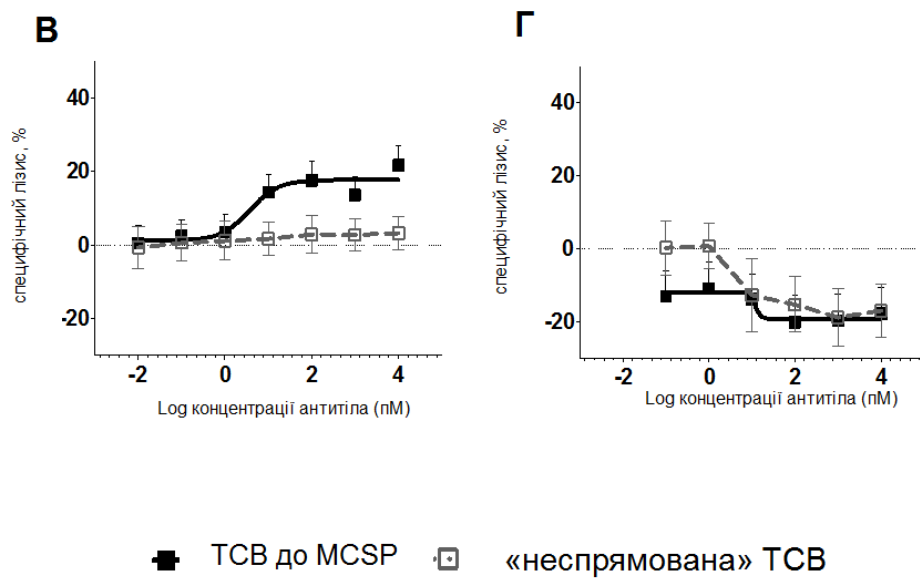
Фиг. 6



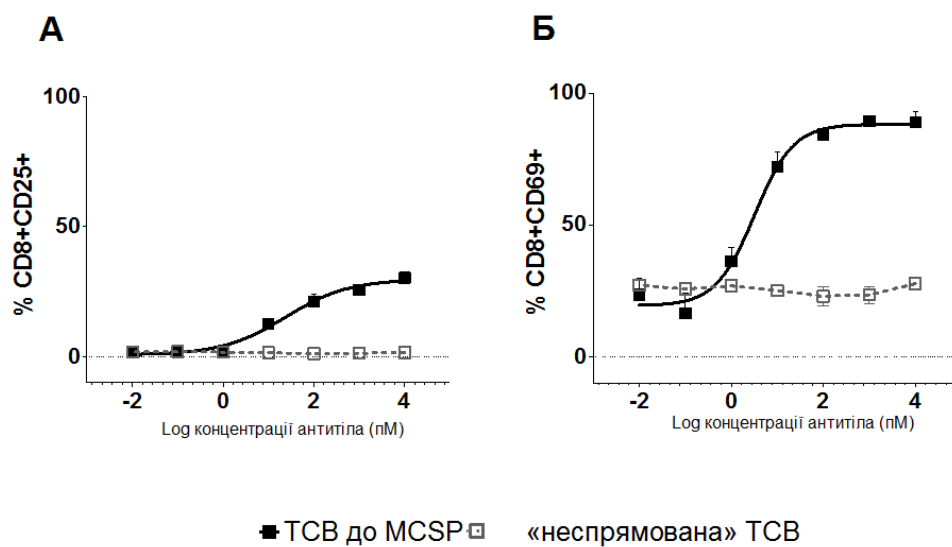
Фіг. 7



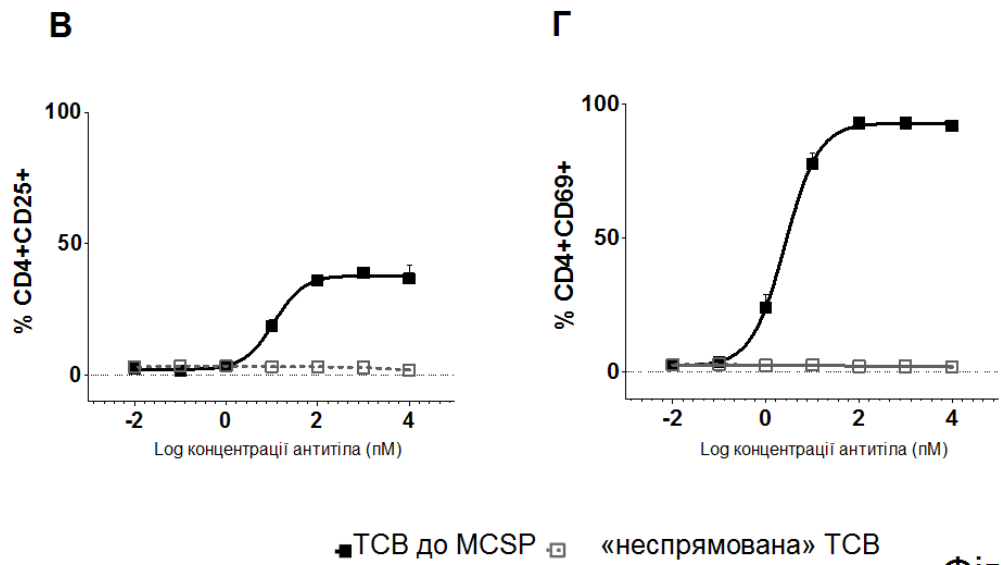
Фіг. 8



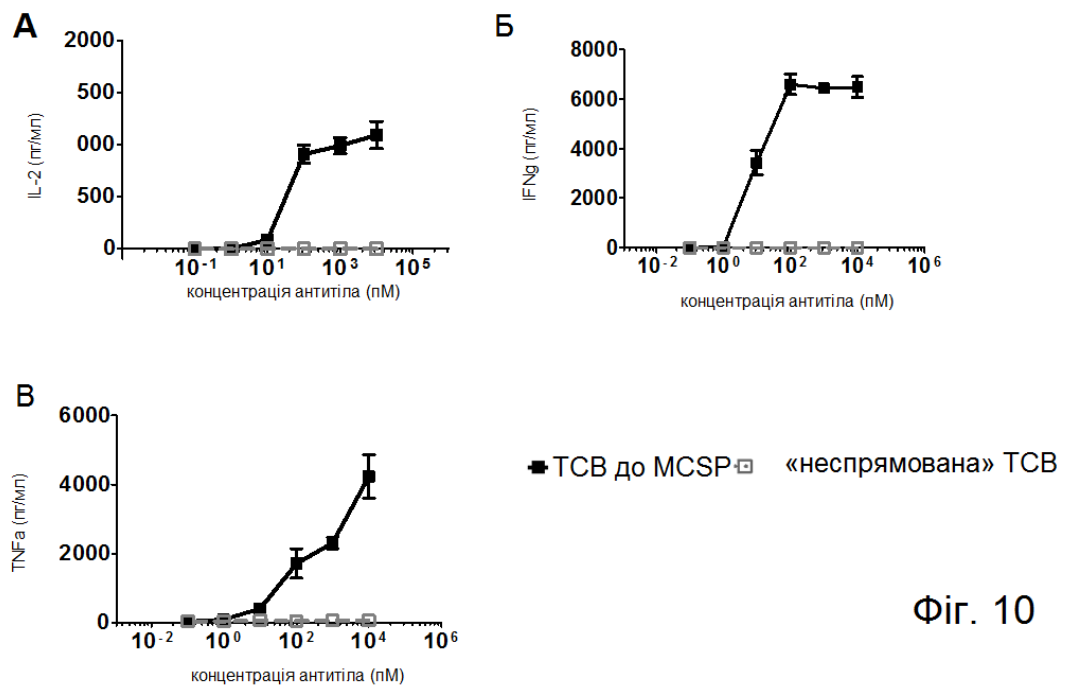
Фіг. 8



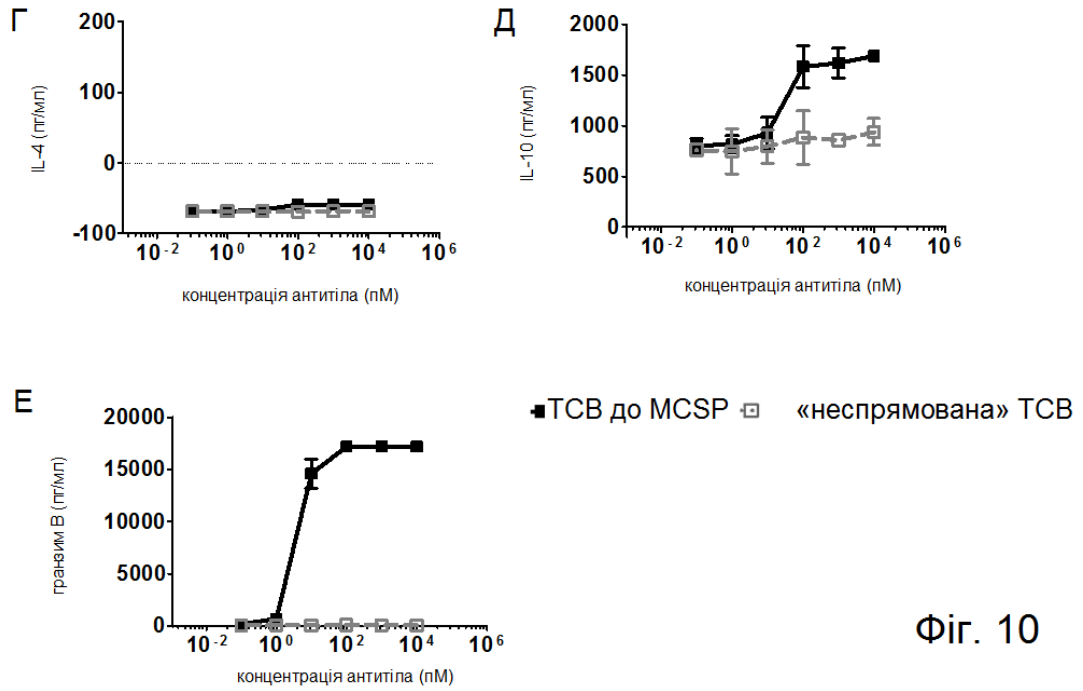
Фіг. 9



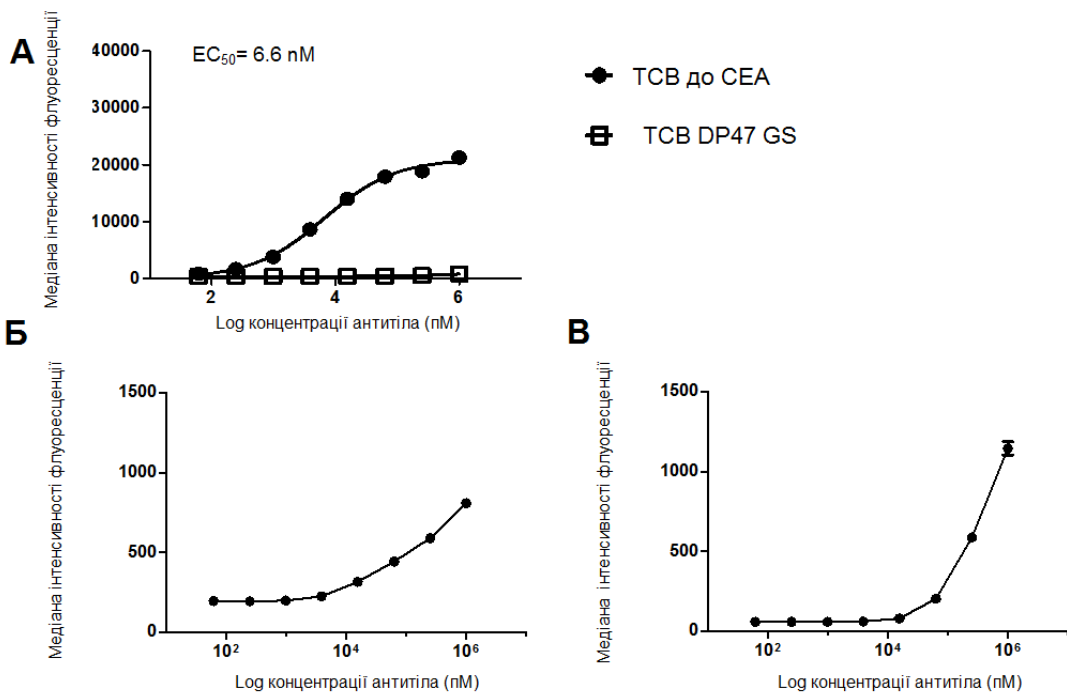
Фіг. 9



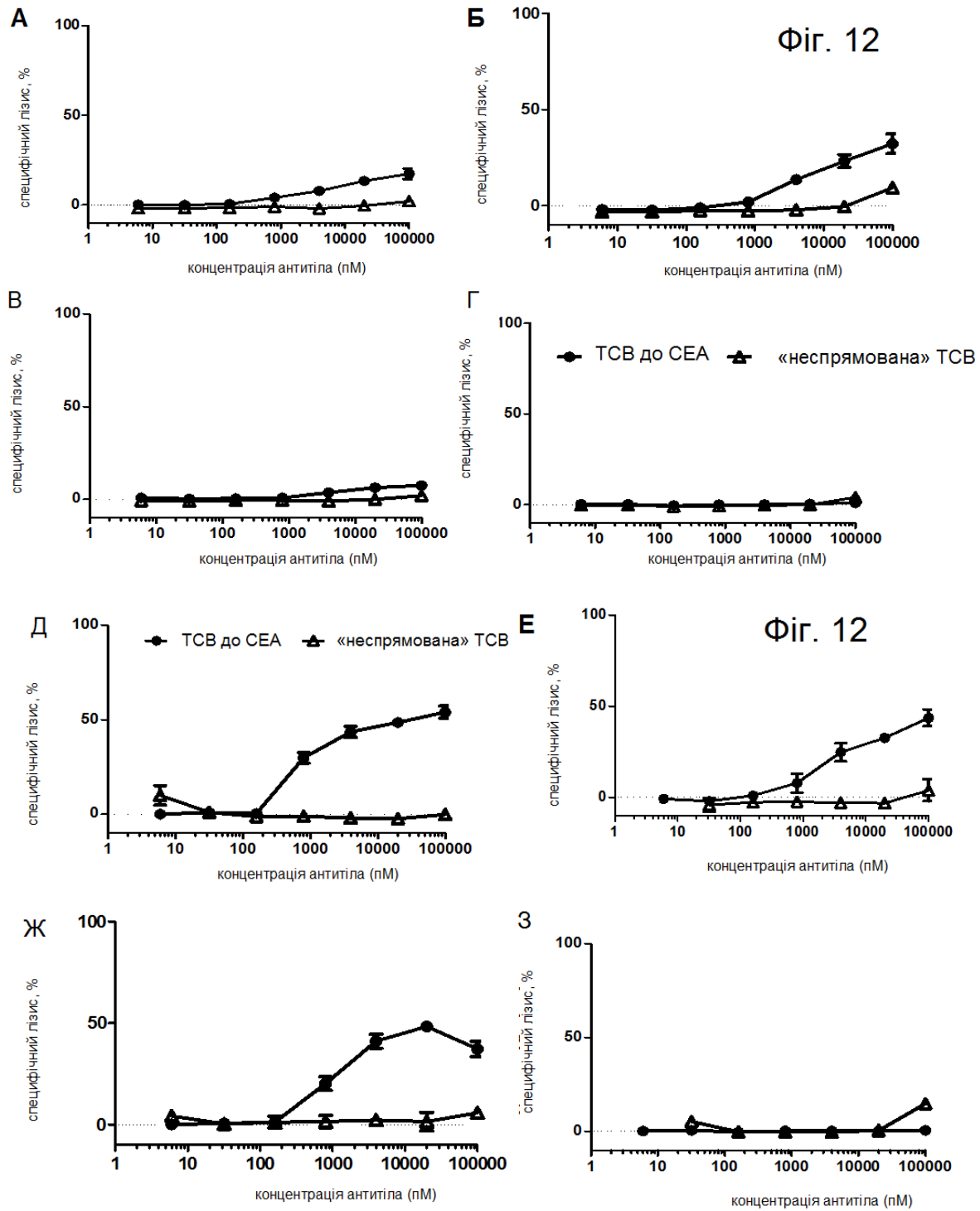
Фіг. 10



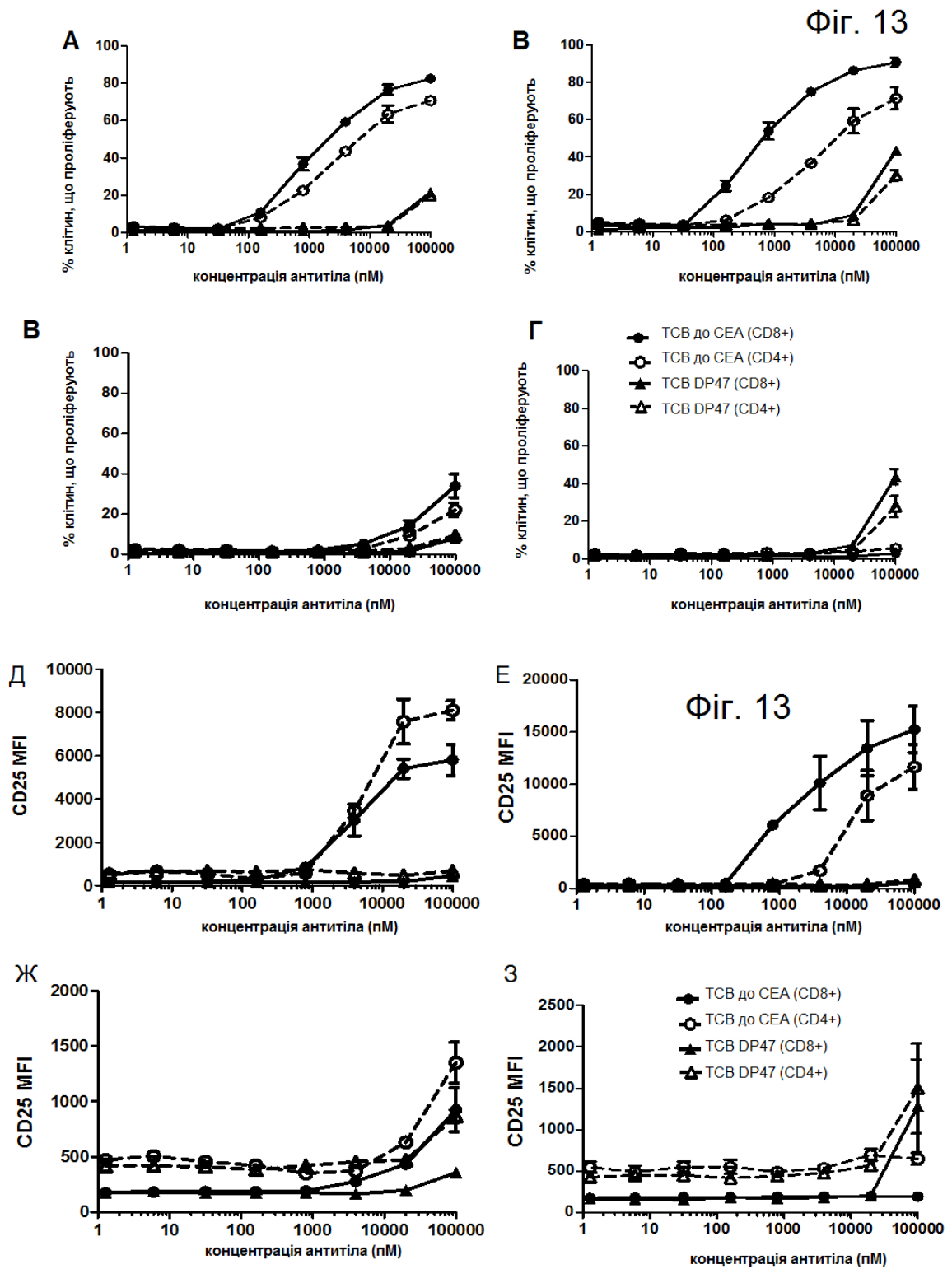
Фіг. 10

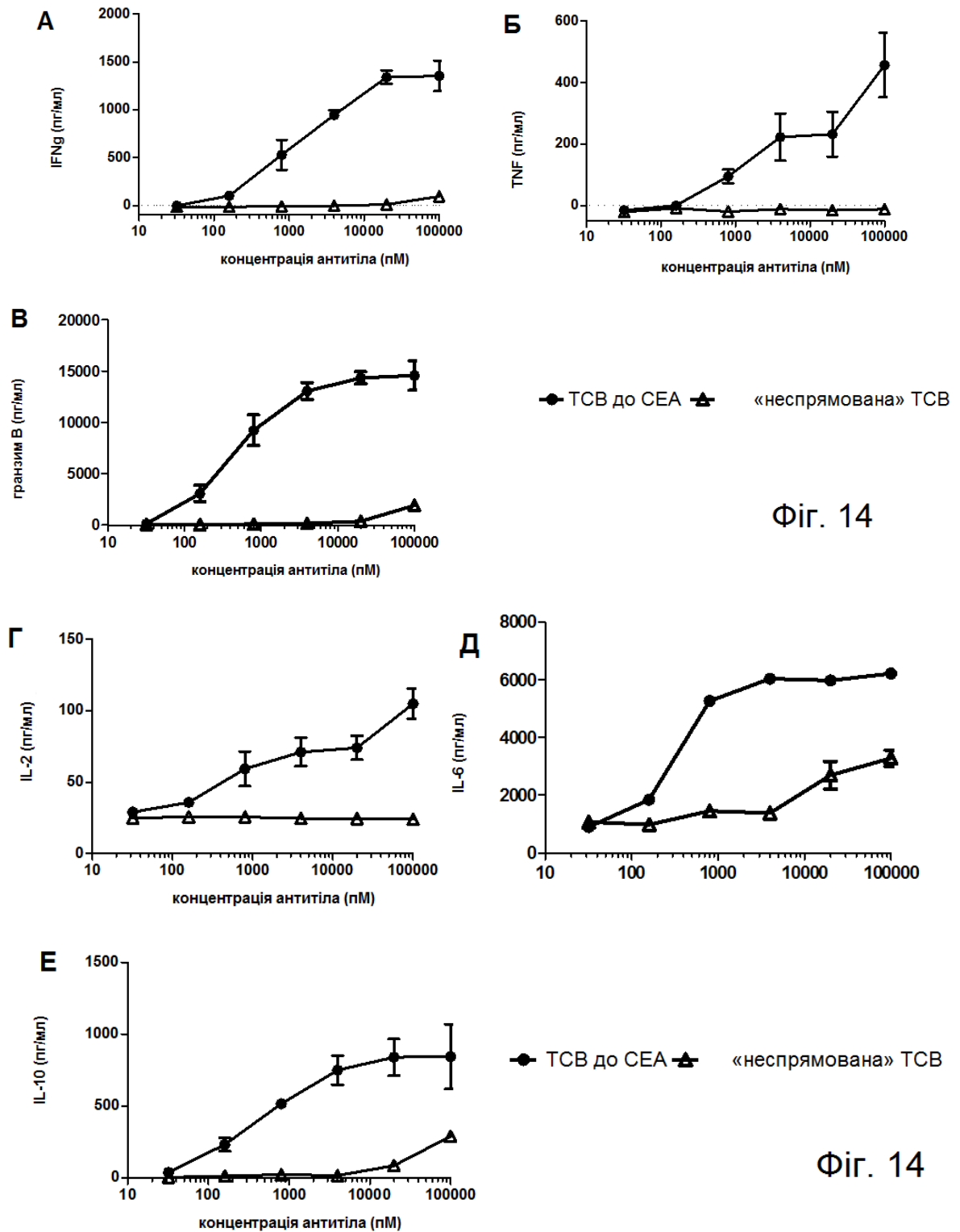


Фіг. 11



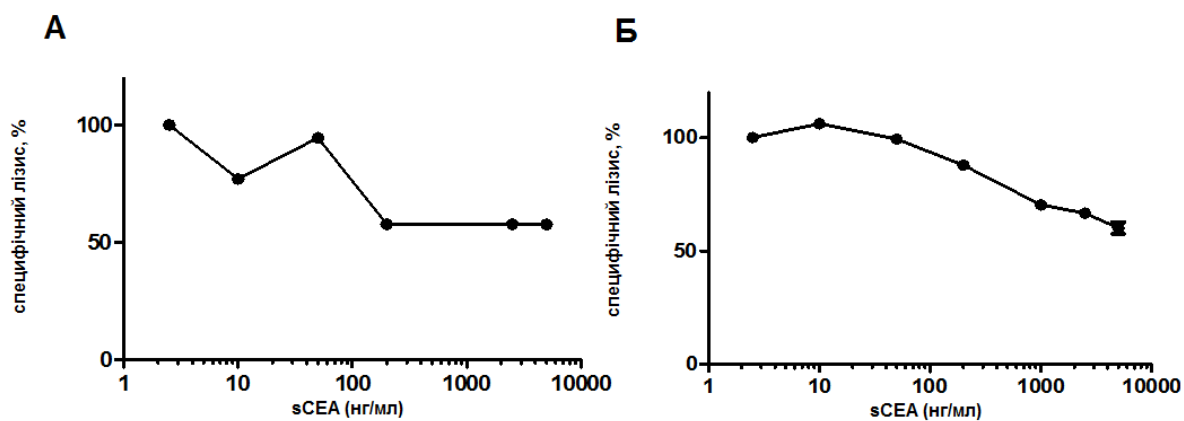




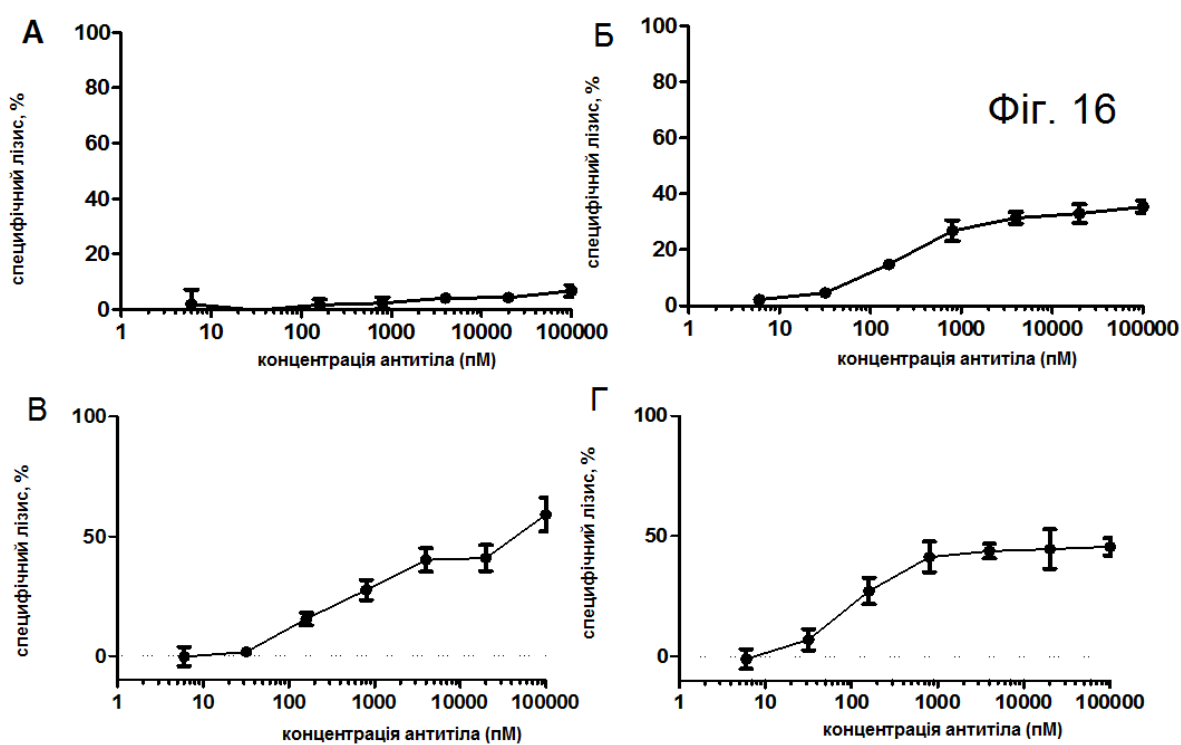


Фіг. 14

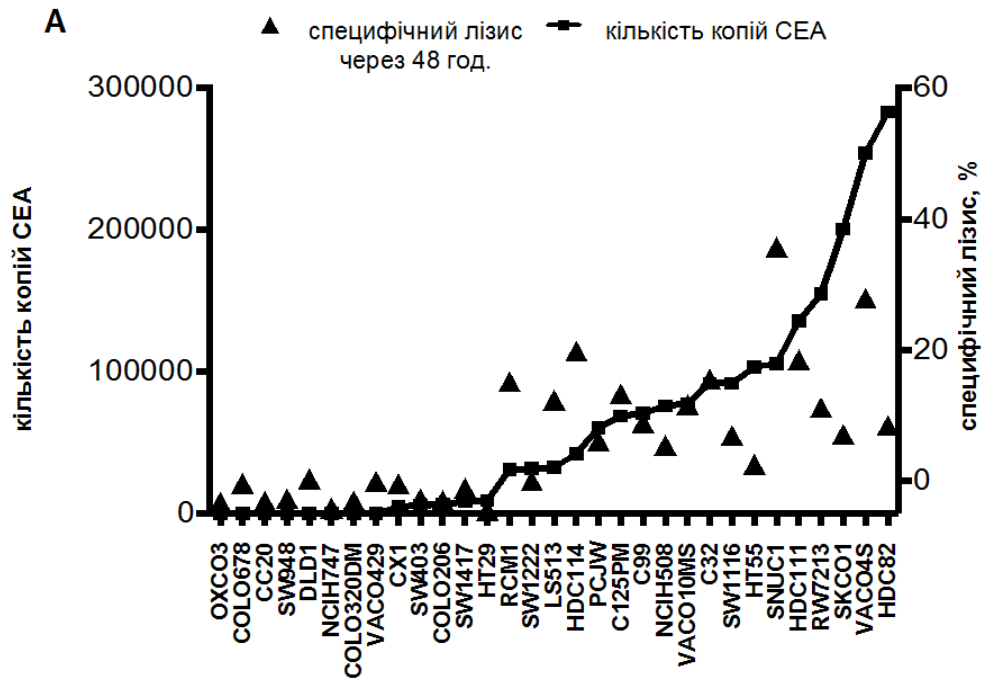
Фіг. 14



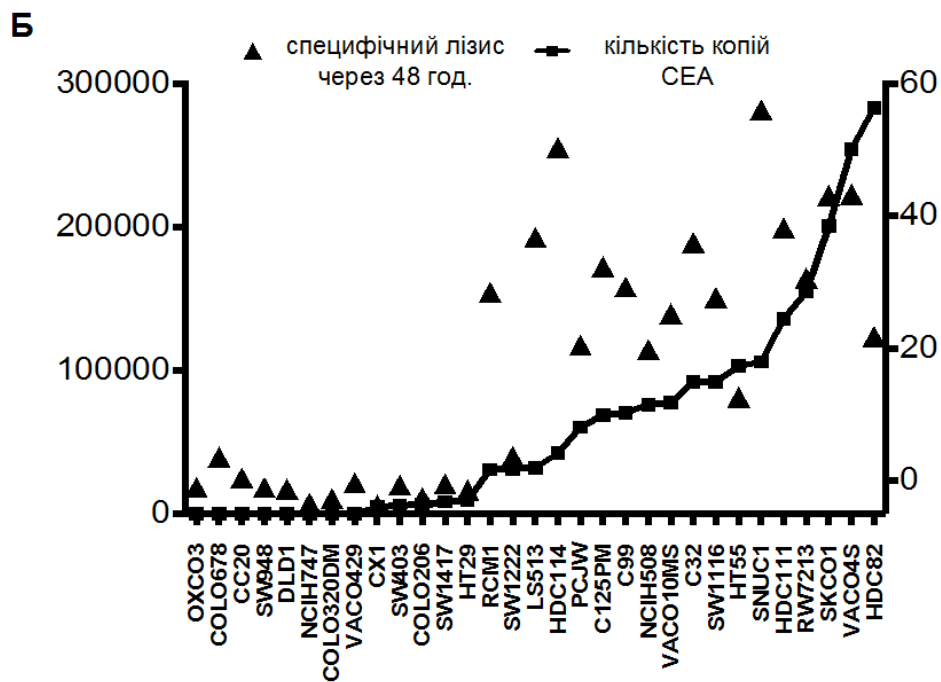
Фіг. 15



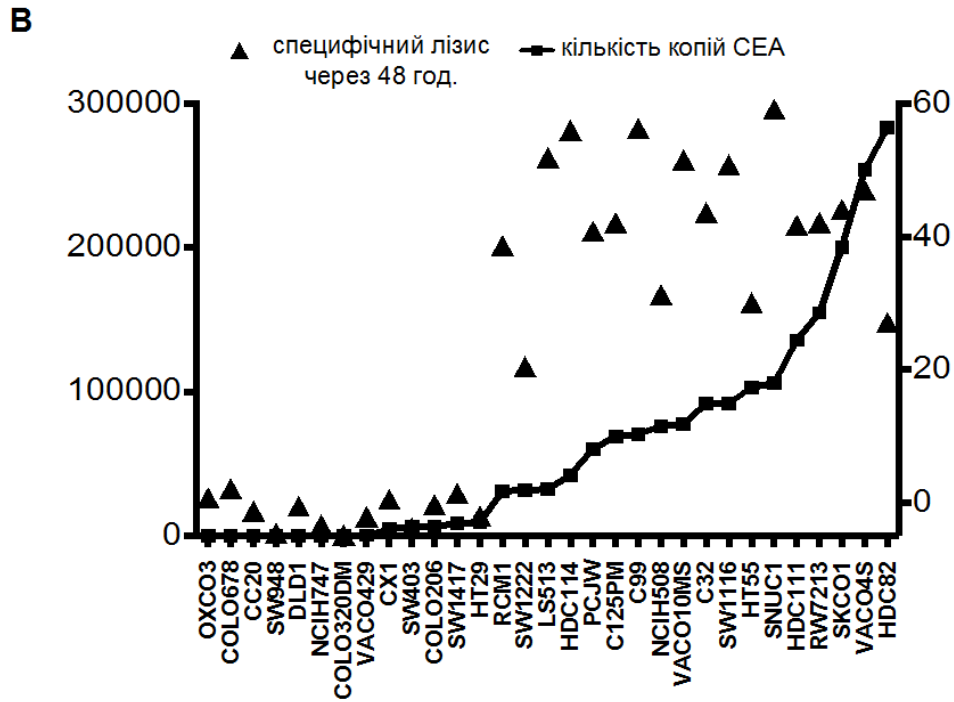
Фіг. 16



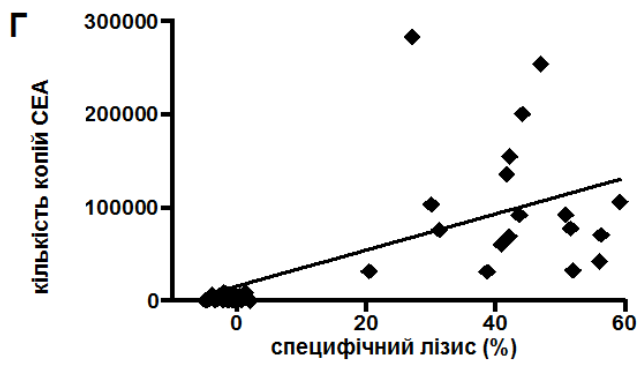
Фіг. 17



Фіг. 17

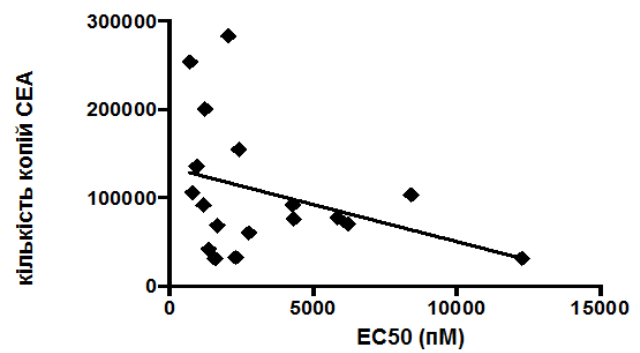


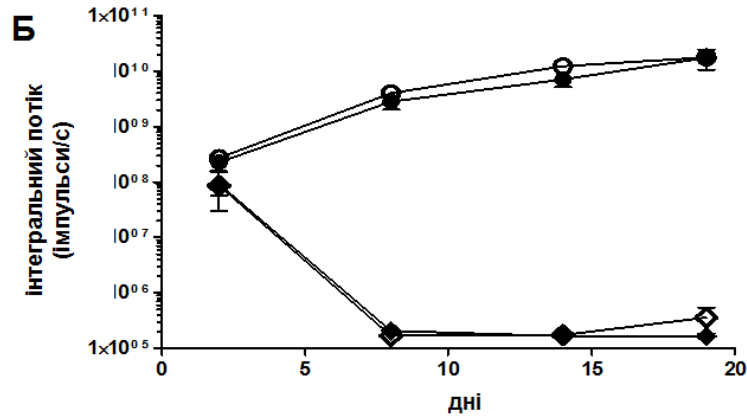
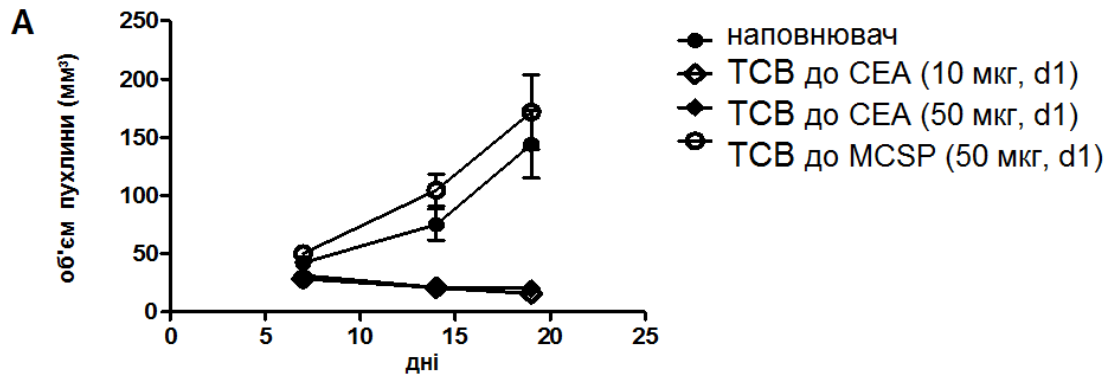
Фіг. 17



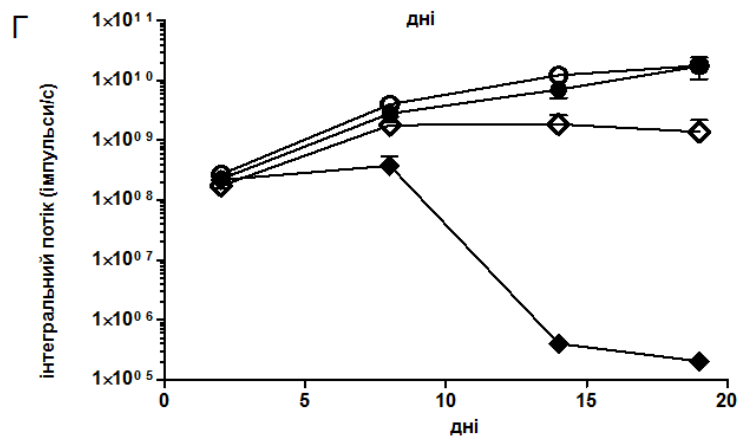
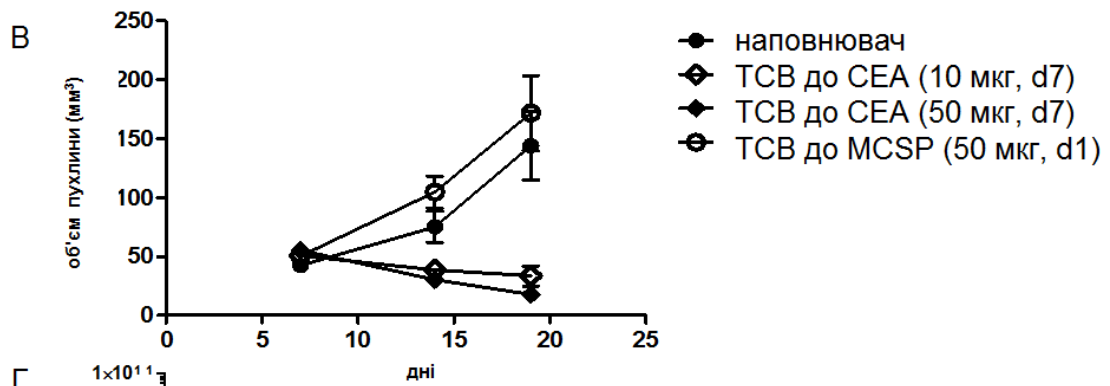
Фіг. 17

**Д**

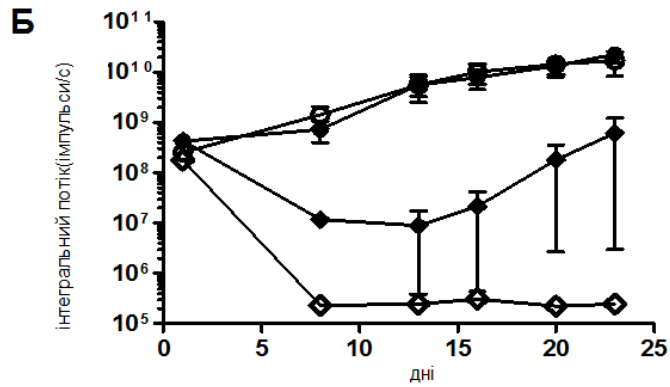
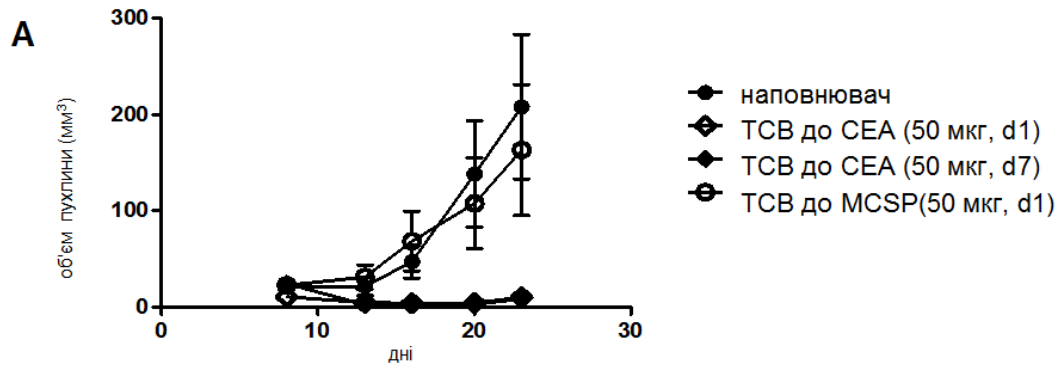




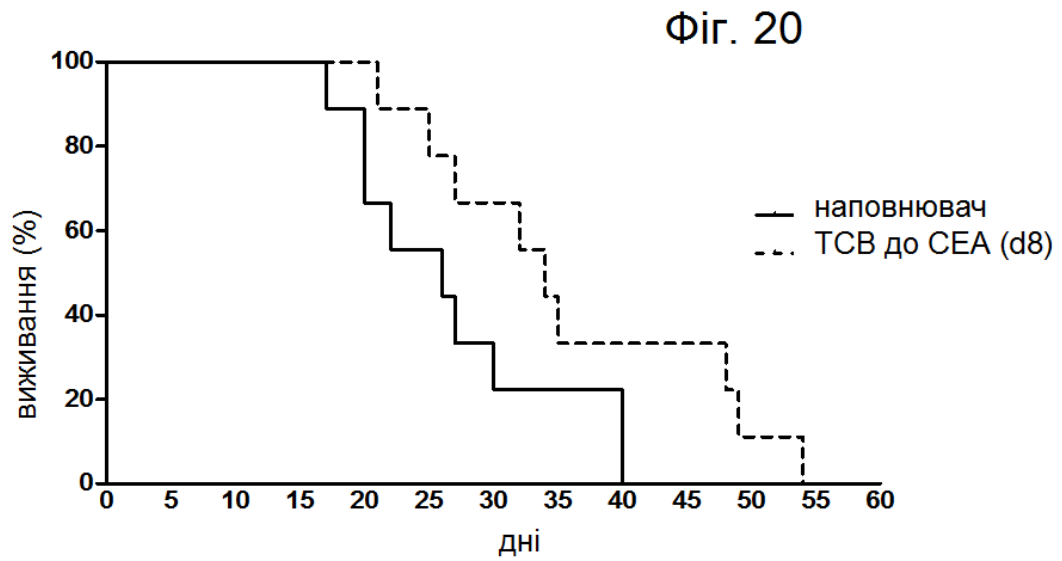
Фіг. 18

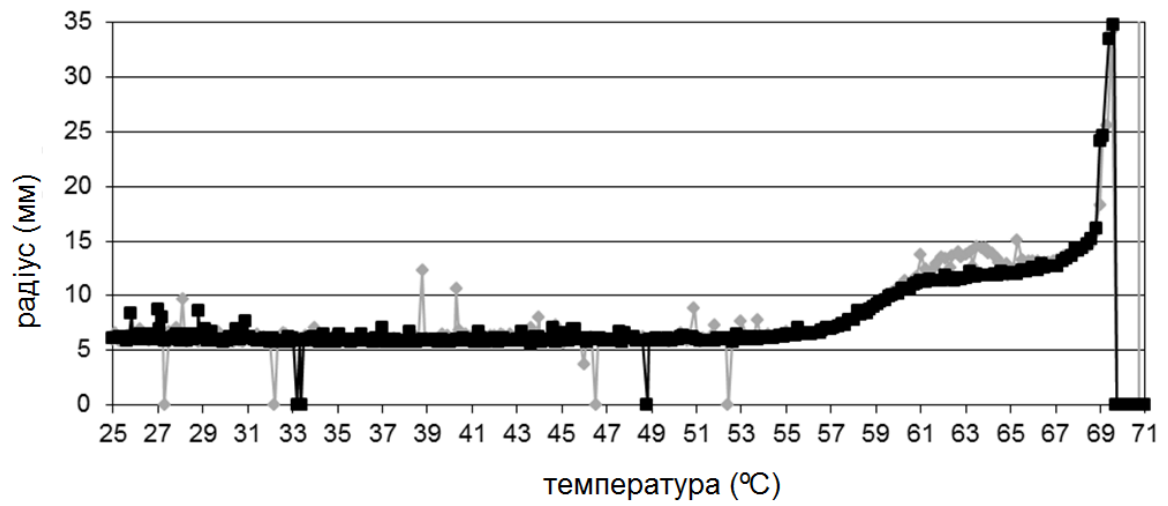


Фіг. 18

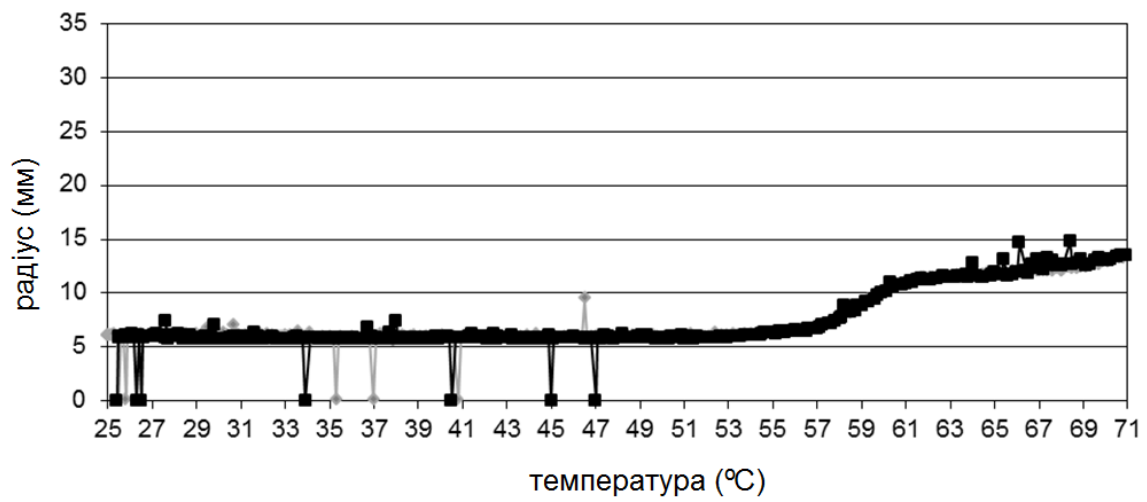


Фіг. 19



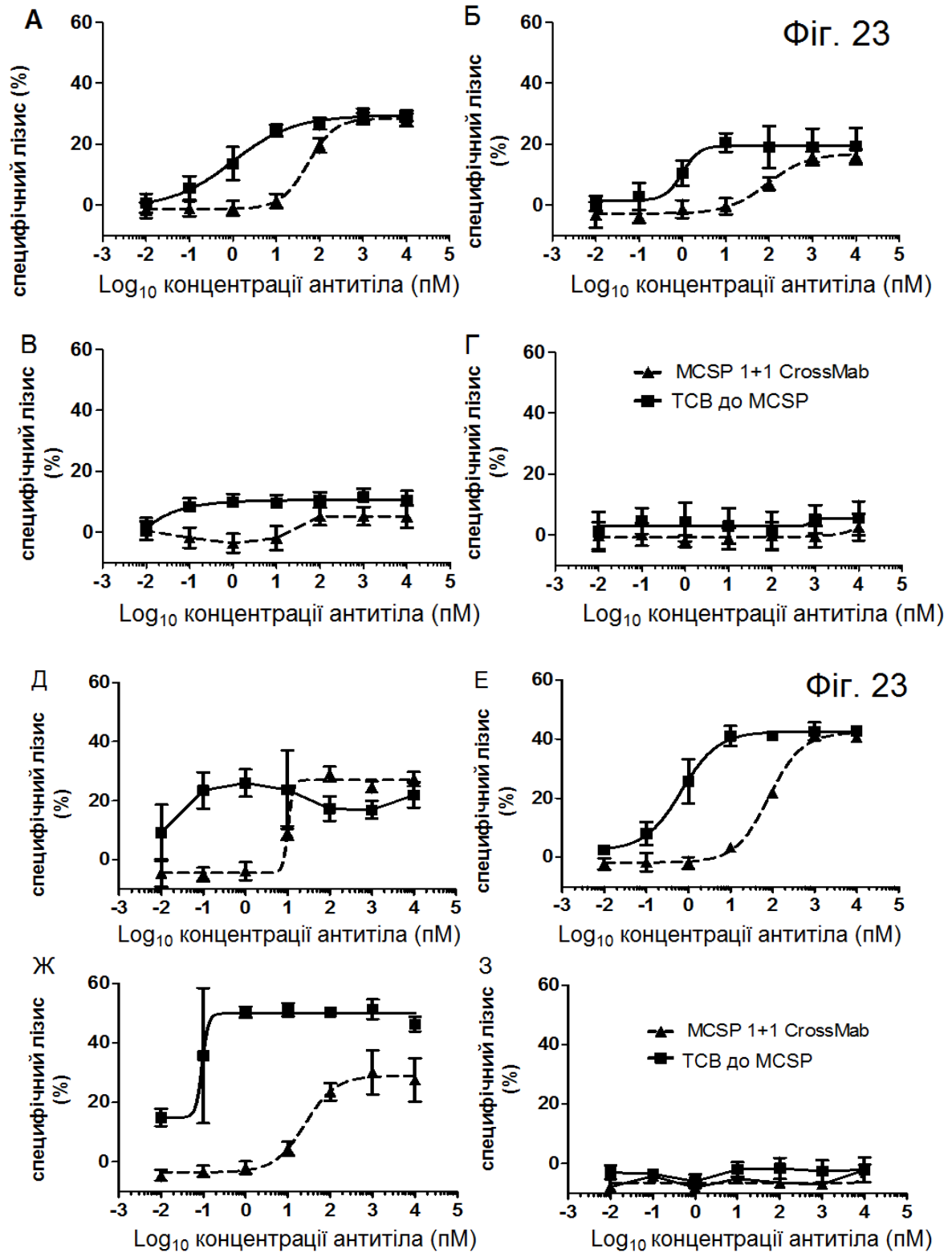


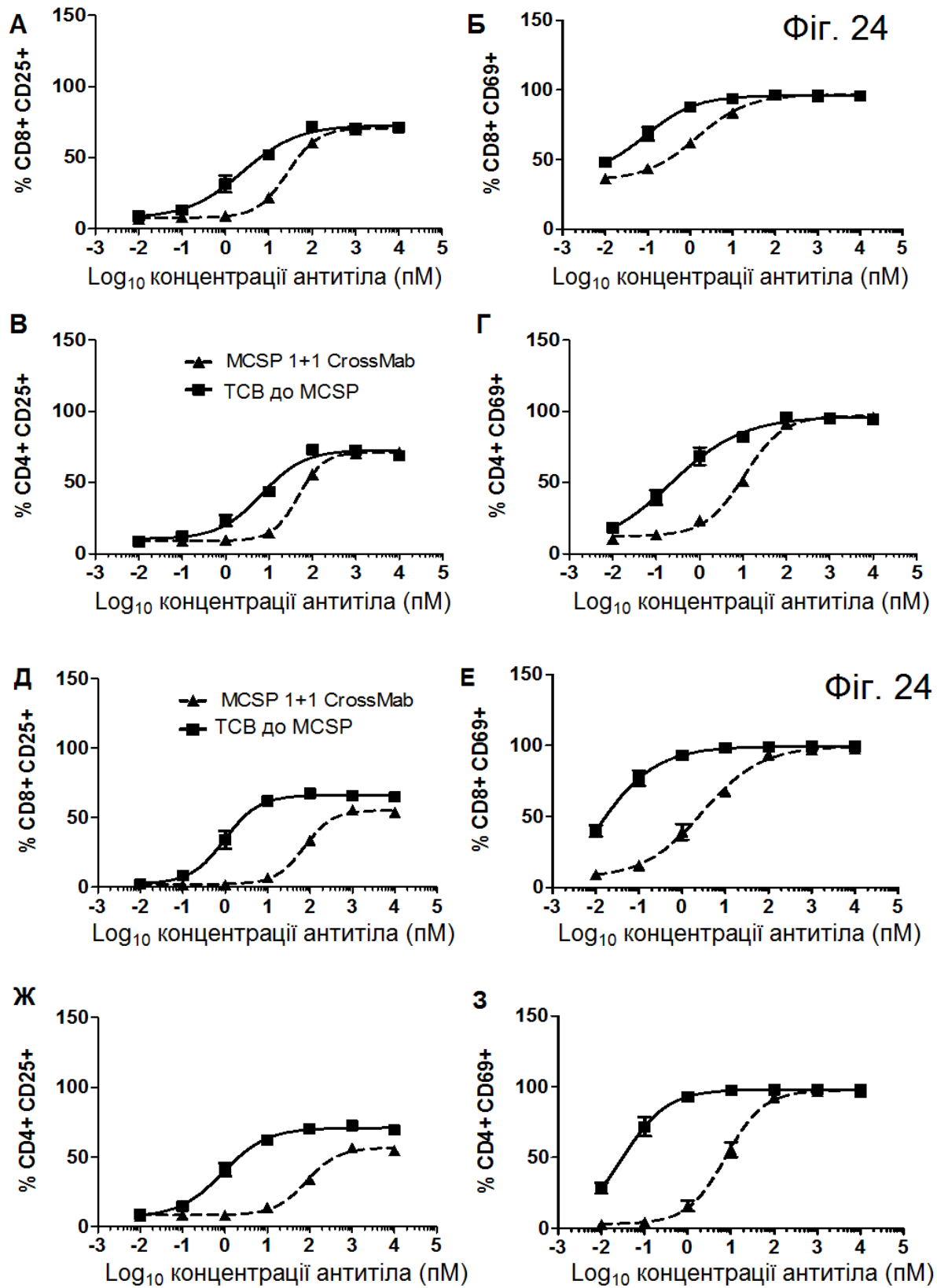
Фіг. 21

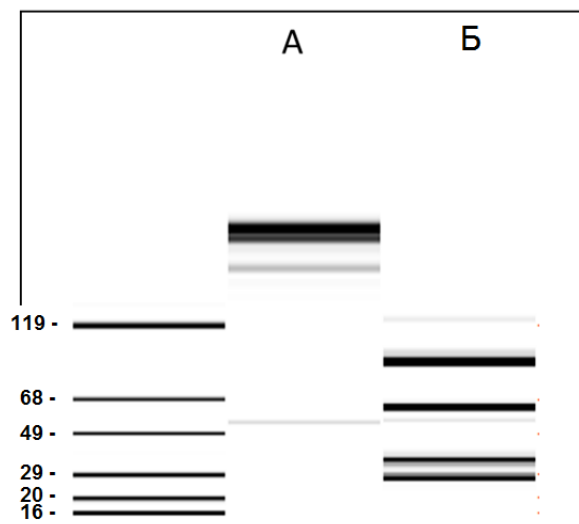


Фіг. 22









Фіг. 25